

4 RESULTATS

4.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DELS INDIVIDUS PARTICIPANTS EN L'ESTUDI

L'estudi va incloure un total de 40 individus. D'aquests, dos van ser exclosos, un per no acudir a les visites de control programades i l'altre per deteriorament de la mostra sanguínia corresponent a l'inici del seguiment.

Les característiques demogràfiques i clíniques dels 38 individus que finalment van ser inclosos en l'estudi es detallen en la Taula 9. La descripció dels grups s'ha realitzat primer per als pacients al·lèrgics de forma global, i després desglossats en el grup que no seria tractat amb IT i el grup que si havia de rebre IT. A continuació s'exposen les característiques dels individus no al·lèrgics.

GRUP DE PACIENTS AL·LÈRGICS

El grup de pacients al·lèrgics va quedar constituït per 28 individus al·lèrgics a *D pteronyssinus* amb símptomes d'asma i/o rinoconjuntivitis. La mitjana d'edat del grup era de 20,68 ± 3,37 anys, amb un mínim de 15 anys i un màxim de 29 anys. Segons el gènere, hi havia 12 homes i 16 dones.

Taula 9. Individus de l'estudi

GRUP	EDAT anys	HOMES	DONES	P.C.D pt	IgE TOTAL kU/l
<u>Al·lèrgics (total)</u>	20,68±3,37 (15-29)	12	16	100%	447,21 ± 466,91
Al·lèrgics sense IT	21,17 ± 3,13 (15-26)	8	4	100%	561,67 ± 550,75
Al·lèrgics amb IT	20,31 ± 3,59 (15-29)	4	12	100%	361,38 ± 389,39
<u>No al·lèrgics</u>	25,30 ± 2,21 (22-29)	2	8	0%	N.R.

P.C.D pt = prova cutània a *D pteronyssinus*; N.R.= no realitzada. L'edat i la IgE venen expressades com mitjana ± desviació estàndard.

Segons els criteris de selecció exposats a l'apartat de Material i Mètodes, es van constituir dos grups en funció de si rebrien o no IT:

Grup d'al·lèrgics no tractats amb IT: El grup estava format per 12 pacients al·lèrgics, amb una mitjana d'edat de 21,17 ± 3,13 anys (15-26 anys).

La mitjana d'IgE total era de 561,67± 550,75 kU/l (90-1696 kU/l). La mitjana d'IgE específica a *D pteronyssinus* era de 62,75 ± 32,71 kU/l (22-100 kU/l).

Grup d'al·lèrgics tractats amb IT: Aquest grup va quedar constituït per 16 pacients, al·lèrgics a *D pteronyssinus* amb una mitjana d'edat de 20,31 ± 3,59 anys (15-29 anys).

La mitjana de la IgE sèrica era de 361,38 ± 389,39 kU/l (26-1444 kU/l). La mitjana d'IgE específica a *D pteronyssinus* fou de 56, 5 ± 32,33 kU/l (3 i 100 kU/l).

Les característiques clíniques dels dos grups de pacients al·lèrgics expressades en forma de puntuació en una escala de símptomes, de medicació, i els valors de les

proves respiratòries funcionals, que presentaven a l'inici de l'estudi queden reflectides a la Taula 10.

Taula 10. Característiques clíniques dels grups de pacients segons van ser o no ser tractats amb IT

	Grup sense IT	Grup amb IT
Síntomes (Escala punts)	9,48 ± 4,79	10,08 ± 2,00
Medicació (Escala punts)	2,39 ± 1,22	3,12 ± 2,59
Proves cutànies a <i>D pteronyssinus</i>, diàmetre pàpules (mm)	9,25 ± 5,29	7,50 ± 1,91
FVC (%)	95,25 ± 13,12	86,44 ± 12,52
VEMS (%)	97,58 ± 14,90	86,56 ± 14,83
IgE total (kU/l)	561,67 ± 361,38	361,38 ± 389,39
IgE específica (kU/l)	62,75 ± 32,71	56,50 ± 32,33

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard.

Quan es van comparar les característiques demogràfiques i clíniques entre el grup no tractat i el grup que seria tractat amb IT, no es van observar diferències estadísticament significatives.

GRUP D'INDIVIDUS NO AL·LÈRGICS

Aquest grup estava constituït per 10 individus sans (vuit dones i dos homes) que per la història clínica no presentaven símptomes suggestius de malaltia al·lèrgica. Les proves cutànies a pneumoal·lèrgens, inclús *D pteronyssinus*, eren negatives.

La mitjana d'edat del grup era de 25,3 ± 2,21 anys (22-29 anys).

...

La comparació de les característiques demogràfiques del grup de pacients al·lèrgics

i el grup d'individus sans, no va demostrar diferències estadísticament significatives en quant al sexe, si bé el grup d'al·lèrgics presentava una mitjana d'edat menor que el grup de no al·lèrgics ($p < 0,001$).

4.2 ESTUDI CLÍNIC

4.2.1 PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT A *Dermatophagoides pteronyssinus*

En els dos grups de pacients al·lèrgics, les proves cutànies pel mètode de “prick” es van realitzar amb diferents concentracions de *D pteronyssinus* (0,1, 1, 10 i 100 HEP/ml) a l'inici, als sis mesos i a l'any, per tal d'avaluar un canvi de reactivitat cutània al llarg de l'estudi. Els resultats obtinguts tant amb el control positiu (histamina) com amb *D pteronyssinus* a l'inici de l'estudi (previ al tractament) i en els controls posteriors (6 mesos i un any) es mostren a la Taula 11.

Les pàpules induïdes per la histamina no es van modificar al llarg de l'estudi en cap del dos grups de pacients (Taula 11).

A l'inici de l'estudi, no hi havia diferències estadísticament significatives en els resultats obtinguts en les proves cutànies amb les diferents concentracions de *D pteronyssinus* entre el grup que no seria tractat amb IT i el grup que sí rebria aquest tractament. En canvi, als 6 mesos i a l'any s'observava que el grup de pacients tractats amb IT presentava una menor reactivitat cutània comparat amb el grup que no havia rebut IT, amb una diferència estadísticament significativa (concentració 0,1 HEP/ml, $p=0,029$ a T2 i $p=0,008$ a T3; concentració 1 HEP/ml, $p=0,013$ a T2 i $p=0,023$ a T3) (veure Taula 11).

Taula 11. Proves cutànies amb diferents concentracions de *D pteronyssinus* a l'inici, 6 mesos i 1 any de l'estudi. Comparació entre grups.

		Grup sense IT	Grup amb IT	p
Histamina	T1	5,58 ± 1,08	5,34 ± 0,77	N.S.
	T2	5,29 ± 0,58	5,41 ± 0,92	N.S.
	T3	5,42 ± 0,90	5,19 ± 0,66	N.S.
0,1 HEP/ml	T1	1,54 ± 1,44	1,44 ± 1,37	N.S.
	T2	2,33 ± 1,50	1,06 ± 1,34	0,029
	T3	2,17 ± 1,40	0,69 ± 1,08	0,008
1 HEP/ml	T1	3,67 ± 0,99	3,72 ± 0,86	N.S.
	T2	4,50 ± 1,78	2,47 ± 1,73	0,013
	T3	3,25 ± 1,29	1,63 ± 1,71	0,023
10 HEP/ml	T1	6,71 ± 4,32	5,41 ± 1,28	N.S.
	T2	6,38 ± 2,16	4,81 ± 1,83	N.S.
	T3	5,79 ± 1,63	4,47 ± 1,55	N.S.
100 HEP/ml	T1	9,25 ± 5,29	7,50 ± 1,91	N.S.
	T2	7,92 ± 2,0	7,03 ± 2,37	N.S.
	T3	8,25 ± 1,97	6,34 ± 1,90	N.S.

Resultats expressats com a mitjana ± desviació estàndard en mm. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

La comparació intragrup, mostrava que el grup no tractat amb IT no presentava cap modificació de la resposta cutània front l'antigen al llarg de l'estudi, excepte per la concentració de 0,1 HEP/ml, que induïa un augment lleuger de la reacció als 6 mesos respecte a la inicial (p=0,044). En canvi, en el grup de pacients que van rebre IT, s'objectivava una reducció progressiva de la reactivitat cutània per a totes les concentracions de l'extracte de *D pteronyssinus*, que arribava a la significació estadística per a la concentració d'1 HEP/ml als 6 mesos respecte a l'inici (p=0,009) i per a la concentració de 10 HEP/ml, als 6 mesos i a l'any (p=0,002 i p=0,014,

respectivament) (Fig. 33 i Fig. 34).

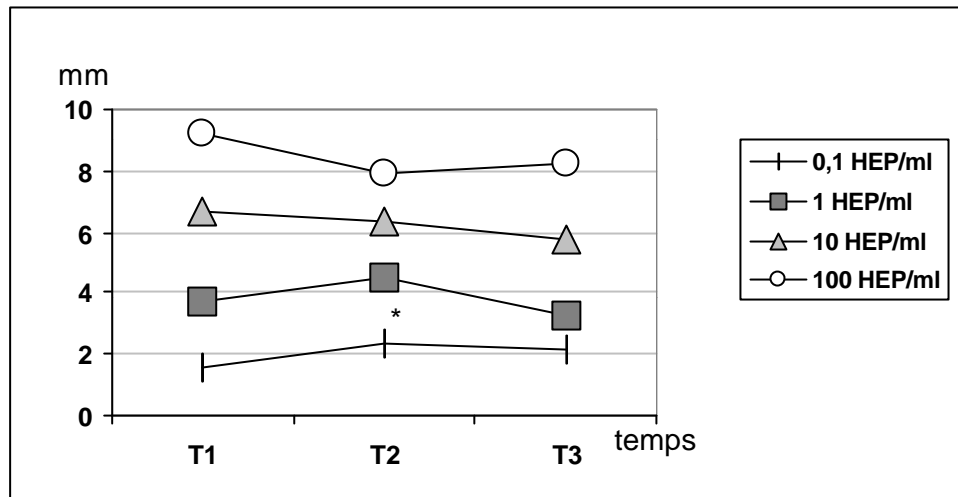


Figura 33. Pacients no tractats amb IT. Resultats de les proves cutànies amb *D pteronyssinus* a diferents concentracions.

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

* p=0,044

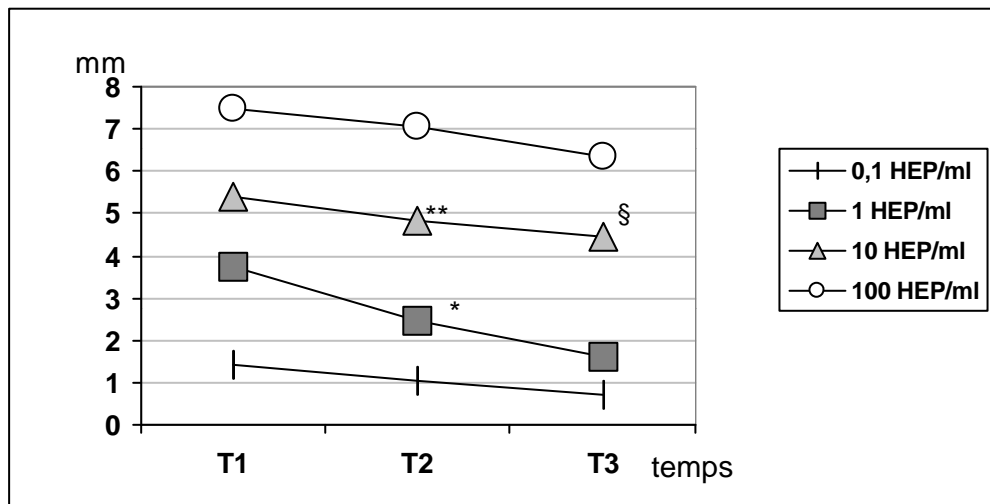


Figura 34. Pacients tractats amb IT. Resultats de les proves cutànies amb *D pteronyssinus* a diferents concentracions.

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

*p=0,044; **p=0,009; § p=0,014

4.2.2 PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL

Els resultats de les proves de provocació conjuntival realitzades en els dos grups de pacients (no tractats o tractats amb IT), es mostren a la Taula 12, on s'expressen el nombre de positivitats per a cada concentració de l'extracte en els tres temps (T1, T2 i T3). Tots els pacients van presentar una prova positiva abans d'arribar a la provocació amb la concentració de 100 HEP/ml.

Taula 12. Nombre de pacients que mostraven positivitat de les proves de provocació conjuntival amb diferents concentracions de *D pteronyssinus* (0,1, 1 i 10 HEP/ml) en el grup de pacients no tractats i en els tractats amb IT

		Sense IT	Amb IT
0,1 HEP/ml	T1	0	0
	T2	2	0
	T3	0	0
1 HEP/ml	T1	9	11
	T2	10	13
	T3	11	8
10 HEP/ml	T1	3	5
	T2	0	3
	T3	1	8

Resultats expressats com a nombre de pacients que varen presentar una prova conjuntival positiva amb aquella concentració. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

La major part dels pacients presentaven una prova de provocació positiva a les concentracions d'1 HEP/ml tant a l'inici com als 6 mesos, no observant-se cap diferència estadísticament significativa entre els pacients no tractats i els tractats amb IT. Quan la provocació conjuntival es va efectuar a l'any de l'inici de l'estudi, es va objectivar que els pacients que havien rebut IT precisaven una major concentració del extracte de *D pteronyssinus* per a induir una resposta positiva ($p=0,039$) (Fig. 35).

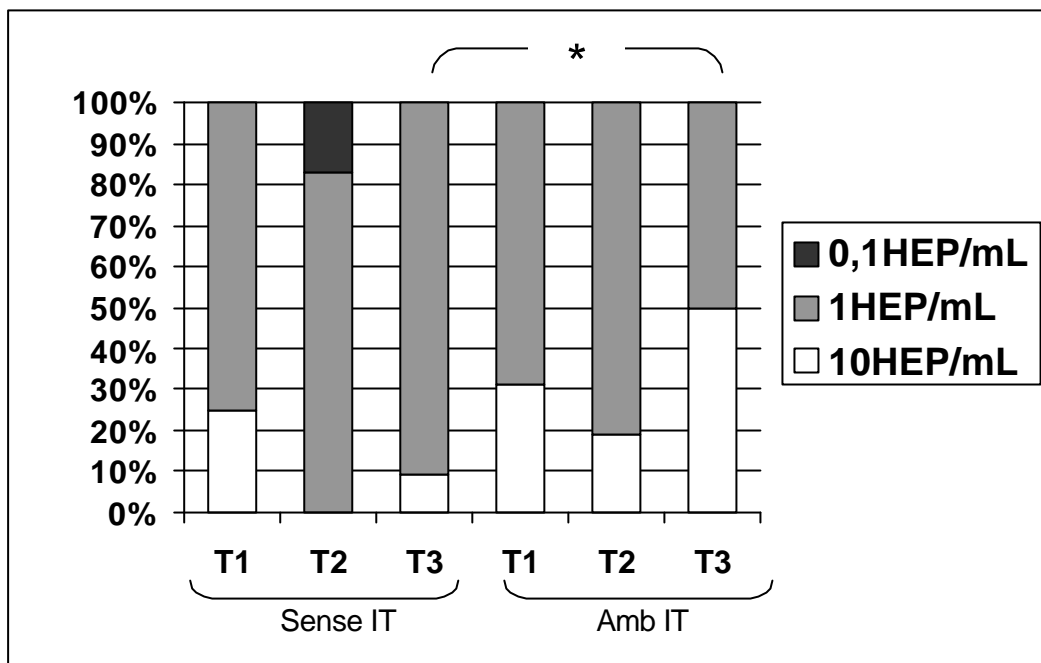


Figura 35. Percentatges de positivitat de les proves de provocació conjuntival a les concentracions de 0,1, 1 i 10 HEP/ml en el grup de pacients no tractats i en els tractats amb IT.

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

* $p=0,039$ quan es compara a T3 el grup sense IT amb el grup amb IT

4.2.3 PROVES DE FUNCIO RESPIRATORIA

Els resultats de les proves de funció respiratòria realitzades al grup de pacients sense IT i al grup de pacients tractats amb IT s'exposen a la Taula 13.

Taula 13. Resultats de les proves de funció respiratòria en el grup no tractat i en el tractat amb IT

		Grup sense IT	Grup amb IT
FVC	T1	95,25 ± 13,12	86,44 ± 12,52
	T2	93,83 ± 9,54	93,31 ± 10,92
	T3	91,92 ± 10,47	90,31 ± 10,84
VEMS	T1	97,58 ± 14,90	86,31 ± 14,83
	T2	95,58 ± 10,88	95,69 ± 9,57
	T3	94,00 ± 13,04	91,13 ± 12,52
MEF	T1	88,75 ± 26,84	73,81 ± 21,02
	T2	88,67 ± 26,18	84,94 ± 19,03
	T3	89,00 ± 28,50	77,44 ± 22,06
VEMS/ FVC%	T1	84,42 ± 6,33	87,00 ± 9,15
	T2	83,75 ± 6,66	87,00 ± 8,81
	T3	87,67 ± 9,49	83,19 ± 8,13
PB	T1	16,67	31,25
	T2	25,00	6,25
	T3	25,00	6,25

Els resultats de FVC, VEMS i MEF, venen expressats com a percentatge del valor teòric. La PB ve expressada com a percentatge de proves broncodilatadores positives sobre el total de realitzades. FVC=capacitat vital forçada; VEMS=volum espirat en el primer segon; MEF=massofluxe 25-75%; VEMS/ FVC%=relació entre VEMS i FVC, expressat com percentatge PB=prova broncodilatadora; T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Quan es va realitzar l'estudi estadístic d'aquests paràmetres, no es va trobar cap diferència significativa entre el grup de pacients que no varen ser tractats amb IT i els que van ser tractats amb IT en cap dels períodes de l'estudi.

En el grup no tractat, no es va observar cap modificació en les proves de funció respiratòria, mentre que en el grup tractat amb IT, hi havia una milloria dels paràmetres FVC, VEMS i MEF, que era estadísticament significativa respecte a l'inici en els resultats obtinguts als sis mesos (p=0,022, p=0,007 i p=0,021, respectivament) (Fig. 36 i Fig. 37).

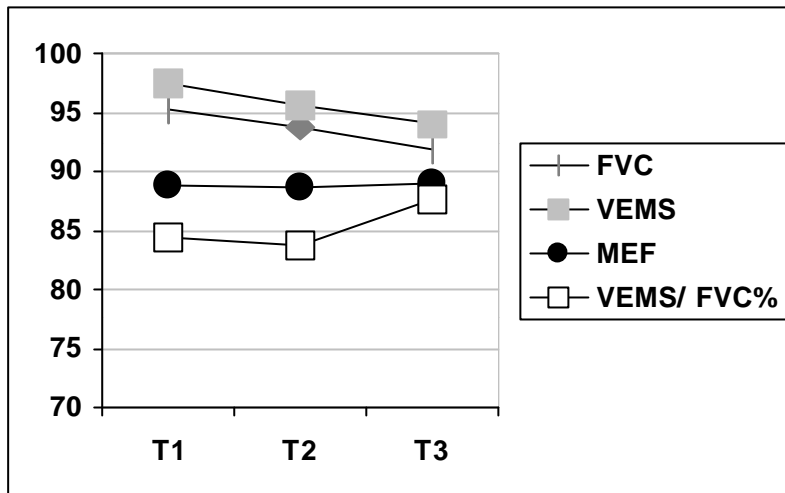


Figura 36. Pacients no tractats amb IT: resultat de les proves de funció respiratòria.

Els resultats de FVC, VEMS i MEF, venen expressats com a percentatge del valor teòric. FVC=capacitat vital forçada; VEMS=volum espirat en el primer segon; MEF=messofluxe 25-75%; VEMS/ FVC%=relació entre VEMS i FVC, expressat com percentatge; T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

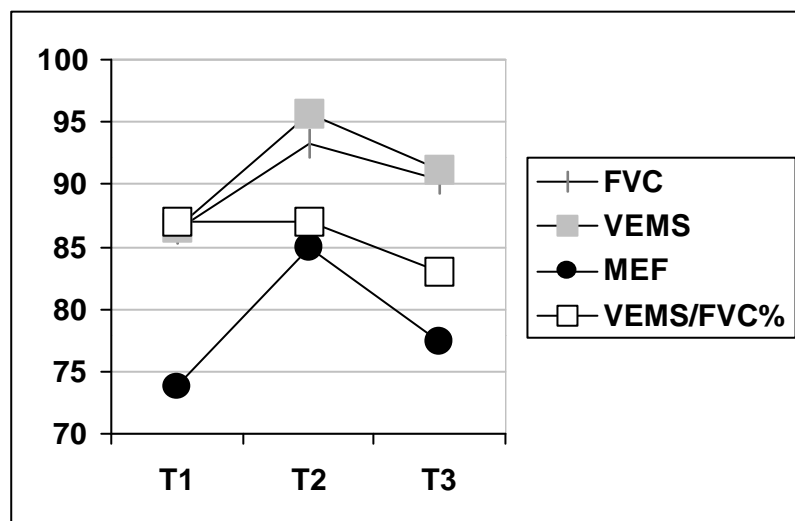


Figura 37. Pacients tractats amb IT: resultat de les proves de funció respiratòria.

Els resultats de FVC, VEMS i MEF, venen expressats com a percentatge del valor teòric. FVC=capacitat vital forçada; VEMS=volum espirat en el primer segon; MEF=messofluxe 25-75%; VEMS/FVC%=relació entre VEMS i FVC, expressat com percentatge; T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.2.4 SÍMPTOMES CLÍNICS

Els símptomes clínics que presentaven els pacients es van mesurar mitjançant una escala d'autoavaluació en els tres controls que es van efectuar (a l'inici, als 6 mesos i a l'any d'iniciar l'estudi). A la Taula 14 s'exposen els resultats del grup de pacients no tractats i dels tractats amb IT.

Taula 14. Puntuació de símptomes presentats pels pacients

	Grup sense IT	Grup amb IT	p
T1	9,48 ± 4,79	10,08 ± 8,01	0,945
T2	10,64 ± 5,46	9,64 ± 8,14	0,133
T3	11,25 ± 7,45	6,67 ± 5,32	0,068

La puntuació dels símptomes està expressada com mitjana ± desviació estàndard. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Quan es comparaven els dos grups (el no tractat i el tractat amb IT), no s'observaven diferències, excepte en el control de l'any (T3), on els símptomes eren menors en el grup tractat amb IT encara que no s'arribava a la significació estadística ($p=0,068$).

L'avaluació durant el temps de duració de l'estudi dels símptomes que presentava el grup no tractat amb IT no va mostrar modificacions. En canvi, en el grup tractat amb IT s'observava que a l'any, comparat amb l'inici, hi havia una reducció significativa dels símptomes ($p=0,014$) (Fig. 38)

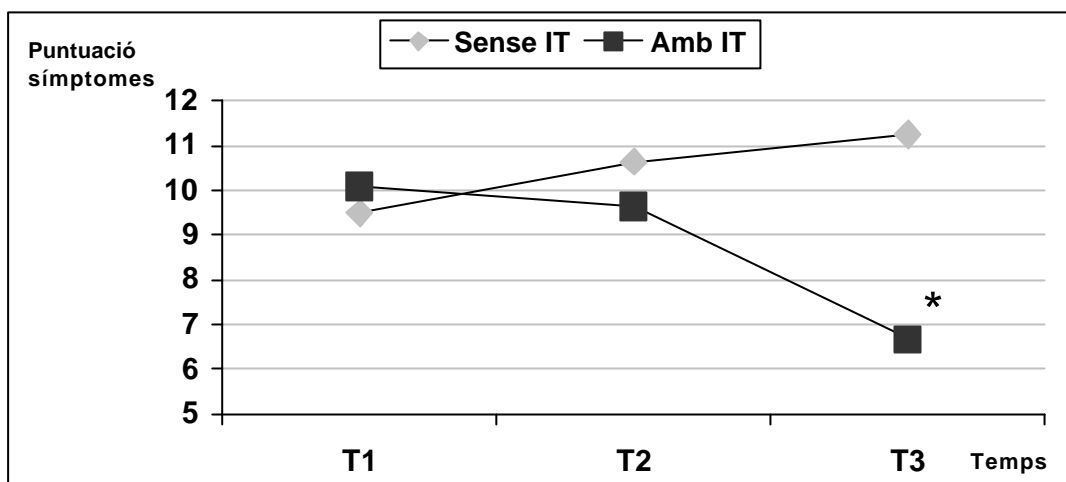


Figura 38. Síntomes presentats pels pacients

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

*p=0,014, comparant T3 amb T1

4.2.5 ÚS DE MEDICACIÓ

L'ús de medicació es va avaluar a l'inici, als 6 mesos i a l'any d'iniciar-se l'estudi, en funció a una escala de puntuació atribuïda a cad a possible tipus de medicació (Annex), calculant-se la mitjana setmanal d'us.

No es va objectivar cap diferència entre el grup de pacients no tractats amb IT i aquells que si van rebre IT, en cap dels tres moments de l'estudi, encara que hi havia una tendència a la disminució en l'ús de medicació en el grup tractat amb IT respecte als no tractats (Taula 15).

Taula 15. Ús de medicació

	Grup sense IT	Grup amb IT
T1	2,39 ± 1,22	3,12 ± 2,56
T2	2,39 ± 1,38	2,75 ± 2,81
T3	2,52 ± 1,90	1,83 ± 1,56

La puntuació dels símptomes està expressada com mitjana ± desviació estàndard. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

L'estudi longitudinal va mostrar que en el grup no tractat amb IT no es modificava l'ús de medicació mentre que en el grup tractat amb IT s'observava una disminució en l'ús de medicació, que arribava a la significació estadística quan es comparava la puntuació a l'any amb la de l'inici de l'estudi ($p=0,006$) (Fig. 39).

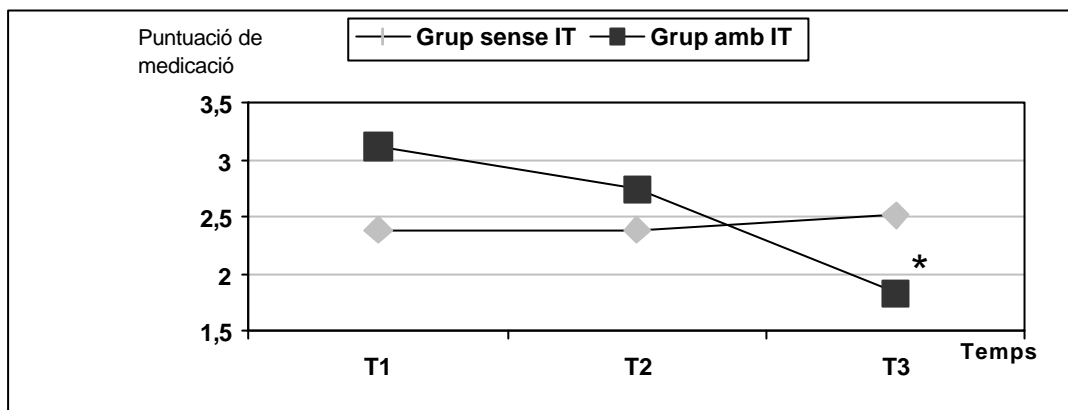


Figura 39. Ús de medicació pels pacients

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

* $p=0,006$ comparant T3 amb T1 en el grup amb IT

4.3 ESTUDIS “IN VITRO”

4.3.1 CONCENTRACIÓ SÈRICA D’IgE TOTAL I IgE ESPECÍFICA EN ELS PACIENTS NO TRACTATS I EN ELS TRACTATS AMB IT

Tant en el grup no tractat com en el grup tractat amb IT, es van estudiar els nivells sèrics d’IgE total i d’IgE específica abans d’iniciar l’estudi, als 6 i als 12 mesos. Els resultats d’aquestes determinacions s’exposen a la Taula 16.

A l’anàlisi estadística no es van trobar diferències en els valors d’IgE total i específica en cap moment de l’estudi entre els pacients no tractats amb IT i els que si la van rebre.

Taula 16. Valors d’IgE total i IgE específica per *D pteronyssinus*

		Grup sense IT	Grup amb IT
IgE total (kU/l)	T1	561,67 ± 550,75	361,38 ± 389,39
	T2	504,33 ± 488,58	526,56 ± 587,65
	T3	406,25 ± 303,67	477,56 ± 553,76
IgE específica per <i>D pteronyssinus</i> (kU/l)	T1	62,75 ± 32,71	56,50 ± 32,33
	T2	57,17 ± 33,74	62,13 ± 34,76
	T3	50,25 ± 37,61	63,63 ± 35,23

T1=inici de l’estudi; T2=als 6 mesos; T3=als 12 mesos

L’estudi de les variacions dintre de cada grup va mostrar que al cap de mig any de tractament amb IT es constatava un augment significatiu de la IgE total ($p=0,044$), que tornava a disminuir a l’any encara que es mantenia per sobre dels valors inicials (Fig. 40). Aquesta tendència no es va objectivar per la IgE específica.

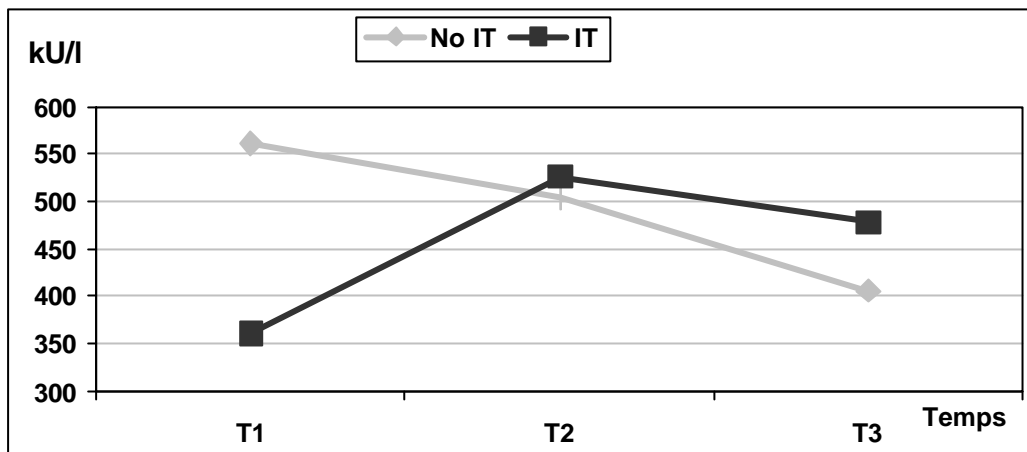


Figura 40. Valors d'IgE sèrica total en els dos grups de pacients al·lèrgics.

4.3.2 EOSINOFILIA PERIFÈRICA

La determinació dels eosinòfils en sang practicada a l'inici, 6 mesos i 12 mesos de l'estudi, no va mostrar diferència entre els dos grups de pacients (no tractats i tractats amb IT) (Taula 17).

Taula 17 . Eosinofilia sanguínia en el grup de pacients no tractats i en els tractats amb IT al llarg de l'estudi

	Grup sense IT	Grup amb IT
T1	466,58 ± 243,64	370,19 ± 249,83
T2	344,17 ± 166,97	291,63 ± 215,09
T3	362,92 ± 157,13	359,38 ± 236,05

Eosinofilia expressada en eosinòfils /mm³, mitjana ± desviació estàndard

En el grup no tractat amb IT es va trobar una disminució dels eosinòfils a la segona extracció sanguínia (als sis mesos) que era estadísticament significativa (p=0,032), mentre que en el grup tractat la disminució no era significativa. En els dos grups hi

havia una tendència a recuperar parcialment els valors d'eosinofilia inicials.

4.3.3 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CD23 I CD86 EN CÈL·LULES PRESENTADORES DE L'ANTIGEN

L'expressió del receptor de baixa afinitat per la IgE (CD23) i del CD86 (B7.2) es va estudiar en els limfòcits B (cèl·lules CD20+) i en els monòcits (cèl·lules CD14+) en els pacients al·lèrgics, tant els tractats com els no tractats amb IT, i en els individus sans.

4.3.3.1 ESTUDI EN PACIENTS ATÒPICS I INDIVIDUS SANS

L'anàlisi de l'expressió de CD86 a la superfície dels monòcits va demostrar que el 100% d'aquestes cèl·lules expressaven aquesta molècula, mentre que la seva expressió a la superfície cel·lular dels limfòcits B era del $6,3 \pm 2,71\%$ en individus no atòpics i $6 \pm 2,29\%$ en individus atòpics (Taula 18).

El percentatge de limfòcits B i monòcits que expressen CD23 es mostra a la Taula 18.

Taula 18. Percentatge de limfòcits B i monòcits que expressen CD23 i CD86

	No atòpics	Atòpics	p
% de limfòcits B que expressen CD23	45,40 \pm 11,52	46,29 \pm 13,07	0,856
% de monòcits que expressen CD23	5,00 \pm 2,67	8,76 \pm 4,53	0,022
% de limfòcits B que expressen CD86	6,30 \pm 2,71	6,00 \pm 2,29	0,761

Els resultats venen expressats com mitjana \pm desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per aquella molècula de superfície

El grup de pacients atòpics presentava un percentatge més elevat de monòcits que expressaven CD23 que els individus no atòpics ($p=0,022$) (Fig. 41). En canvi, en els limfòcits B no es va apreciar diferència en l'expressió de CD23, ni tampoc en l'expressió de CD86 (Fig. 41).

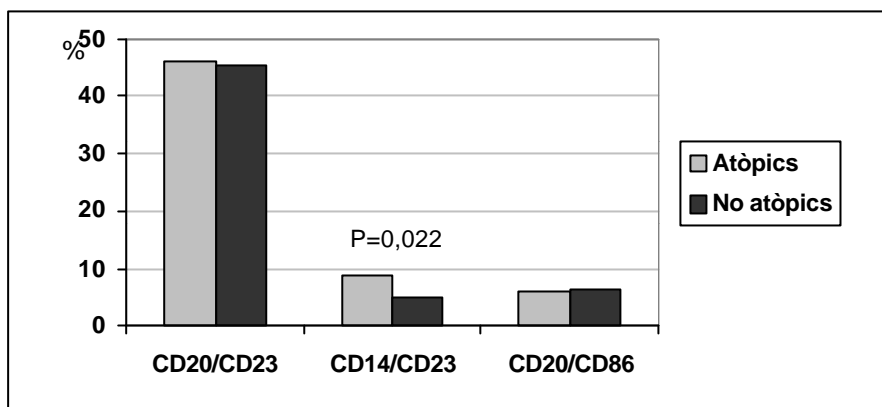


Figura 41. Expressió de CD23 i de CD86 en limfòcits B i monòcits en individus atòpics i no atòpics

4.3.3.2 ESTUDI EN EL GRUP DE PACIENTS AL·LÈRGICS NO TRACTATS AMB IT I EN EL GRUP DE PACIENTS TRACTATS AMB IT

A la Taula 19 es mostren els resultats de l'estudi de la expressió de CD23 i CD86 en limfòcits B i monòcits en cadascuna de les tres fases de l'estudi en els individus al·lèrgics segons si rebien o no rebien IT. L'expressió de CD86 en els monòcits oscil·lava entre el 99-100% en tots els casos.

Taula 19. Percentatge de limfòcits B i monòcits que expressen CD23 i CD86 en els individus al·lèrgics en funció del grup

		Grup sense IT	Grup amb IT
% limfòcits B CD23+	T1	51,50 ± 15,27	41,82 ± 10,76
	T2	57,63 ± 8,85	58,91 ± 16,31
	T3	56,88 ± 9,82	58,55 ± 15,33
% monòcits CD23+	T1	9,75 ± 4,37	8,00 ± 4,94
	T2	9,75 ± 5,20	5,00 ± 2,76
	T3	10,00 ± 3,74	5,63 ± 3,80
% limfòcits B CD86+	T1	6,57 ± 2,37	5,78 ± 2,33
	T2	6,43 ± 1,90	4,78 ± 2,59
	T3	6,57 ± 1,90	4,33 ± 2,35

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per aquella molècula de superfície. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

No es van trobar diferències significatives en l'expressió de CD23 en limfòcits B entre el grup tractat amb IT i el no tractat amb IT, en cap de les tres determinacions.

En quant a l'expressió de CD23 en els monòcits es va observar que si bé a l'inici de l'estudi era similar en tots els pacients, al cap de sis mesos (T2) i al cap d'un any (T3) hi havia menor expressió de CD23 en els monòcits dels pacients tractats amb IT ($p=0,019$ i $p=0,024$, respectivament). També en els limfòcits B es va objectivar una menor expressió de CD86 al cap d'un any de tractament amb IT comparat amb els pacients sense IT ($p=0,06$) (Fig. 42).

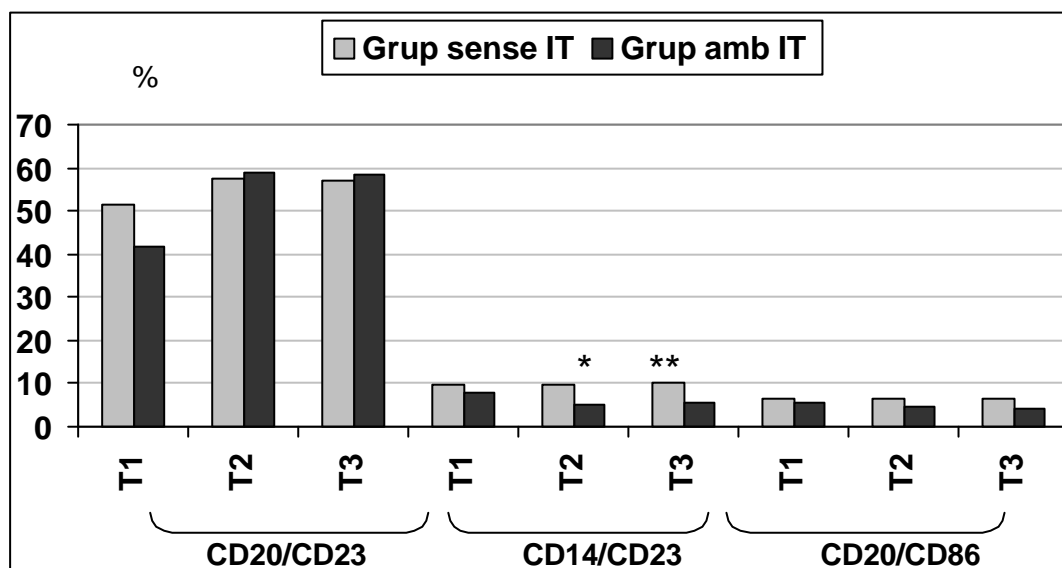


Figura 42. Percentatge de limfòcits B i monòcits que expressen CD23 i CD86

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.
* $p=0,019$; ** $p=0,024$

En canvi, quan es feia l'anàlisi intragrup al llarg de l'estudi es va trobar que el grup tractat amb IT va mostrar un augment en l'expressió de CD23 en els limfòcits B als sis mesos i a l'any quan es comparava amb els resultats de l'inici (sis mesos $p=0,024$; un any $p=0,024$).

En els pacients que van rebre IT es va trobar una correlació negativa entre l'expressió de CD23 i CD86 en els limfòcits B ($r=-0.478$, $p=0.012$).

4.3.4 ESTIMULACIÓ LIMFOCITÀRIA AMB PMA I IONOMICINA I DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS

4.3.4.1 *ESTUDI EN PACIENTS ATÒPICS I INDIVIDUS SANS*

Els limfòcits dels pacients atòpics i dels individus sans van ser estimulats de manera inespecífica amb PMA i Ionomicina, i es va efectuar la detecció de citocines intracel·lulars en els limfòcits T. El percentatge d'activació, mesurat com percentatge de cèl·lules CD3+ que expressaven CD69, així com el percentatge de cèl·lules CD3+ (limfòcits T), i de les subpoblacions CD3+/CD8+ i CD3+/CD8- (presumiblement corresponent als CD3+/CD4+), en que es va detectar IL-4, IFN- γ i IL-10 es reflecteix a la Taula 20.

Els resultats van mostrar que els individus no atòpics mostraven una major activació inespecífica dels limfòcits T ($p<0,001$) (major percentatge de limfòcits T que expressaven CD69) (Taula 20 i Fig. 43), respecte als atòpics.

Taula 20. Percentatge de cèl·lules T que expressaven CD69, IL-4, IFN- γ i IL-10

Citocina	Població cel·lular	Atòpics	No atòpics
CD69	CD3	85,13 \pm 11,09*	95,90 \pm 2,56*
	CD4	4,17 \pm 2,21	5,79 \pm 2,08
IL-4	CD3	4,75 \pm 2,59	6,60 \pm 2,51
	CD4	2,41 \pm 1,86	3,64 \pm 2,14
	CD8	18,20 \pm 8,20	22,28 \pm 8,05
IFN-γ	CD3	14,43 \pm 7,20	18,05 \pm 6,25
	CD4	28,89 \pm 16,65	36,24 \pm 14,76
	CD8	16,56 \pm 12,32	13,03 \pm 5,45
IL-10	CD3	17,77 \pm 12,87	14,75 \pm 5,97
	CD4	13,51 \pm 12,02	8,88 \pm 4,15
	CD8		

Els resultats venen expressats com mitjana \pm desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per aquell AcMo. * $p < 0,001$

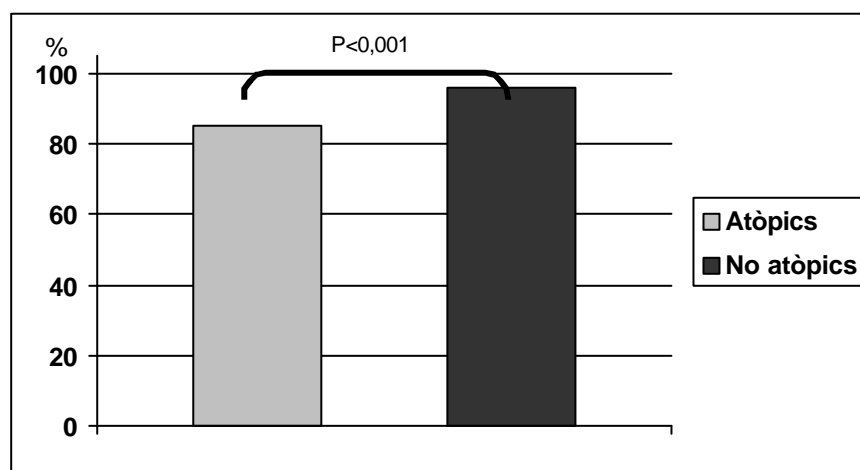


Figura 43. Percentatge de limfòcits T que expressen CD69 en els grups de pacients atòpics i d'individus no atòpics

Els individus no atòpics també presentaven un major percentatge de cèl·lules T que produïen IL-4 i IFN- γ (tant a expenses de cèl·lules CD4 com CD8), si bé aquesta diferència no arribava a la significació estadística. Pel contra, el percentatge de cèl·lules T que produïen IL-10 era major en els atòpics (Taula 19 i Fig. 44)

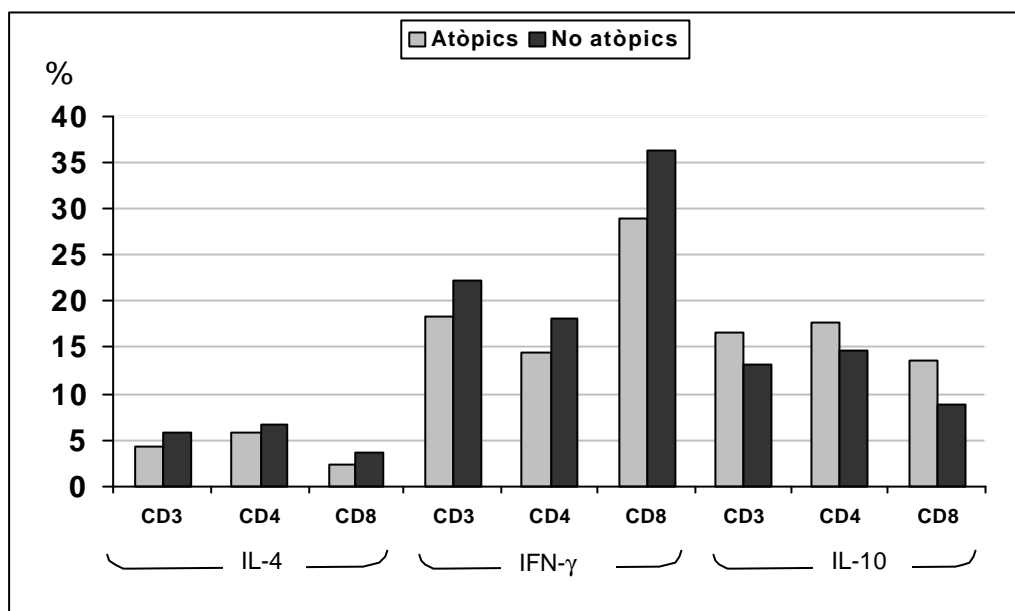


Figura 44. Percentatge de limfòcits T que expressaven IL-4, IFN- γ i IL-10 en individus atòpics i no atòpics

Per analitzar la relació entre l'expressió d'aquestes citocines, es van establir uns índex entre IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10. Els resultats del càlcul d'aquests índex s'especifiquen en la Taula 21.

Taula 21. Índex IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10

Índex	Població cel·lular	Atòpics	No atòpics
IL-4/IFN- γ	CD3	0,39	0,28
	CD4	0,81	0,42
	CD8	0,15	0,11
IL-10/IFN- γ	CD3	2,02	0,75
	CD4	3,53	1,11
	CD8	1,61	0,31
IL-4/IL-10	CD3	0,48	0,54
	CD4	0,53	0,53
	CD4	0,32	0,57

En l'anàlisi dels resultats d'aquestes relacions, s'observa en els individus atòpics un major índex IL-4/IFN- γ i també un índex IL-10/ IFN- γ més elevat, encara que sense arribar a la significació estadística (Fig. 45).

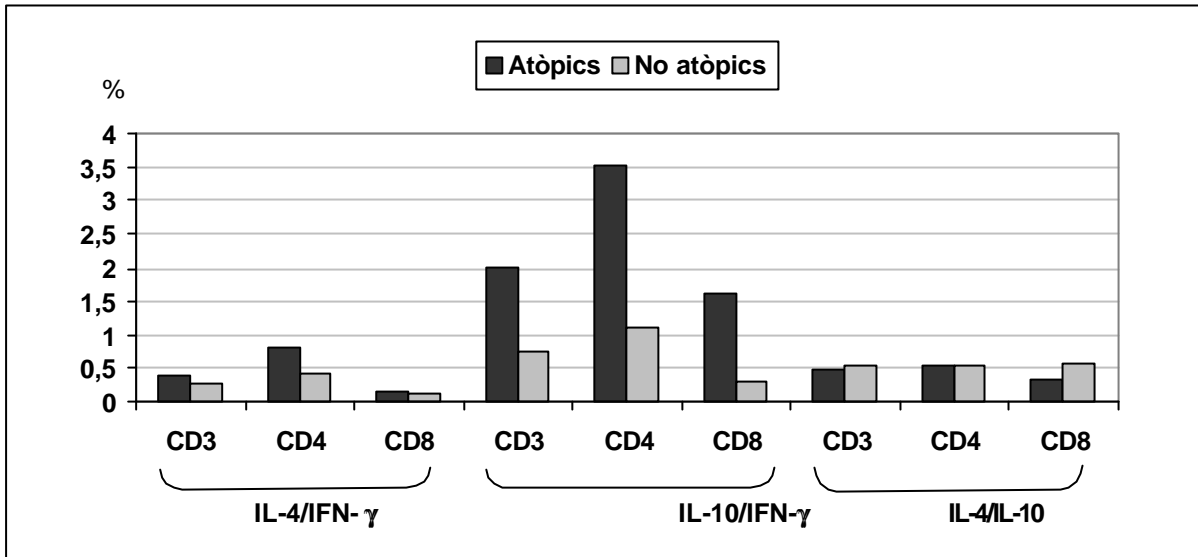


Figura 45. Índex IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10 en el grup de pacients atòpics i individus no atòpics.

4.3.4.2 ESTUDI EN EL GRUP DE PACIENTS AL·LÈRGICS NO TRACTATS AMB IT I EN EL GRUP DE PACIENTS TRACTATS AMB IT

4.3.4.2.1 Expressió de CD69

L'estimulació limfocitària valorada segons el percentatge de cèl·lules CD3 que expressaven de CD69 en el grup de pacients no tractats i en els que posteriorment van ser tractats amb IT queda reflectida en els resultats de la Taula 22.

Taula 22. Percentatge de cèl·lules T que expressaven CD69

Temps	Grup sense IT	Grup amb IT
T1	84,64 ± 10,69	85,54 ± 11,84
T2	89,91 ± 5,65	90,00 ± 5,97
T3	88,27 ± 7,43	93,43 ± 3,48*

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules CD3 positives per CD69. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi. *p=0,053

Mentre que en la primera (abans del tractament) i en la segona determinació la expressió de CD69 en els limfòcits T era igual per tots dos grups, al cap d'un any (T3) hi havia una diferència que quasi arribava a la significació estadística (p=0,053), mostrant el grup tractat amb IT una major activació respecte al no tractat. (Fig. 46).

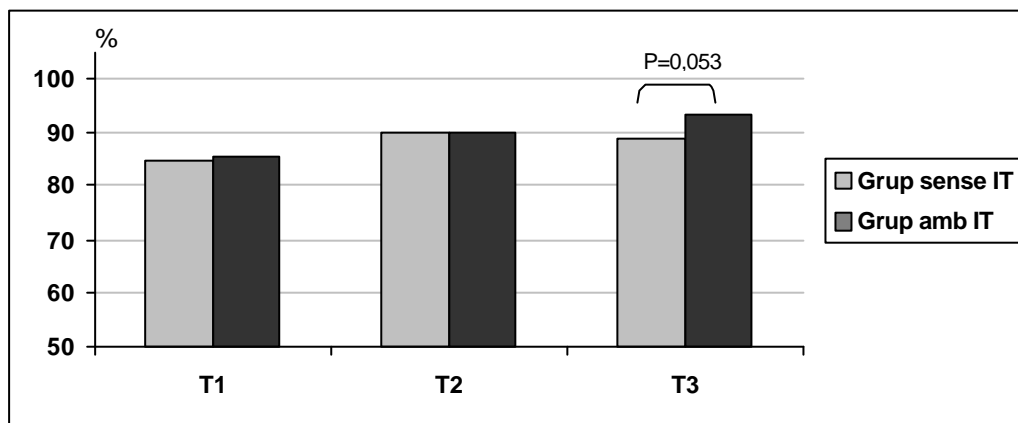


Figura 46. Percentatge de limfòcits T que expressen CD69 en el grup de pacients no tractat amb IT i en el tractat amb IT

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Quan es valorava l'evolució intragrup en el grup no tractat amb IT no hi havia canvis durant l'estudi, mentre que en el grup tractat amb IT s'observava una major activació dels limfòcits T (augment del percentatge de limfòcits T CD69+) tant als 6 com als 12 mesos de tractament respecte a l'inici (p=0,008 i p=0,002,

respectivament).

A l'inici de l'estudi el grup que seria tractat amb IT presentava una menor expressió de CD69 que els pacients no atòpics ($85,54 \pm 11,84$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p=0,003$). Després d'un any de IT, els dos valors s'igualaven ($93,43 \pm 3,48$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p=0,056$). En canvi, la diferència que havia entre el grup que no rebria IT i els no al·lèrgics ($84,64 \pm 10,69$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p=0,002$) no desapareixia a l'any de seguiment ($88,27 \pm 7,43$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p=0,002$).

Es va trobar una correlació negativa entre l'expressió de CD69 i la puntuació de símptomes de forma global en tots els pacients al·lèrgics (tant si corresponien al grup amb IT com al grup sense IT ($r=-0.365$, $p=0.002$). En el grup que va rebre IT es mantenia aquesta correlació ($r=-0.650$, $p<0.001$).

Es va trobar una correlació positiva entre l'expressió de CD23 en limfòcits B i l'activació dels limfòcits T segons l'expressió de CD69 ($r=0.261$, $p=0.039$).

4.3.4.2.2 Expressió d'IL-4, IFN- γ i IL-10.

La detecció intracel·lular d'aquestes citocines que es va efectuar al llarg de l'estudi, va mostrar els següents resultats.

L'expressió d'IL-4 pels limfòcits T de forma global, i per les subpoblacions de cèl·lules CD4 i CD8 va ser similar pel grup no tractat i el grup tractat amb IT en tots els períodes de l'estudi (Taula 23 i Fig. 47). L'anàlisi de cada grup per separat per veure l'evolució temporal durant l'estudi, tampoc va mostrar cap diferència significativa entre l'inici i les determinacions posteriors.

Taula 23. Percentatge de limfòcits T que expressen IL-4 en el grup de pacients no tractat amb IT i en el grup tractat amb IT a l'inici i durant l'estudi.

Població cel·lular	Temps	Grup sense IT	Grup amb IT
CD3	T1	3,81 ± 1,34	4,47 ± 2,77
	T2	4,44 ± 1,78	4,13 ± 2,18
	T3	4,46 ± 1,92	4,27 ± 2,45
CD4	T1	3,95 ± 1,56	5,43 ± 3,12
	T2	4,58 ± 2,50	4,80 ± 2,63
	T3	4,99 ± 2,47	5,12 ± 2,92
CD8	T1	2,63 ± 2,13	2,22 ± 1,68
	T2	3,30 ± 1,93	2,40 ± 1,70
	T3	3,15 ± 1,47	2,52 ± 1,77

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per aquell AcMo. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

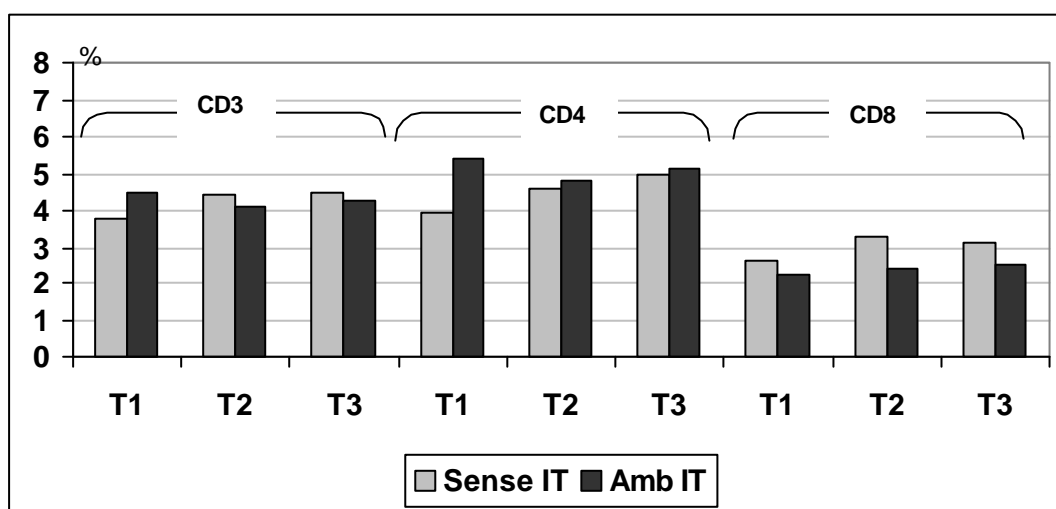


Figura 47. Percentatge de limfòcits que expressen IL-4 en el grup de pacients no tractat amb IT i en el grup tractat amb IT a l'inici i durant l'estudi

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

L'estudi de l'expressió de l'IFN- γ per les cèl·lules T (CD3+), i per les subpoblacions CD4+ i CD8+ va mostrar que no hi havia diferència entre el grup no tractat i el tractat amb IT en cap moment de l'estudi (Taula 24 i Fig. 48).

En el conjunt dels pacients atòpics, es va trobar una correlació positiva entre l'expressió de IL-4 i IFN- γ en els limfòcits T ($r=0.316$, $p=0.009$).

Si s'avaluava l'evolució durant el temps de cada grup per separat, no es trobava cap canvi en el grup no tractat amb IT. En el grup tractat amb IT, quan es comparava l'expressió d'IFN- γ pels limfòcits CD4 als 12 mesos amb l'inici s'observava un increment que quasi arribava a la significació estadística ($p=0,055$).

Taula 24. Percentatge de limfòcits que expressen IFN- γ en el grup de pacients no tractat amb IT i en el grup tractat amb IT a l'inici i durant l'estudi

Població cel·lular	Temps	Grup sense IT	Grup amb IT
CD3	T1	19,69 \pm 8,55	16,69 \pm 8,55
	T2	21,93 \pm 7,25	18,70 \pm 10,05
	T3	20,86 \pm 8,03	19,50 \pm 11,84
CD4	T1	16,82 \pm 7,05	12,40 \pm 6,95
	T2	19,13 \pm 6,63	17,72 \pm 12,95
	T3	17,77 \pm 7,16	18,52 \pm 14,37
CD8	T1	34,83 \pm 18,69	23,87 \pm 13,45
	T2	32,81 \pm 15,20	28,19 \pm 16,12
	T3	30,65 \pm 14,84	25,15 \pm 15,44

Els resultats venen expressats com mitjana \pm desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per aquell AcMo. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

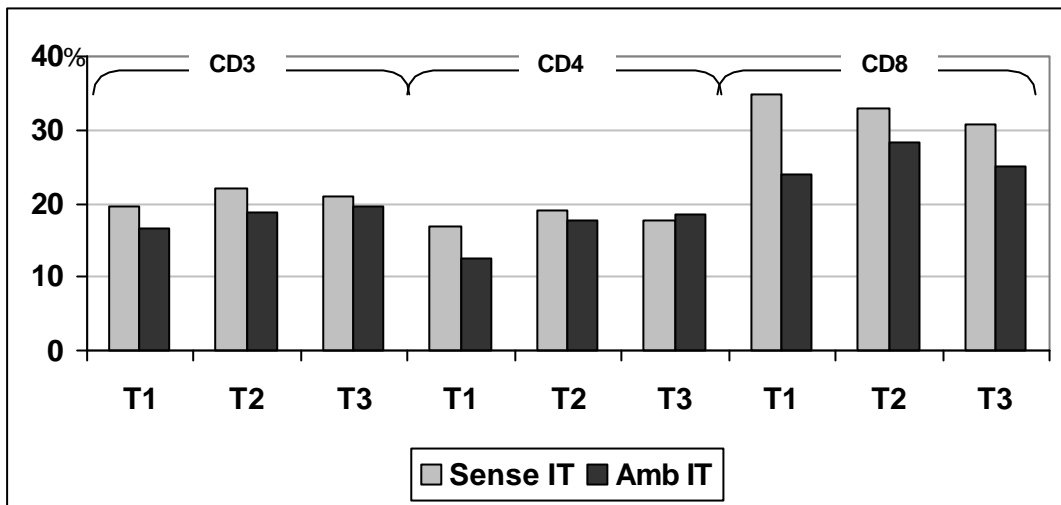


Figura 48. Percentatge de limfòcits que expressen IFN- γ en el grup de pacients no tractat amb IT i en el grup tractat amb IT a l'inici i durant l'estudi T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

El percentatge de limfòcits que expressaven IL-10 en el grup no tractat i el grup tractat amb IT, es mostra a la Taula 25. L'anàlisi estadística de l'expressió d'IL-10 no va demostrar cap diferència significativa entre els dos grups en cap dels controls (Fig. 49), ni quan es va avaluar longitudinalment intragrup durant l'estudi.

Taula 25. Percentatge de limfòcits que expressen IL-10 en el grup de pacients no tractat amb IT i en el grup tractat amb IT a l'inici i durant l'estudi

Població cel·lular	Temps	Grup sense IT	Grup amb IT
CD3	T1	16,61 ± 17,24	16,53 ± 7,85
	T2	15,33 ± 8,49	16,00 ± 8,77
	T3	16,74 ± 10,78	15,45 ± 8,42
CD4	T1	18,10 ± 18,39	17,51 ± 7,51
	T2	16,74 ± 9,04	18,75 ± 9,91
	T3	18,25 ± 11,14	16,15 ± 7,14
CD8	T1	13,30 ± 18,39	13,68 ± 9,67
	T2	11,16 ± 7,98	10,38 ± 5,43
	T3	11,77 ± 10,75	12,99 ± 12,73

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per aquell AcMo. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

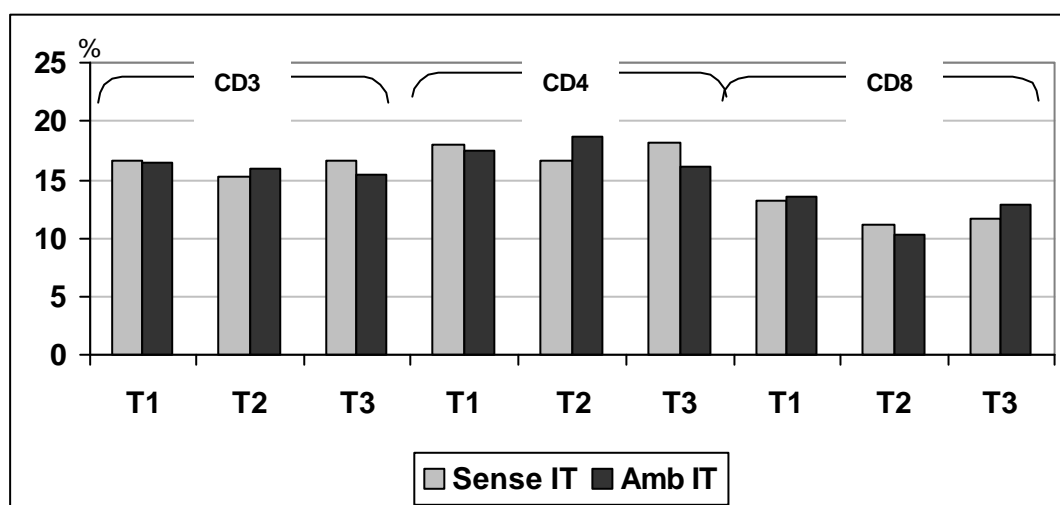


Figura 49. Percentatge de limfòcits que expressen IL-10 en el grup de pacients no tractat amb IT i en el grup tractat amb IT a l'inici i durant l'estudi

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Per poder estudiar la relació entre la producció de les diferents citocines, es van

establir els següents índex: IL-4/IFN- γ , IL-10/ IFN- γ i IL-4/IL-10. Aquests índex venen exposats a la Taula 26.

Taula 26. Índex IL-4/IFN- γ , IL-10/ IFN- γ i IL-4/IL-10 en el grup de pacients no tractats i en els tractats amb IT

Índex	Població cel·lular	Temps	Grup sense IT	Grup amb IT
IL-4/IFN- γ	CD3	T1	0,23	0,52
		T2	0,21	0,45
		T3	0,23	0,38
	CD4	T1	0,29	0,70
		T2	0,24	0,45
		T3	0,30	0,46
	CD8	T1	0,10	0,20
		T2	0,13	0,48
		T3	0,13	0,28
IL-10/ IFN- γ	CD3	T1	1,47	2,44
		T2	0,84	1,72
		T3	1,05	2,30
	CD4	T1	1,73	2,88
		T2	0,98	1,94
		T3	1,30	2,30
	CD8	T1	1,12	1,99
		T2	0,62	1,82
		T3	0,81	2,24
IL-4/IL-10	CD3	T1	0,53	0,45
		T2	0,42	0,54
		T3	0,38	0,64
	CD4	T1	0,57	0,50
		T2	0,45	0,56
		T3	0,37	0,72
	CD8	T1	0,36	0,29
		T2	0,35	0,41
		T3	0,53	0,44

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Quan s'analitza la relació IL-4/IFN- γ expressada pels limfòcits CD3+, s'observa que en el grup tractat amb IT hi havia una disminució al llarg de l'estudi, encara que

aquest descens no arribava a la significació estadística (Fig. 50). Aquesta relació no variava en el grup no tractat amb IT.

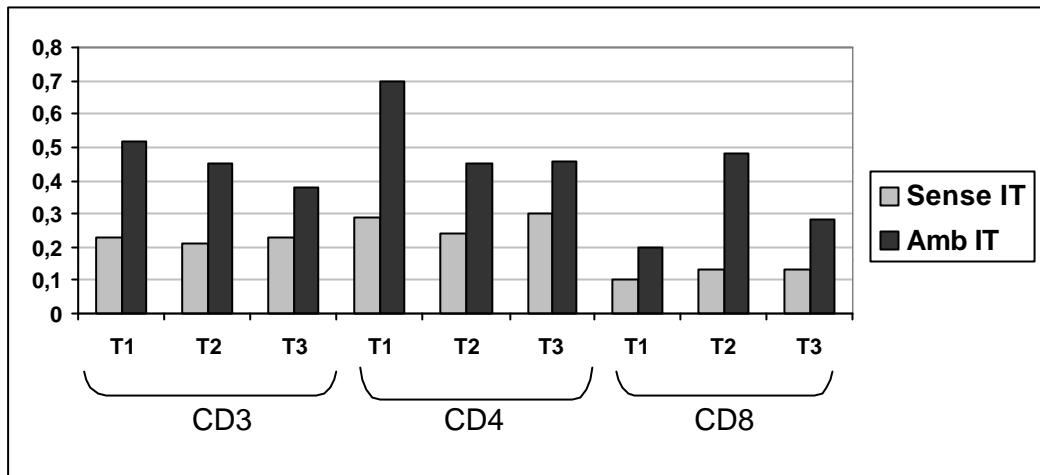


Figura 50. Índex IL-4/IFN-γ expressat pels limfòcits T

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

No es va observar cap canvi en l'índex IL-10/IFN-γ durant el temps de l'estudi en cap dels dos grups (Fig. 51).

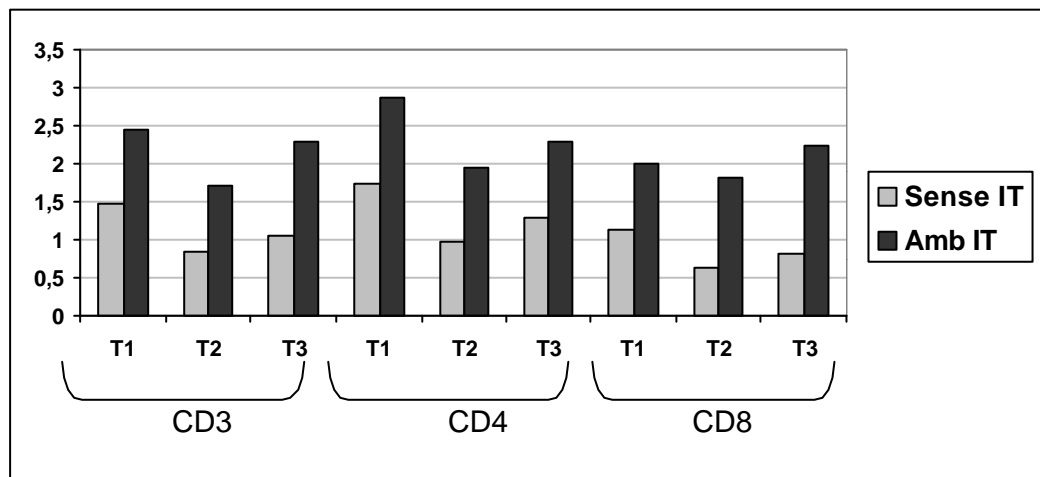


Figura 51. Índex IL-10/IFN-γ expressat pels limfòcits T

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

En canvi, mentre el grup que no rebia IT mostrava una disminució de la relació IL-4/IL-10 per part dels limfòcits T a expenses dels CD4+, el grup tractat amb IT mostrava un increment d'aquesta relació en els limfòcits T totals, i en les

sub poblacions CD4+ i CD8+. Aquestes variacions en els índex no arribaven a la significació estadística (Fig. 52).

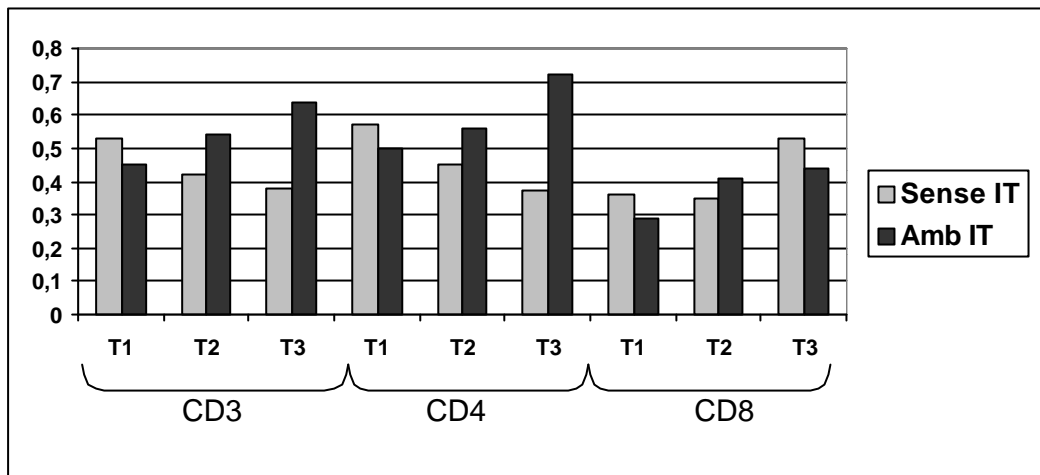


Figura 52. Índex IL-4/IL-10 expressat pels limfòcits T

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.3.4.3 CULTIUS CEL·LULARS

4.3.4.3.1 Assajos de proliferació limfocitària

En tots els pacients es van realitzar cultius limfocitaris, analitzant-ne l'estimulació induïda pel *D pteronyssinus* a l'inici, 6 i 12 mesos de l'estudi. Tots els cultius de CMN de pacients al·lèrgics amb *D pteronyssinus* van presentar proliferació. La mitjana de comptes obtinguts tant en les cèl·lules no estimulades com en les estimulades es mostra a la Taula 27. L'anàlisi estadística no va mostrar diferències estadísticament significatives quan es comparaven els dos grups o bé quan s'analitzava l'evolució de comptes al llarg de l'estudi.

Taula 27. Proliferació limfocitària en els cultius control i estimulats amb *D pteronyssinus* segons si els pacients van rebre IT o no

Temps	Sense IT		Amb IT	
	Control	D pteronyssinus	Control	D pteronyssinus
T1	7112 ± 4023	23365 ± 11721	5024 ± 4568	22872 ± 16474
T2	6178 ± 5629	21277 ± 12430	5567 ± 3353	22918 ± 21261
T3	6412 ± 3160	19608 ± 8013	7369 ± 5772	24140 ± 21532

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard de comptes per minut. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

En el grup de pacients que no van rebre IT l'índex de proliferació establert entre cèl·lules estimulades respecte a no estimulades no es va modificar (Taula 28). En canvi sí que hi havia una disminució d'aquest índex en el grup que rebia IT ja al mig any, i arribava a ser estadísticament significativa després d'un any ($p=0,026$) (Taula i Fig. 53).

Taula 28. Índex de proliferació induïda pel *D pteronyssinus*

Temps	Sense IT	Amb IT
T1	4,09 ± 2,75	6,04 ± 3,94
T2	5,70 ± 5,14	3,94 ± 1,86
T3	5,02 ± 5,60	3,69 ± 1,96*

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

* $p=0,026$ comparant T3 amb T1

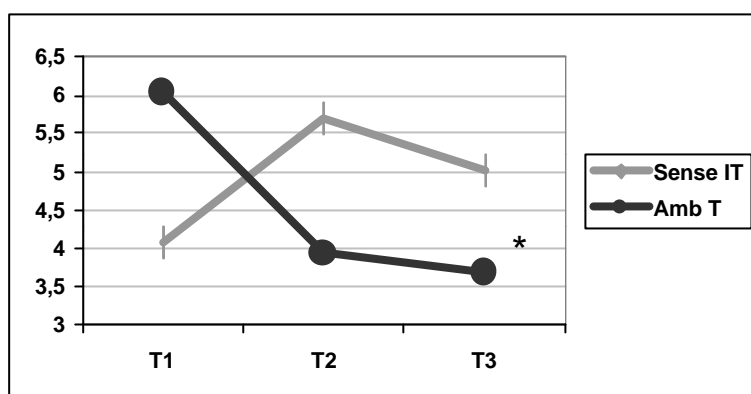


Figura 53. Índex de proliferació induïda pel *D pteronyssinus*

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi. * p=0,026

En el grup que va rebre IT, es va objectivar una correlació negativa entre índex de proliferació front *D pteronyssinus* i l'activació dels limfòcits T (CD3+CD69+) ($r=-0.449$, $p=0.009$). En canvi, hi havia una correlació positiva entre la proliferació i la puntuació de símptomes ($r=0.534$, $p=0.001$).

4.3.4.3.2 Detecció de citocines en cultius no estimulats o estimulats amb antigen. Reestimulació amb PMA i ionomicina

Tal com s'exposa a Pacients, Material i Mètodes, en tots els cultius que mostraven proliferació limfocitària front *D pteronyssinus* (100% dels cultius) es va efectuar la detecció de citocines intracel·lulars, tant en les cèl·lules no estimulades com en les estimulades amb *D pteronyssinus*. Per determinar aquestes citocines, les cèl·lules es van reestimar al final del cultiu amb PMA i ionomicina, i per tal de comprovar que aquesta reestimulació era efectiva es va analitzar també l'expressió de CD69.

Amb l'objectiu de comprovar l'especificitat d'aquesta reestimulació, cèl·lules dels mateixos pacients es van estimular amb toxoide tetànic i posteriorment, aquells cultius que havien mostrat proliferació (n=13) (Taula 29) es van reestimar amb PMA i ionomicina i es va procedir també a la detecció de citocines. Els resultats es van comparar amb els obtinguts en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* dels

mateixos individus

Taula 29. Proliferació front a Toxoide tetànic

Control	4134 ± 2784
T. Tetànic	17780 ± 13113
Índex de Proliferació	4,96 ± 2,70

Els resultats venen expressats com mitjana

± desviació estàndard de comptes per minut.

A les Taules 30 i 31 es reflecteix la detecció de citocines dels cultius control i estimulats amb *D pteronyssinus* i dels cultius estimulats amb toxoide tetànic.

Taula 30. Percentatge de limfòcits T procedents de cultius no estimulats o estimulats amb toxoide tetànic que expressen CD69 i les citocines IL-4, IFN- γ i IL-10 (n=13)

		CONTROL	T. Tetànic	P
CD3	CD69	98,38 ± 1,33	97,77 ± 1,59	NS
	IL-4	6,39 ± 5,99	9,30 ± 8,69	0,023
	IFN-γ	20,09 ± 7,88	21,40 ± 8,10	NS
	IL-10	23,34 ± 13,52	20,65 ± 12,26	NS
CD4	IL-4	8,44 ± 9,05	12,39 ± 12,08	0,016
	IFN-γ	16,39 ± 6,01	17,33 ± 5,40	NS
	IL-10	27,01 ± 13,95	24,56 ± 13,67	NS
CD8	IL-4	2,51 ± 1,40	3,50 ± 2,69	NS
	IFN-γ	31,67 ± 16,55	32,68 ± 17,51	NS
	IL-10	15,54 ± 12,07	12,56 ± 8,92	NS

Taula 31. Percentatge de limfòcits T procedents de cultius no estimulats o estimulats amb *D pteronyssinus* que expressen CD69 i les citocines IL-4, IFN- γ i IL-10 (n=13)

		CONTROL	<i>D pteronyssinus</i>	P
CD3	CD69	98,38 \pm 1,33	98,23 \pm 1,24	NS
	IL-4	6,39 \pm 5,99	7,61 \pm 5,98	NS
	IFN-γ	20,09 \pm 7,88	18,63 \pm 7,75	0,046
	IL-10	23,34 \pm 13,52	23,75 \pm 14,15	NS
CD4	IL-4	8,44 \pm 9,05	10,00 \pm 8,22	NS
	IFN-γ	16,39 \pm 6,01	14,56 \pm 4,70	0,033
	IL-10	27,01 \pm 13,95	27,55 \pm 15,42	NS
CD8	IL-4	2,51 \pm 1,40	2,75 \pm 1,83	NS
	IFN-γ	31,67 \pm 16,55	30,85 \pm 17,27	NS
	IL-10	15,54 \pm 12,07	14,44 \pm 9,46	NS

Comparant amb els cultius control, en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* s'observava una disminució en l'expressió d'IFN- γ pels limfòcits CD4 (p=0,033). També s'evidenciava que el *D pteronyssinus* induïa un increment en el percentatge de cèl·lules en que es detectava IL-4, si bé no arribava a la significació estadística (Fig. 54).

El TT indueix un increment d'expressió de IL-4 respecte als cultius control que es estadísticament significativa, tant pels limfòcits T de forma global (p=0,023), com

pels CD4 ($p=0,016$) (Fig. 55). A diferència del que succeeix amb els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* no hi ha variacions significatives en la producció d'IFN- γ .

La producció d'IL-10 no va mostrar canvis en cap dels cultius estimulats amb antigen respecte als controls.

Sintetitzant, aquest resultats mostren el següent:

- El *D pteronyssinus* indueix bàsicament una inhibició en la producció d'IFN- γ amb un augment lleuger en la producció d'IL-4.
- L'estimulació amb toxoide tetànic indueix una major producció d'IL-4 sense canvis significatius en les altres citocines.

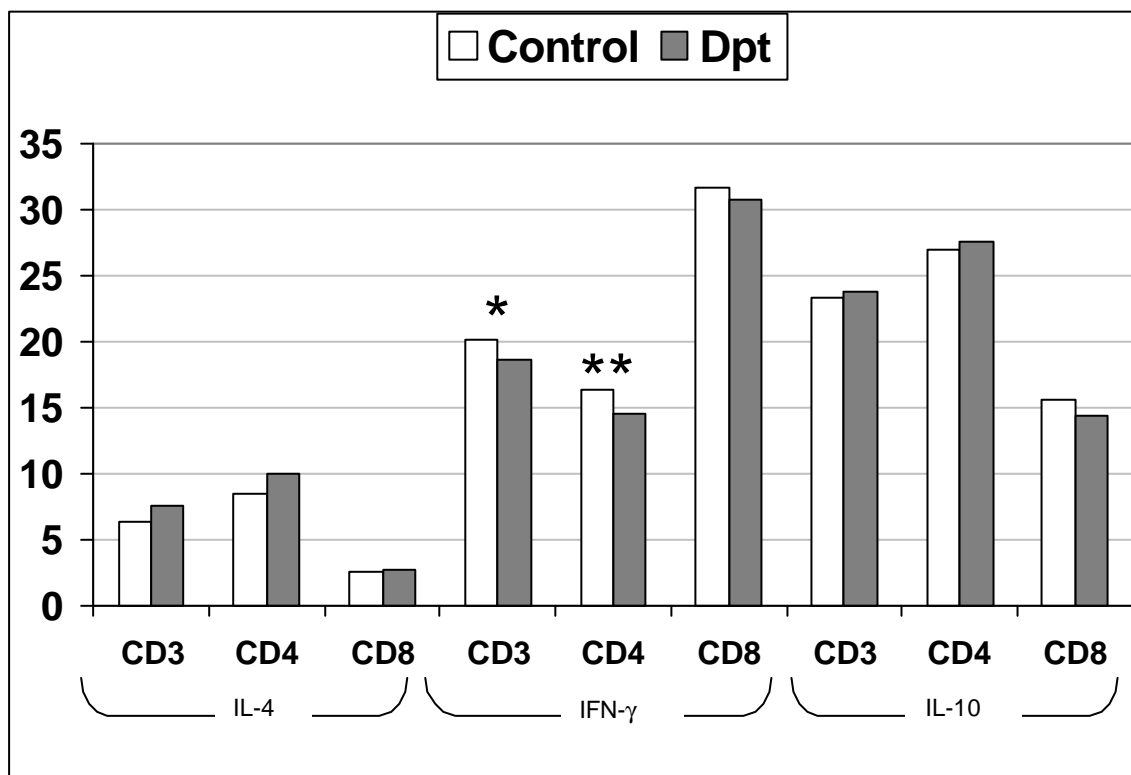


Figura 54. Percentatge de limfòcits en els que es va detectar IL-4, IFN- γ i IL-10 en els cultius control i estimulats amb *D pteronyssinus*

* $p=0,046$; ** $p=0,033$

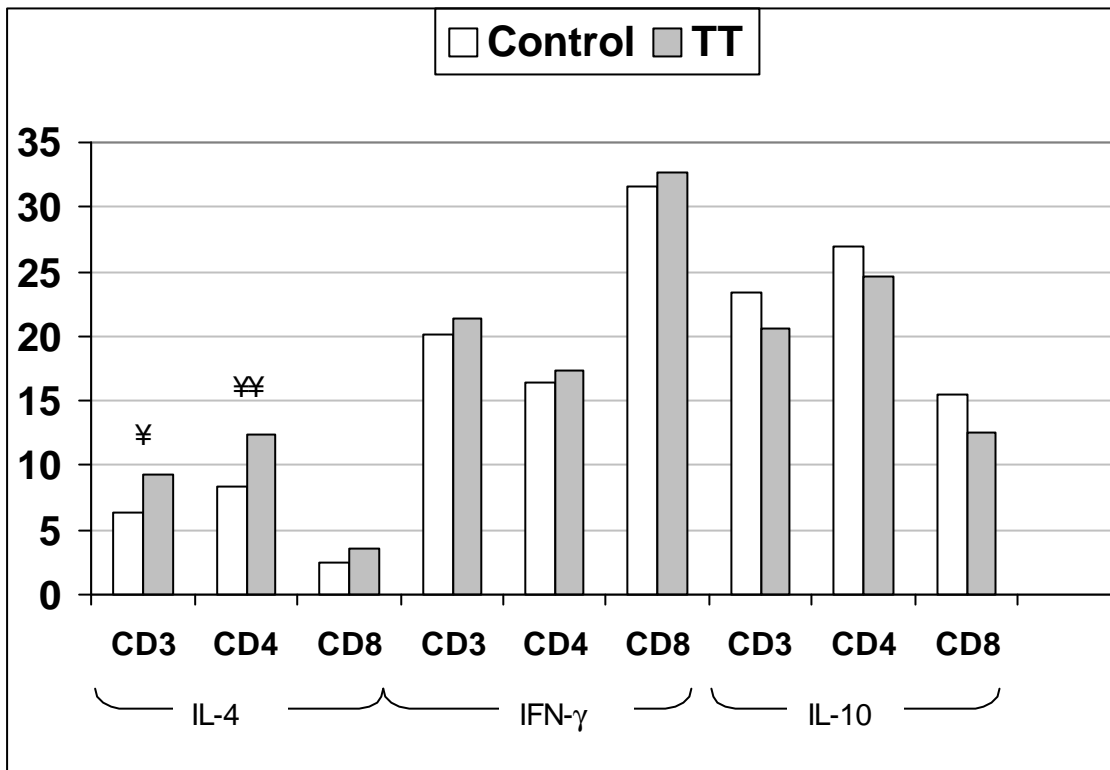


Figura 55. Percentatge de limfòcits en els que es va detectar IL-4, IFN- γ i IL-10 en els cultius control i estimulats amb toxoide tetànic

¥ p=0,023; ¥¥ p=0,016

Quan es feia una comparació entre el percentatge de cèl·lules en que es detectava una determinada citocina després de l'estimulació amb *D pteronyssinus* o amb TT, s'observava que tant l'expressió de IL-4 com la d'IFN- γ era superior en els cultius estimulats amb TT, encara que només era estadísticament significatiu per al percentatge de limfòcits CD3 que expressaven IFN- γ (p=0,001). Aquest augment es devia bàsicament als limfòcits CD4 (p=0,002) i en menor quantia als CD8 (p=0,055) (Fig. 56).

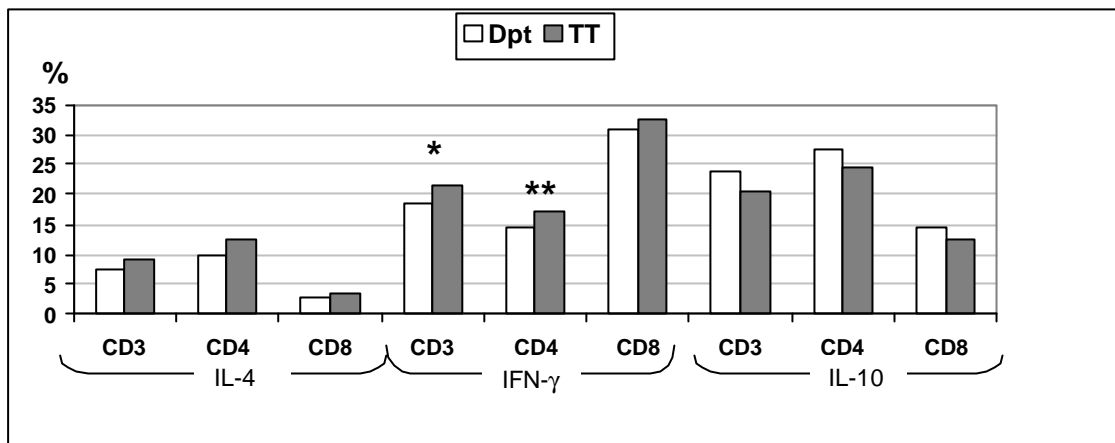


Figura 56. Comparació de l'expressió d'IL-4, IFN- γ i IL-10 induïda pel *D pteronyssinus* i pel toxoide tetànic en els cultius de CMN

*p=0,001; **p=0,002.

La producció d'IL-10 era inferior en els cultius estimulats amb toxoide tetànic que en els estimulats amb *D pteronyssinus*, per totes les poblacions de cèl·lules T, però no era estadísticament significativa.

Ja que les diferents respostes immunitàries poden ser definides per l'equilibri entre diferents citocines, es van establir les següents relacions en els índexs: IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10 (Taula 32).

Taula 32. Índex d'expressió de citocines en els cultius limfocitaris control o estimulats amb *D pteronyssinus* o Toxoide tetànic

Citocina	Població limfocitària	Control	<i>D pteronyssinus</i>	T. Tetànic
IL-4/IFN-γ	CD3	0,37	0,53*	0,52*
	CD4	0,55	0,81*	0,78*
	CD8	0,15	0,17	0,19
IL-10/IFN-γ	CD3	1,31	1,64	1,23
	CD4	1,83	2,15*	1,67
	CD8	0,69	1,04	0,69
IL-4/IL-10	CD3	0,30	0,40	0,51*
	CD4	0,32	0,44	0,57*
	CD8	0,23	0,30	0,33

* $p < 0,05$, entre cultius estimulats amb *D pteronyssinus* o toxoide tetànic respecte als cultius no estimulats

Respecte al control (cultius no estimulats prèviament amb antigen), en els cultius amb *D pteronyssinus* l'índex IL-4/IFN- γ era més alt, tant en el cas dels limfòcits CD3 ($p=0,004$) com dels CD4 ($p=0,001$). En aquests cultius també s'observava un índex IL-10/IFN- γ més elevat, essent la diferència significativa en la població de limfòcits CD4 ($p=0,019$) (Fig. 57).

En els cultius estimulats amb toxoide tetànic s'observava, també respecte als cultius no estimulats, un major índex IL-4/IFN- γ tant en els limfòcits CD3 de forma global ($p=0,055$), com per als CD4 ($p=0,028$). També la relació IL-4/IL-10 era significativament major que en el control per als limfòcits CD3 ($p=0,046$), CD4 ($p=0,033$) i al límit de la significació per als CD8 ($p=0,055$) (Fig. 58).

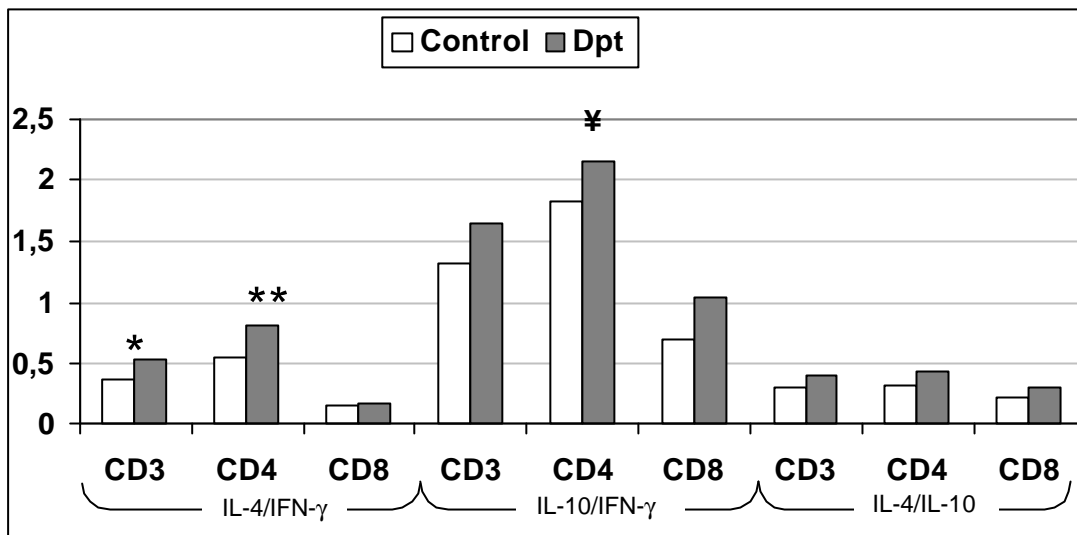


Figura 57. Índex IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10 expressats pels cultius limfocitaris amb *D pteronyssinus* comparat amb els cultius control

* $p=0,004$, ** $p=0,001$, ¥ $p=0,019$

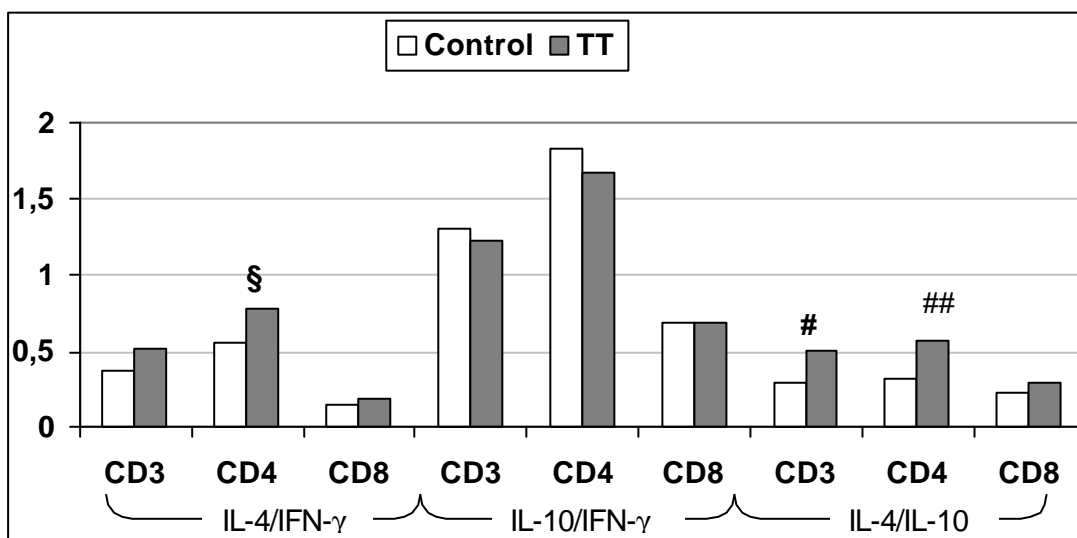


Figura 58. Índex IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10 expressats pels cultius limfocitaris amb Toxoide tetànic comparat amb els cultius control

§ $p=0,028$, # $p=0,046$, ## $p=0,033$

Comparant entre sí els cultius estimulats amb cadascun dels antigens, la diferència més evident s'observava en els índexs IL-10/IFN- γ que eren majors per els cultius

amb *D pteronyssinus* en totes les poblacions limfocitàries (CD3 p=0,004; CD4 p=0,033; CD8 p= 0,033) (Fig. 59).

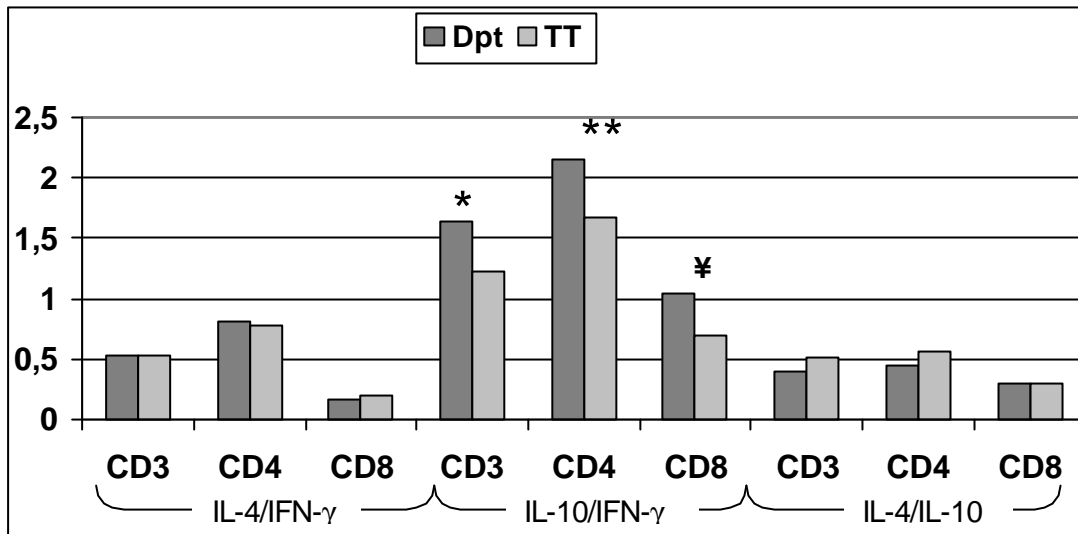


Figura 59. Índex IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10 expressats pels cultius limfocitaris amb *D pteronyssinus* comparat amb els cultius amb toxoide tetànic

* p=0,004, ** p=0,033, ¥ p=0,033

4.3.4.3.3 Evolució en la producció de citocines al llarg de l'estudi en cultius cel·lulars estimulats amb *D pteronyssinus*

La detecció intracel·lular de IL-4, IFN- γ i IL-10 en cultius de cèl·lules mononuclears sense estimular amb antigen i estimulades amb *D pteronyssinus* es va estudiar en cada grup de pacients atòpics, a l'inici, als sis i als dotze mesos. Es va comparar en cada tipus de cultiu (estimulat o no) el percentatge de cèl·lules que expressaven una determinada citocina i també es va establir un índex entre el percentatge de limfòcits que expressaven la citocina en els cultius amb *D pteronyssinus* i el percentatge de limfòcits que l'expressaven en els cultius sense estimular.

4.3.4.3.3.1 Producció específica d'IL-4

Els resultats del percentatge de limfòcits que produïen IL -4 en cultius control o després de l'estimulació amb *D pteronyssinus* es mostren a la Taula 33 i Taula 34. Es pot observar que l'estimulació amb *D pteronyssinus* augmentava el percentatge de cèl·lules que expressaven IL-4 per part de totes les subpoblacions limfocitàries.

Taula 33. Pacients no tractats amb immunoteràpia: percentatge de cèl·lules que expressaven IL-4 en els cultius cel·lulars sense antigen o estimulats amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	4,95 ± 1,54	5,59 ± 1,51	1,18 ± 0,33
	T2	4,38 ± 1,36	6,33 ± 5,81	1,50 ± 1,53
	T3	4,85 ± 1,46	5,59 ± 2,16	1,25 ± 0,81
CD4	T1	6,28 ± 1,56	7,26 ± 1,85	1,20 ± 0,36
	T2	5,38 ± 1,89	8,32 ± 8,6	1,88 ± 2,69
	T3	6,09 ± 1,67	6,80 ± 2,21	1,22 ± 0,76
CD8	T1	2,44 ± 1,85	2,71 ± 1,92	1,55 ± 1,08
	T2	2,38 ± 1,50	2,38 ± 1,27	1,19 ± 0,47
	T3	2,30 ± 1,85	3,11 ± 2,34	1,71 ± 1,84

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IL-4 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 34. Pacients tractats amb immunoteràpia: percentatge de cèl·lules que expressaven IL-4 en els cultius cel·lulars sense antigen o estimulats amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	7,21 ± 3,82	7,22 ± 5,93	0,95 ± 0,45
	T2	7,80 ± 7,42	8,28 ± 7,56	1,10 ± 0,26
	T3	7,32 ± 5,21	7,42 ± 6,10	1,13 ± 0,54
CD4	T1	9,87 ± 5,17	10,48 ± 7,56	1,06 ± 0,57
	T2	10,75 ± 11,13	11,11 ± 10,42	1,12 ± 0,40
	T3	10,44 ± 7,28	10,33 ± 8,28	1,30 ± 1,03
CD8	T1	2,39 ± 1,60	2,27 ± 1,53	1,14 ± 0,83
	T2	2,48 ± 1,64	2,64 ± 2,08	1,28 ± 1,04
	T3	2,30 ± 1,14	2,34 ± 1,44	1,06 ± 0,59

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IL-4 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

El percentatge de cèl·lules que expressaven IL-4 en els cultius control (sense antigen) del grup sense tractament i el que havia rebut IT no van mostrar diferència. Tampoc es va observar diferència en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* (Fig. 60).

També es va comparar índex establert entre el percentatge de cèl·lules que expressaven IL-4 als cultius estimulats amb *D pteronyssinus* i els no estimulats, no objectivant-se diferències (Taules 33 i 34).

L'estudi de l'evolució intragrup no va mostrar modificacions en l'expressió de IL-4 durant l'estudi.

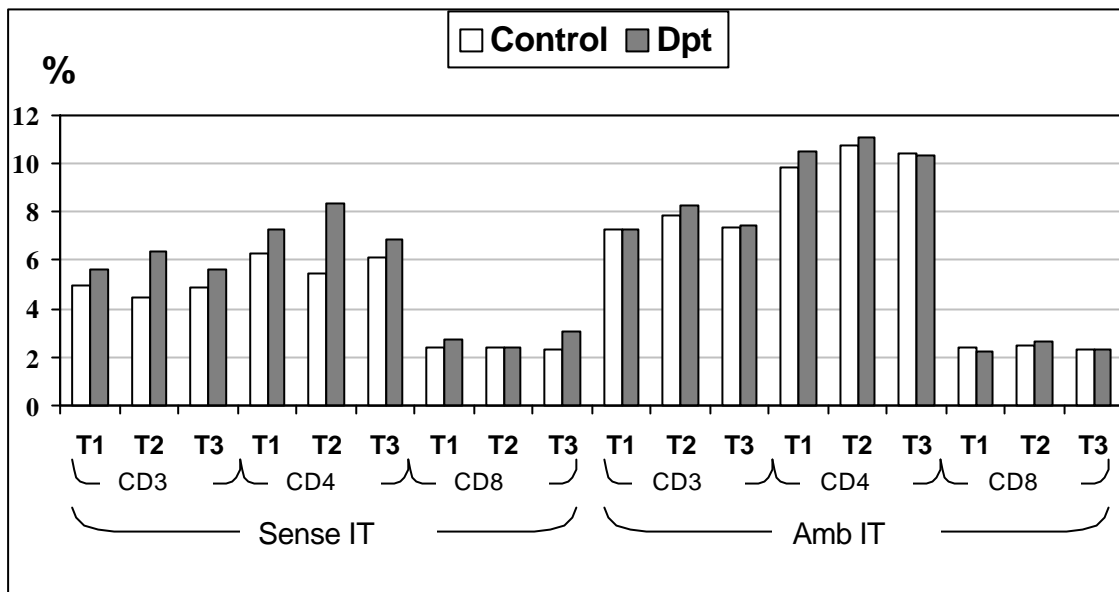


Figura 60. Percentatge de limfòcits que expressaven IL-4 en els cultius control i estimulats amb D pteronyssinus durant l'estudi

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.3.4.3.3.2 Producció específica d'IFN- γ

De forma similar a l'estudi de la IL-4, es va analitzar l'expressió d'IFN- γ en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* i en els cultius control, i es va establir un índex entre ambdós, que correspondria a la producció específica induïda per l'antigen, tant per el grup tractat amb IT com en el grup sense IT. A la Taula 35 es mostren els resultats del grup de pacients no tractats amb IT i en la Taula 36 els del grup tractat amb IT.

Taula 35. Pacients no tractats amb immunoteràpia: percentatge de cèl·lules que expressaven IFN- γ en els cultius cel·lulars sense antigen o estimulats amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	27,47 \pm 9,56	25,82 \pm 7,55	0,99 \pm 0,33
	T2	23,55 \pm 6,10	22,61 \pm 6,88	0,95 \pm 0,09
	T3	25,13 \pm 7,85	23,10 \pm 4,69	0,96 \pm 0,18
CD4	T1	24,13 \pm 7,99	22,08 \pm 7,05	0,96 \pm 0,34
	T2	21,48 \pm 6,39	19,78 \pm 6,09	0,92 \pm 0,10
	T3	21,68 \pm 7,27	19,21 \pm 4,37	0,93 \pm 0,19
CD8	T1	35,53 \pm 13,98	34,80 \pm 13,22	0,99 \pm 0,20
	T2	27,60 \pm 10,65	29,99 \pm 10,07	1,14 \pm 0,29
	T3	33,41 \pm 13,34	32,57 \pm 16,77	1,01 \pm 0,21

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IFN- γ induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 36. Pacients tractats amb immunoteràpia: percentatge de cèl·lules que expressaven IFN- γ en els cultius cel·lulars sense antigen o estimulats amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	19,64 \pm 6,72	16,73 \pm 8,03	0,83 \pm 0,27
	T2	20,64 \pm 10,69	18,57 \pm 7,17	0,90 \pm 0,17
	T3	17,19 \pm 7,83	15,85 \pm 7,62	0,95 \pm 0,31
CD4	T1	17,24 \pm 4,45	13,01 \pm 5,21	0,75 \pm 0,25
	T2	16,77 \pm 8,37	13,92 \pm 4,46	0,94 \pm 0,11
	T3	14,42 \pm 5,48	12,63 \pm 5,07	0,92 \pm 0,33
CD8	T1	25,08 \pm 13,24	24,77 \pm 15,74	0,95 \pm 0,34
	T2	28,62 \pm 16,75	24,65 \pm 13,50	0,92 \pm 0,22
	T3	23,50 \pm 16,78	23,81 \pm 15,33	1,02 \pm 0,33

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IFN- γ induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

El *D pteronyssinus* inhibia l'expressió d'IFN- γ en pràcticament tots els cultius tal com s'aprecia a les Taules 35 i 36 i a la Fig. 61.

Quan es va fer l'anàlisi estadística de l'expressió d'IFN- γ i es van comparar el grup de pacients que s'havien inclòs en el grup que rebria IT i el que no seria tractat amb IT (control), es va observar que hi havia una menor producció d'IFN- γ en el grup que havia de ser tractat amb IT. Aquesta diferència en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* arribava a ser estadísticament significativa per als limfòcits CD3 i CD4 ($p=0,02$ i $p=0,006$, respectivament). En canvi, quan es feia en cada un dels grups, l'anàlisi estadística intragrup no s'observava cap diferència amb l'inici en cap dels dos grups de pacients (Fig. 61).

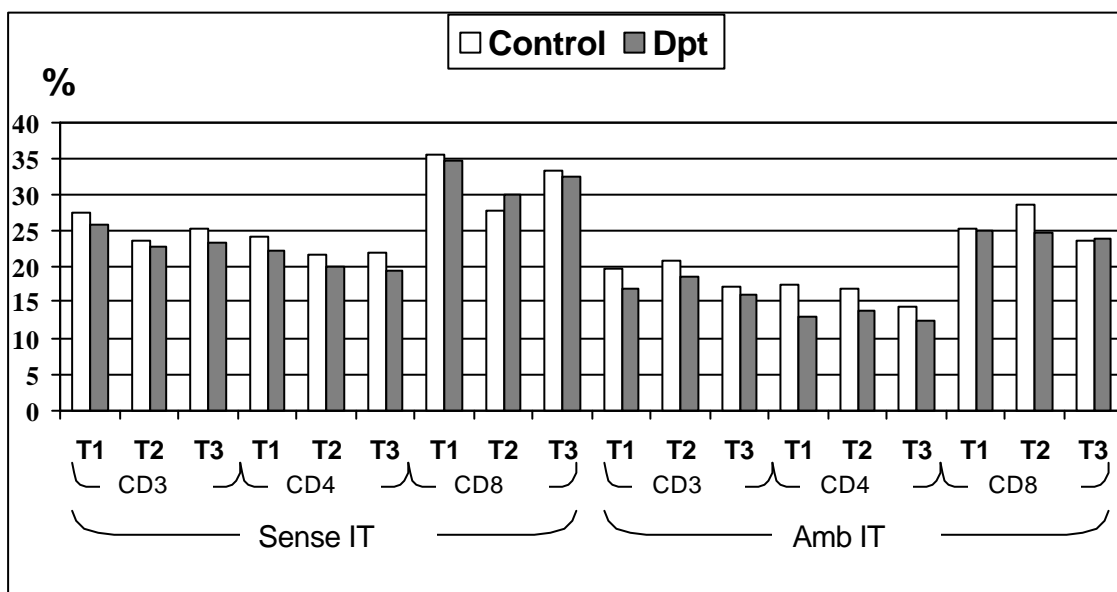


Figura 61. Percentatge de limfòcits que expressaven IFN- γ en els cultius control i estimulats amb *D pteronyssinus* durant l'estudi

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Quan s'estudiava la producció d'IFN- γ dels cultius estimulats amb *D pteronyssinus* en relació als cultius control sense estimular, es mostrava una tendència de l'índex a anar augmentant en el grup de pacients tractats amb IT que no s'observava en el

grup de pacients no tractats amb IT (Fig. 62). Així, la diferència observada entre els dos grups de pacients a l'inici de l'estudi, desapareixia al llarg dels dotze mesos. Aquest increment podia comprovar-se en els limfòcits CD3, CD4 i CD8, si bé no assolia significació estadística.

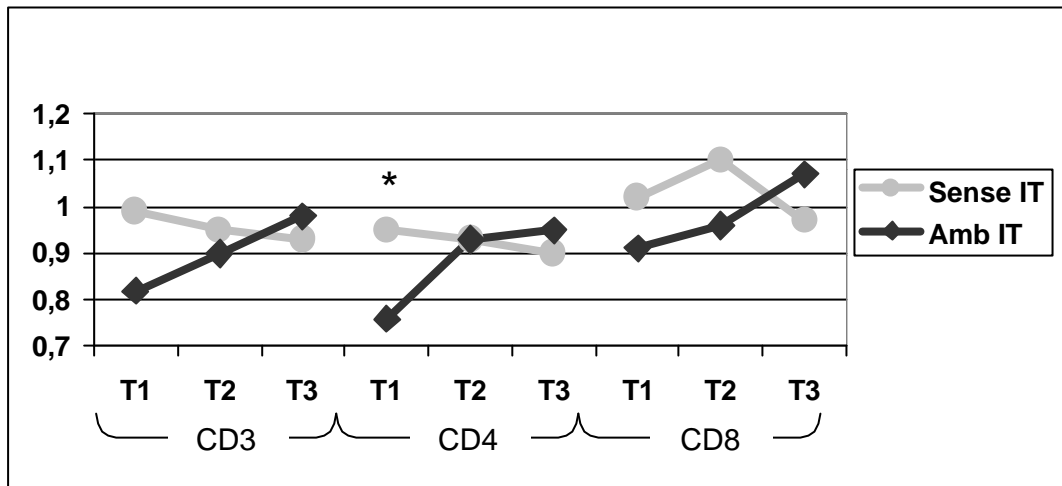


Figura 62. Índex d'expressió d'IFN- γ en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus*

L'índex d'expressió d'IFN- γ es va calcular dividint l'expressió induïda pel *D pteronyssinus* dividit per la dels cultius sense antigen.

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

* p=0,046, comparació entre grup amb IT i grup sense IT

4.3.4.3.3 Producció específica d'IL-10

Es va estudiar l'expressió d'IL-10 en els cultius control i en els estimulats amb *D pteronyssinus*, així com l'índex entre aquests dos percentatges. Els resultats s'exposen a les Taules 37 i 38.

Taula 37. Pacients no tractats amb immunoteràpia: percentatge d'expressió d'IL-10 en els cultius cel·lulars sense antígen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	17,78 ± 8,22	16,20 ± 7,31	1,06 ± 0,49
	T2	18,83 ± 9,74	18,70 ± 9,49	1,15 ± 0,48
	T3	17,95 ± 9,76	18,62 ± 8,06	1,33 ± 0,74
CD4	T1	21,51 ± 9,50	19,95 ± 8,91	1,11 ± 0,63
	T2	22,52 ± 11,10	23,27 ± 11,13	1,19 ± 0,50
	T3	21,34 ± 11,57	23,06 ± 9,80	1,48 ± 1,04
CD8	T1	11,25 ± 6,34	8,77 ± 4,44	0,90 ± 0,36
	T2	11,25 ± 7,75	10,77 ± 7,78	1,05 ± 0,36
	T3	11,04 ± 6,80	9,44 ± 5,14	1,00 ± 0,37

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IL-10 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 38. Pacients tractats amb immunoteràpia Percentatge d'expressió d'IL-10 en els cultius cel·lulars sense antígen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	22,33 ± 9,85	23,64 ± 13,58	1,05 ± 0,30
	T2	22,34 ± 15,30	23,26 ± 9,42	1,40 ± 0,96
	T3	20,34 ± 7,85	18,15 ± 12,43	0,87 ± 0,38
CD4	T1	25,90 ± 10,69	27,87 ± 15,03	1,08 ± 0,33
	T2	25,59 ± 16,02	27,46 ± 10,72	1,40 ± 0,96
	T3	25,20 ± 8,01	21,54 ± 13,70	0,84 ± 0,38
CD8	T1	15,73 ± 7,85	14,92 ± 8,39	0,96 ± 0,26
	T2	15,23 ± 13,58	13,89 ± 5,73	1,36 ± 1,00
	T3	12,44 ± 6,83	11,65 ± 8,89	0,93 ± 0,42

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IL-10 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

S'observa un augment no significatiu de l'expressió d'IL-10 en els pacients no

tractats amb IT en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus*. En el grup de pacients que van rebre IT, si bé als 6 mesos hi havia un augment de la IL-10, a l'any s'observava una disminució de l'expressió d'aquesta citocina tant en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* com en els no estimulats (Fig. 63).

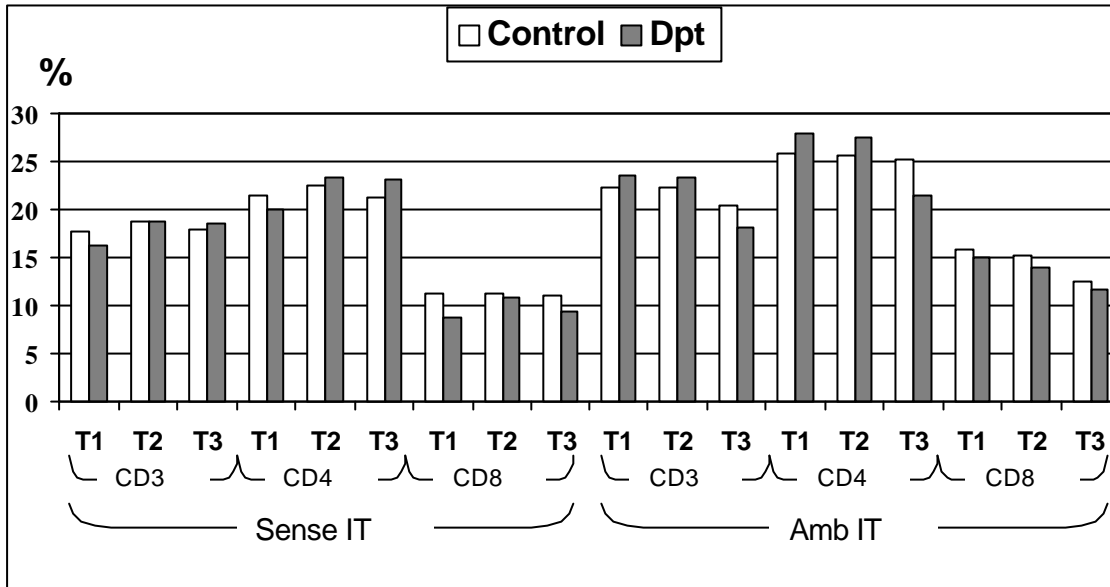


Figura 63. Percentatge de limfòcits que expressaven IL-10 en els cultius control i estimulats amb *D pteronyssinus* durant l'estudi

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Aquestes variacions es reflectien en els índex de producció d'IL-10 (establerts entre els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* i els cultius no estimulats, per totes les poblacions limfocitàries, els quals augmentaven progressivament en el grup de pacients sense IT. En canvi en el grup tractat amb IT, s'observava un increment notable en l'índex d'IL-10 en la determinació dels sis mesos, per anar disminuint al cap d'un any de tractament. Aquesta disminució era principalment rellevant en la població CD4 ($p=0,086$) (Fig. 64).

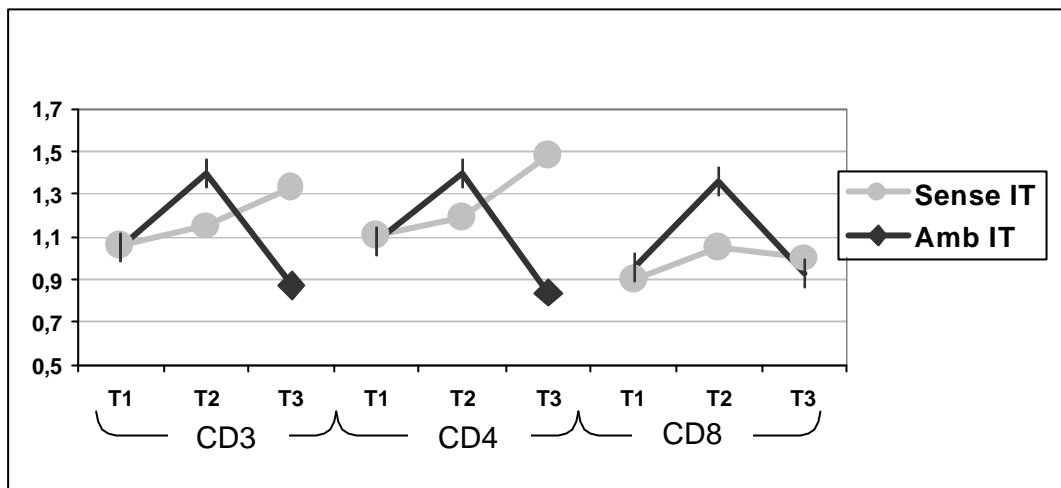


Figura 64. Índex d'expressió d'IL-10 en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus*

L'índex expressió d'IL-10 es va calcular dividint l'expressió induïda pel *D pteronyssinus* per la dels cultius sense antígen.

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.3.4.3.3.4 Índex entre IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10 específic per *D pteronyssinus*

Amb el propòsit d'avaluar l'influència de l'equilibri entre les citocines, es van establir uns índex entre la producció d'IL-4, IFN- γ i IL-10 induïda als cultius amb *D pteronyssinus*. Els resultats d'aquests índex estan exposats a les Taules 39, 40 i 41.

Taula 39. Índex d'expressió d'IL-4/IFN- γ induïda per *D pteronyssinus* en els pacients no tractats o tractats amb immunoteràpia

		IL-4/IFN-γ	
		Sense IT	Amb IT
CD3	T1	0,23 \pm 0,08	0,52 \pm 0,51
	T2	0,30 \pm 0,26	0,50 \pm 0,48
	T3	0,25 \pm 0,10	0,53 \pm 0,59
CD4	T1	0,35 \pm 0,10	0,90 \pm 0,86
	T2	0,44 \pm 0,37	0,78 \pm 0,78
	T3	0,37 \pm 0,15	0,88 \pm 1,06
CD8	T1	0,08 \pm 0,06	0,15 \pm 0,13
	T2	0,09 \pm 0,06	0,15 \pm 0,21
	T3	0,10 \pm 0,09	0,16 \pm 0,16

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 40. Índex d'expressió d'IL-10/IFN- γ induïda per *D pteronyssinus* en els pacients no tractats o tractats amb immunoteràpia

		IL-10/IFN-γ	
		Sense IT	Amb IT
CD3	T1	0,68 \pm 0,32	1,93 \pm 2,04
	T2	0,87 \pm 0,44	1,55 \pm 1,44
	T3	0,86 \pm 0,50	1,37 \pm 1,02
CD4	T1	0,97 \pm 0,37	2,65 \pm 2,38
	T2	1,25 \pm 0,61	2,02 \pm 1,43
	T3	1,28 \pm 0,64	1,86 \pm 1,09
CD8	T1	0,33 \pm 0,30	0,99 \pm 1,10
	T2	0,44 \pm 0,40	0,98 \pm 1,63
	T3	0,37 \pm 0,35	0,78 \pm 0,98

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 41. Índex d'expressió d'IL-4/IL-10 induïda per D pteronyssinus en els pacients no tractats o tractats amb immunoteràpia

		IL-4/IL-10	
		Sense IT	Amb IT
CD3	T1	0,37 ± 0,19	0,37 ± 0,30
	T2	0,28 ± 0,25	0,40 ± 0,33
	T3	0,44 ± 0,48	0,58 ± 0,59
CD4	T1	0,40 ± 0,20	0,53 ± 0,50
	T2	0,28 ± 0,24	0,47 ± 0,40
	T3	0,43 ± 0,45	0,69 ± 0,67
CD8	T1	0,31 ± 0,20	0,17 ± 0,10
	T2	0,27 ± 0,28	0,22 ± 0,15
	T3	0,52 ± 0,66	0,31 ± 0,34

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

En l'anàlisi estadística entre els dos grups (sense i amb IT), no s'observava cap diferència significativa per a cap dels índex.

L'anàlisi intragrups mostrava una tendència a augmentar la relació IL-10/IFN- γ específica en el grup que no va rebre immunoteràpia, i en canvi, tendia a disminuir en el grup que va rebre IT, encara que aquestes diferències no foren estadísticament significatives (Fig. 65).

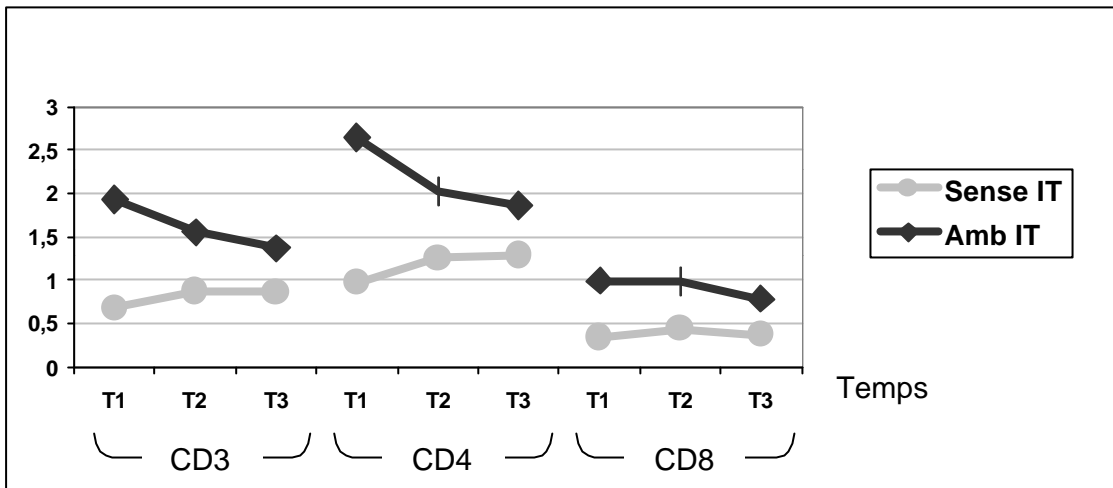


Figura 65. Índex d'expressió d'IL-4/IFN- γ induïda per *D pteronyssinus* en els pacients no tractats o tractats amb immunoteràpia

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.4 MILLORANÇA

Quan es van avaluar els diferents paràmetres segons la variable millorança, definida tal com s'exposa a Pacients, Material i Mètode (apartat 3.3.3.6), es van obtenir els següents resultats.

Dels 28 participants en l'estudi, 16 van presentar millorança i 12 no van millorar.

A continuació es descriuen els resultats segons el pacient presentés millorança o no.

4.4.1 MILLORANÇA I IMMUNOTERÀPIA

Dels 16 pacients que van millorar, 13 havien rebut immunoteràpia i 3 no, mentre que 3 pacients dels 12 que no van millorar si que n'havien rebut.

Quan es van evaluar els pacients en funció de si havien millorat o no, en relació a la IT, es va observar que els pacients que havien rebut aquest tractament presentaven una millora que era significativa respecte el grup que no el rebia ($p=0.004$; Odds ratio 0.308; IC 0.112-0.843) (Taula 42).

Taula 42. Millorança segons l'aplicació d'immunoteràpia

	Millorança	No millorança
Sense IT	3 (10,7%)	9 (32,1%)
Amb IT	13 (46,4%)*	3 (10,7%)
TOTAL	16	12

* $p=0,004$ associació positiva entre millorança i IT

4.4.2 PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT A *Dermatophagoides pteronyssinus*

Es van avaluar els resultats de les proves cutànies a *D pteronyssinus* segons si els pacients havien millorat o no. Els resultats es mostren a la Taula 43.

Taula 43. Proves cutànies amb diferents concentracions de *D pteronyssinus* a l'inici, 6 mesos i 1 any de l'estudi. Comparació entre grups segons millorança.

		Millorança	No millorança	p
Histamina	T1	5,53 ± 0,79	5,33 ± 1,07	N.S.
	T2	5,41 ± 0,94	5,29 ± 0,54	N.S.
	T3	5,31 ± 0,79	5,25 ± 0,75	N.S.
0,1 HEP/ml	T1	1,25 ± 1,34	1,79 ± 1,41	N.S.
	T2	0,88 ± 1,20	2,58 ± 1,38	0,04
	T3	1,19 ± 1,28	1,50 ± 1,62	N.S.
1 HEP/ml	T1	3,75 ± 0,86	3,63 ± 0,98	N.S.
	T2	2,47 ± 1,84	4,50 ± 1,62	N.S.
	T3	2,31 ± 1,96	2,33 ± 1,44	N.S.
10 HEP/ml	T1	5,53 ± 1,23	6,54 ± 4,39	N.S.
	T2	4,97 ± 2,02	4,81 ± 2,06	N.S.
	T3	4,88 ± 1,59	4,47 ± 1,88	N.S.
100 HEP/ml	T1	7,47 ± 1,84	9,29 ± 5,31	N.S.
	T2	7,09 ± 2,45	7,83 ± 1,90	N.S.
	T3	6,56 ± 2,03	7,96 ± 2,05	N.S.

Resultats expressats com a mitjana ± desviació estàndard en mm. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

L'anàlisi estadística va mostrar diferències significatives amb una menor reactivitat cutània en el grup que millorava però només als 6 mesos i amb la concentració de 0,1 HEP/ml. Al cap de l'any aquesta diferència no era evident.

A l'estudi intragrup, es va comprovar que tant en el grup que millorava com en el

que no millorava es podia comprovar una disminució de la resposta cutània als 6 mesos (millorança $p=0,07$; no millorança $p=0,048$) i als 12 mesos (millorança $p=0,018$; no millorança $p=0,004$).

4.4.3 PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL

Es van avaluar els resultats de les proves de provocació conjuntival segons els pacients haguessin millorat o no, i es mostren a la Taula 44.

Taula 44 . Nombre de pacients que mostraven positivitat de les proves de provocació conjuntival amb diferents concentracions de *D pteronyssinus* (0,1, 1 i 10 HEP/ml) segons la millorança

		Millorança	No millorança
0,1 HEP/ml	T1	0	0
	T2	0	2
	T3	0	0
1 HEP/ml	T1	11	9
	T2	13	10
	T3	9	10
10 HEP/ml	T1	5	3
	T2	3	0
	T3	7	2

Resultats expressats com a nombre de pacients que varen presentar una prova conjuntival positiva amb aquella concentració. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

No es van trobar diferències significatives entre el grup de pacients que havia millorat i el que no.

4.4.4 PROVES DE FUNCIÓ RESPIRATÒRIA

Les diferents mesures de la espirometria basal forçada i de la prova broncodilatadora es van avaluar segons si els pacients havien presentat millorança o no. Els resultats queden reflectits a la Taula 45.

Taula 45. Resultats de les proves de funció respiratòria segons la millorança

		Millorança	No millorança
FVC	T1	85,81 ± 12,69	96,08 ± 12,20
	T2	92,75 ± 9,94	94,58 ± 10,81
	T3	91,31 ± 11,06	94,58 ± 10,22
VEMS	T1	89,00 ± 11,83	94,33 ± 19,72
	T2	97,13 ± 8,66	93,67 ± 11,57
	T3	94,06 ± 10,16	90,08 ± 15,44
MEF	T1	79,94 ± 16,39	80,58 ± 33,10
	T2	90,38 ± 18,80	81,42 ± 25,62
	T3	86,88 ± 23,08	76,42 ± 27,65
VEMS/ FVC%	T1	87,06 ± 9,13	84,33 ± 6,33
	T2	88,56 ± 7,33	81,67 ± 7,34
	T3	86,63 ± 8,38	83,08 ± 9,44
PB	T1	25	25
	T2	0	33,3
	T3	0	33,3

Els resultats de FVC, VEMS i MEF, venen expressats com a percentatge del valor teòric. La PB ve expressada com a percentatge de proves broncodilatadores positives sobre el total de realitzades. FVC=capacitat vital forçada; VEMS=volum espirat en el primer segon; MEF=massofluxe 25-75%; VEMS/ FVC%=relació entre VEMS i FVC, expressat com percentatge PB=prova broncodilatadora; T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

L'anàlisi estadística va mostrar a l'inici de l'estudi una FVC inferior en el grup que presentaria millorança comparat amb el que no milloraria ($p=0,042$), que desapareixia als 6 i 12 mesos. També es va evidenciar una disminució significativa en el nombre de pacients amb prova broncodilatadora positiva en el grup que va presentar millorança, als 6 ($p=0,024$) i als 12 mesos ($p=0,024$), probablement deguda a l'augment de la FVC. Els altres paràmetres van ser similars en els dos grups.

En l'avaluació intragrup, el grup que va mostrar millorança presentava un augment significatiu de la FVC, VEMS i MEF ($p=0,005$, $p=0,003$ i $p=0,021$, respectivament) als 6 mesos. En el grup sense millorança, no es va observar cap canvi.

4.4.5 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CD23 i CD86 EN CÈL·LULES PRESENTADORES DE L'ANTIGEN

L'expressió del receptor de baixa afinitat per la IgE (CD23) i del CD86 (B7.2) en els limfòcits B (cèl·lules CD20+) i en els monòcits (cèl·lules CD14+) segons els pacients presentessin o no millorança s'exposa a la Taula 46.

Taula 46. Percentatge de limfòcits B i monòcits que expressaven CD23 i CD86

		Millorança	No millorança
% limfòcits B CD23+	T1	45,75 ± 13,88	47,00 ± 12,70
	T2	54,45 ± 13,71	62,90 ± 10,95
	T3	53,16 ± 13,70	62,33 ± 9,08
% monòcits CD23+	T1	7,92 ± 4,72	9,89 ± 4,26
	T2	5,00 ± 2,97	9,40 ± 4,50
	T3	5,75 ± 3,67	10,22 ± 3,31
% limfòcits B CD86+	T1	6,10 ± 2,02	5,86 ± 2,79
	T2	5,30 ± 2,75	5,85 ± 1,68
	T3	4,80 ± 2,25	6,17 ± 2,56

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per a l'expressió de CD23 o CD86. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

L'expressió de CD86 en els monòcits no es mostra a la taula, per que tal com ja s'ha ressenyat anteriorment, oscil·lava entre el 99-100% en tots els casos i en totes les determinacions.

Comparant els dos grups de pacients s'observa que a l'inici de l'estudi, no hi havia cap diferència en l'expressió de CD23 i de CD86. Al cap de sis mesos, s'observava que l'expressió de CD23 en els monòcits del pacients que havien millorat era més

baixa que en el grup que no presentava millorança ($p=0,020$), i aquesta diferència es mantenia a l'any ($p=0,012$) (Fig. 66). Els mateixos resultats s'observaven en l'expressió de CD86 en els limfòcits B dels pacients que milloraven comparat amb els que no milloraven, si bé aquesta diferència no fou estadísticament significativa.

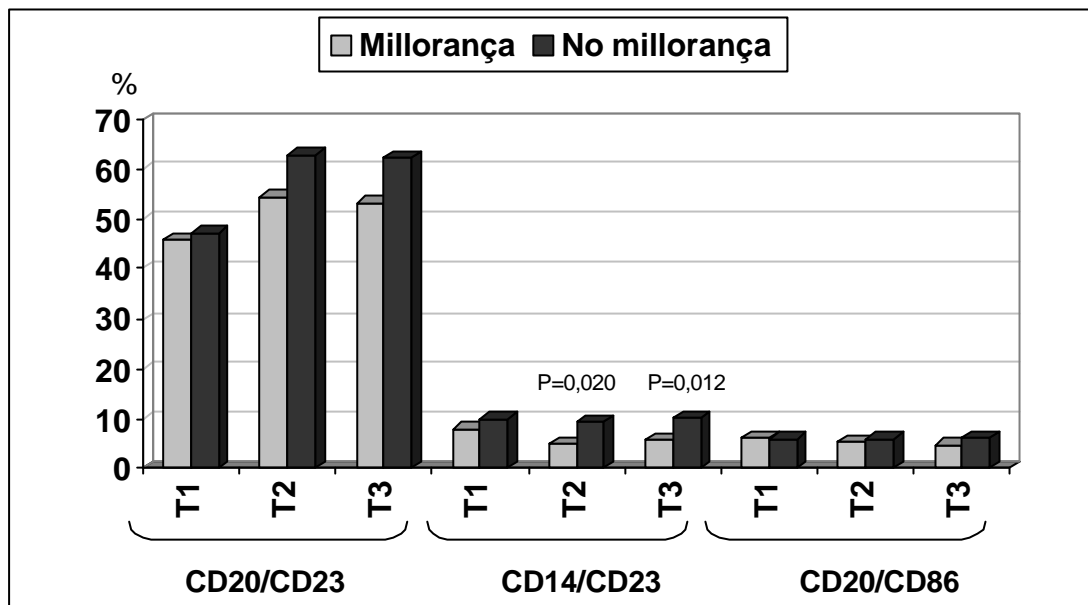


Figura 66. Percentatge de limfòcits B i monòcits que expressaven CD23 i CD86

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Tant el grup que va millorar com en el que no va millorar, presentava un increment en el temps en l'expressió de CD23 en limfòcits B, que arribava a la significació estadística només en el grup sense millorança, tant als 6 mesos ($p=0,021$) com a l'any ($P=0,036$).

En els pacients que van presentar millorança es va objectivar una correlació negativa entre els limfòcits B i els monòcits que expressaven CD23 ($r=-0,442$, $p=0,008$) i també entre l'expressió de CD23 i de CD86 en els limfòcits B ($r=-0,421$, $p=0,021$).

4.4.6 ESTIMULACIÓ LIMFOCITÀRIA AMB PMA I IONOMICINA I DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS

4.4.6.1 EXPRESSIÓ DE CD69

L'estimulació limfocitària mitjançant PMA i ionomicina avaluada segons el percentatge de limfòcits T que expressaven CD69 queda reflectida en els resultats de la Taula 47.

Taula 47. Percentatge de cèl·lules T que expressaven CD69

Temps	Millorança	No millorança
T1	86,00 ± 12,27	84,09 ± 10,01
T2	89,55 ± 6,73	90,33 ± 4,81
T3	92,69 ± 4,35	89,50 ± 7,28

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules positives per CD69. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

No es va evidenciar cap diferència quan es comparava el grup que havia presentat milloria respecte al que no va millorar. En canvi, en el grup que havia millorat, si es trobava un augment significatiu de l'expressió de CD69 als sis (p=0,050) i als 12 mesos (p=0,017) respecte a l'inici (Fig. 67).

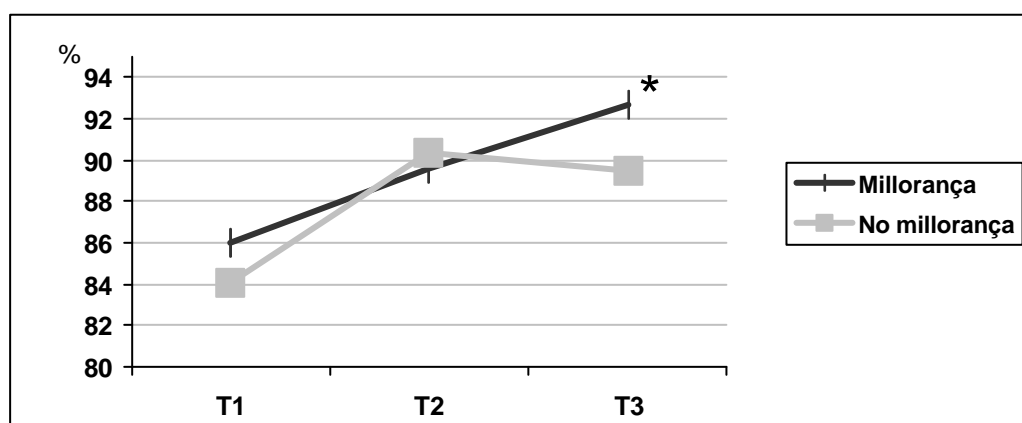


Figura 67. Percentatge de limfòcits T que expressen CD69 en el grup de pacients amb millorança o sense millorança

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

*
p=0,017

A l'inici de l'estudi el grup de pacients al·lèrgics que presentaria millorança presentava una menor expressió de CD69 que els pacients no atòpics ($86,00 \pm 12,27$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p=0,006$). Després de l'any d'estudi disminuïa aquesta diferència ($92,69 \pm 4,35$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p=0,049$). En canvi, en els pacients que no van presentar millorança, la diferència de l'inici de l'estudi respecte als no al·lèrgics ($84,09 \pm 10,01$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p<0,001$) es mantenia al cap d'un any ($89,50 \pm 7,28$ vs $95,90 \pm 2,56$, $p=0,003$)

En el grup amb millorança, es va evidenciar una correlació negativa entre l'expressió de CD69 en limfòcits T i la puntuació de símptomes ($r=-0.651$, <0.001).

4.4.6.2 DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS (IL-4, IFN- γ I IL-10)

A les Taules 48, 49 i 50, es mostren els resultats corresponents al percentatge de cèl·lules que expressen IL-4, IFN- γ i IL-10, segons els pacients haguessin presentat millorança o no durant l'estudi, en els diferents períodes de seguiment.

Taula 48. Percentatge de limfòcits T que expressaven IL-4 en el grup de pacients amb millorança o sense millorança

Població cel·lular	Temps	Millorança	No millorança
CD3	T1	4,20 ± 2,70	4,12 ± 1,59
	T2	4,40 ± 2,27	4,17 ± 1,74
	T3	3,78 ± 1,68	4,98 ± 2,56
CD4	T1	5,16 ± 3,08	4,27 ± 1,91
	T2	5,23 ± 2,73	4,21 ± 2,31
	T3	4,58 ± 2,06	5,59 ± 3,24
CD8	T1	2,09 ± 1,49	2,78 ± 2,25
	T2	2,50 ± 1,40	3,13 ± 2,17
	T3	2,34 ± 1,42	3,30 ± 1,77

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules en que es va detectar expressió d'IL-4. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 49. Percentatge de limfòcits que expressaven IFN-γ en el grup de pacients amb millorança o sense millorança

Població cel·lular	Temps	Millorança	No millorança
CD3	T1	18,23 ± 9,46	18,17 ± 6,89
	T2	20,40 ± 10,99	20,40 ± 6,67
	T3	19,91 ± 12,68	20,30 ± 7,07
CD4	T1	13,97 ± 8,05	14,97 ± 6,41
	T2	19,85 ± 13,81	17,06 ± 5,59
	T3	19,37 ± 15,27	16,90 ± 5,73
CD8	T1	26,51 ± 17,17	31,72 ± 16,36
	T2	28,20 ± 17,15	32,41 ± 14,29
	T3	24,44 ± 15,74	30,96 ± 14,31

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules en que es va detectar expressió d'IFN-γ. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 50. Percentatge de limfòcits que expressen IL-10 en el grup de pacients amb millorança o sense millorança

Població cel·lular	Temps	Millorança	No millorança
CD3	T1	14,46 ± 8,67	19,27 ± 16,25
	T2	15,90 ± 8,36	16,37 ± 9,04
	T3	14,98 ± 8,25	17,60 ± 11,16
CD4	T1	15,31 ± 8,48	20,93 ± 17,24
	T2	18,64 ± 9,51	16,62 ± 9,52
	T3	15,72 ± 7,23	19,17 ± 11,37
CD8	T1	11,98 ± 10,37	15,48 ± 14,77
	T2	9,98 ± 4,93	11,84 ± 8,67
	T3	12,27 ± 12,12	12,62 ± 11,47

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard del percentatge de cèl·lules en que es va detectar expressió d'IL-10. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Aquests resultats no van mostrar diferències estadísticament significatives per cap de les citocines, tant quan es comparaven els dos grups, com quan s'avaluaven les variacions al llarg del temps.

Per tal d'estudiar conjuntament la influència de les diverses citocines, es van establir uns índex entre IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL4/IL-10. Els resultats corresponents a aquestes relacions es mostren a la Taula 51.

Taula 51. Índex IL-4/IFN- γ , IL-10/ IFN- γ i IL-4/IL-10 en el grup de pacients amb millorança i en els pacients sense millorança al llarg de l'estudi

Índex	Població cel·lular	Temps	Millorança	No millorança
IL-4/IFN- γ	CD3	T1	0,49	0,26
		T2	0,34	0,21
		T3	0,28	0,25
	CD4	T1	0,65	0,35
		T2	0,40	0,24
		T3	0,35	0,33
	CD8	T1	0,14	0,11
		T2	0,27	0,12
		T3	0,21	0,12
IL-10/IFN- γ	CD3	T1	1,65	1,69
		T2	1,43	0,89
		T3	2,00	1,07
	CD4	T1	2,62	2,04
		T2	1,61	1,05
		T3	2,00	1,33
	CD8	T1	1,86	1,24
		T2	1,20	0,67
		T3	1,98	0,85
IL-4/IL-10	CD3	T1	0,51	0,45
		T2	0,53	0,42
		T3	0,57	0,45
	CD4	T1	0,57	0,47
		T2	0,55	0,48
		T3	0,63	0,44
	CD8	T1	0,35	0,28
		T2	0,43	0,31
		T3	0,41	0,58

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Els pacients que presentaven millorança mostraven al llarg de l'estudi una disminució de la relació establerta entre el percentatge de limfòcits CD4+ que expressaven IL-4 i els que expressaven IFN- γ , encara que no arribava a la

significació estadística ($p=0,087$) (Fig. 68).

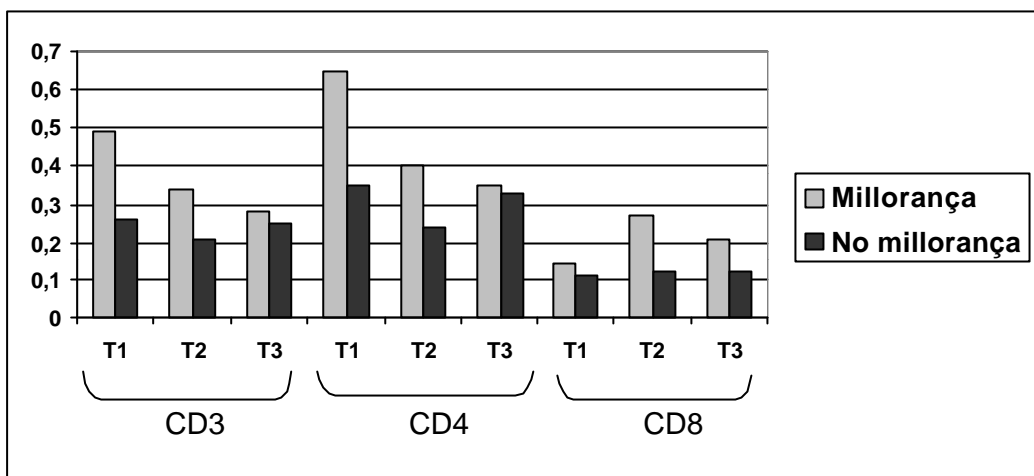


Figura 68. Índex IL-4/IFN- γ expressat pels limfòcits T

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Per contra, els pacients que no havien millorat presentaven als 12 mesos un augment respecte a l'inici de la relació establerta entre el percentatge de limfòcits T CD8+ que expressaven IL-4 i els que expressaven IL-10 ($p=0,018$). Aquest increment era degut tant a un augment del percentatge de cèl·lules que expressaven IL-4 com a una disminució de les que expressaven IL-10.

4.4.7 ASSAJOS DE PROLIFERACIÓ LIMFOCITÀRIA

En els cultius limfocitaris es va analitzar l'estimulació induïda pel *D pteronyssinus* a l'inici, 6 i 12 mesos de l'estudi (Taula 52).

Quan s'estudiaven el grup de pacients que havien millorat i el que no, independentment d'haver rebut IT o no, s'observava que els pacients que milloraven presentaven una disminució de l'índex de proliferació dels seus limfòcits amb *D pteronyssinus*, que era molt significativa al final de l'estudi ($p=0,003$) (Fig. 69).

Taula 52. Índex de proliferació induïda pel *D pteronyssinus*

Temps	Millorança	No millorança
T1	5,88 ± 4,05	4,26 ± 2,70
T2	4,99 ± 3,69	4,65 ± 4,24
T3	3,25 ± 1,92	5,45 ± 5,47

Els resultats venen expressats com mitjana ± desviació estàndard. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

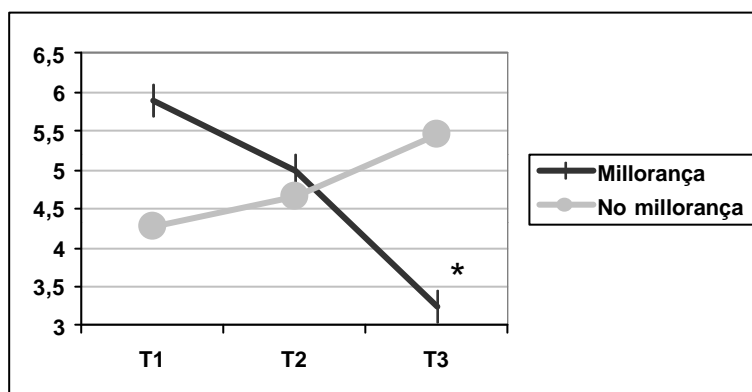


Figura 69. Índex de proliferació induïda pel *D pteronyssinus*

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi. * p=0,003

En el grup que va presentar millorança, es va trobar una correlació negativa entre l'índex de proliferació front *D pteronyssinus* i l'activació dels limfòcits T (CD3+CD69+) ($r=-0.415$, $p=0.016$). En canvi, es va trobar una correlació positiva entre la puntuació de símptomes i l'índex de proliferació ($r=0.422$, $p=0.014$).

4.4.8 CANVIS EN LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES PELS CULTIUS ESTIMULATS AMB *D Pteronyssinus* EN EL GRUP AMB MILLORANÇA I EN EL GRUP SENSE MILLORANÇA

El percentatge de cèl·lules que expressaven una determinada citocina (IL-4, IFN- γ o IL-10) en els cultius control i estimulats amb *D pteronyssinus* i posteriorment reestimulats amb PMA+I, va ser estudiada segons la milloria clínica dels pacients, comparant el grup amb “millorança” amb el que no la presentava.

4.4.8.1 PRODUCCIÓ ESPECÍFICA D'IL-4

La detecció d'IL-4 en les diferents subpoblacions de cèl·lules estimulades o no estimulades amb *D pteronyssinus* no va mostrar canvis significatius al llarg de l'estudi en cap dels dos grups (Taula 53 i 54).

Taula 53. Pacients amb millorança: percentatge d'expressió d'IL-4 en els cultius cel·lulars sense antigen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	6,53 \pm 3,83	5,66 \pm 3,66	0,87 \pm 0,20
	T2	5,35 \pm 2,90	6,05 \pm 3,96	1,14 \pm 0,27
	T3	5,94 \pm 4,25	6,05 \pm 5,13	1,15 \pm 0,54
CD4	T1	8,86 \pm 5,19	8,48 \pm 4,89	1,01 \pm 0,45
	T2	7,10 \pm 4,05	8,17 \pm 5,45	1,18 \pm 0,41
	T3	8,49 \pm 5,89	8,36 \pm 6,73	1,31 \pm 1,03
CD8	T1	2,45 \pm 1,59	2,29 \pm 1,43	1,05 \pm 0,54
	T2	2,04 \pm 1,12	2,05 \pm 1,05	1,26 \pm 1,04
	T3	1,99 \pm 0,89	2,24 \pm 1,38	1,18 \pm 0,70

A la columna “Índex” apareix el resultat de l'expressió d'IL-4 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 54. Pacients sense millorança: percentatge d'expressió d'IL-4 en els cultius cel·lulars sense antígen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	5,51 ± 2,08	6,87 ± 4,50	1,24 ± 0,45
	T2	6,34 ± 6,59	8,11 ± 8,11	1,47 ± 1,54
	T3	5,98 ± 3,54	6,71 ± 3,85	1,23 ± 0,81
CD4	T1	7,11 ± 2,67	8,91 ± 5,91	1,24 ± 0,45
	T2	9,29 ± 10,03	10,67 ± 11,27	1,83 ± 2,70
	T3	7,69 ± 5,14	8,42 ± 5,45	1,20 ± 0,76
CD8	T1	2,39 ± 1,86	2,70 ± 1,98	1,62 ± 1,19
	T2	2,73 ± 1,77	2,86 ± 1,96	1,21 ± 0,48
	T3	2,55 ± 1,92	3,20 ± 2,34	1,61 ± 1,84

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IL-4 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.4.8.2 PRODUCCIÓ ESPECÍFICA D'IFN- γ

En general, la presència de *D pteronyssinus* als cultius donava lloc a una disminució de la producció d'IFN- γ (Taulas 55 i 56). En canvi, al cap d'un any, en els pacients que milloraven s'observava una resposta similar en els cultius control i en els estimulats amb *D pteronyssinus*. Aquest canvi s'acompanya d'un augment en l'índex de producció d'IFN- γ .

Taula 55. Pacients amb millorança: percentatge d'expressió d'IFN- γ en els cultius cel·lulars sense antigen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	D pteronyssinus	Índex
CD3	T1	22,63 \pm 8,90	18,93 \pm 9,00	0,82 \pm 0,26
	T2	23,55 \pm 6,10	18,05 \pm 8,71	0,90 \pm 0,16
	T3	18,19 \pm 8,68	17,44 \pm 8,31	0,98 \pm 0,29
CD4	T1	20,50 \pm 7,23	15,86 \pm 7,52	0,76 \pm 0,25
	T2	17,19 \pm 7,13	16,18 \pm 7,46	0,93 \pm 0,07
	T3	17,01 \pm 8,67	15,36 \pm 7,31	0,95 \pm 0,30
CD8	T1	27,01 \pm 13,59	25,38 \pm 14,63	0,91 \pm 0,34
	T2	22,59 \pm 9,87	23,21 \pm 12,86	0,96 \pm 0,26
	T3	20,90 \pm 9,93	23,05 \pm 13,52	1,07 \pm 0,32

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IFN- γ induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 56. Pacients sense millorança: percentatge d'expressió d'IFN- γ en els cultius cel·lulars sense antigen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	D pteronyssinus	Índex
CD3	T1	25,01 \pm 9,58	24,02 \pm 8,03	1,00 \pm 0,34
	T2	20,64 \pm 10,69	21,53 \pm 5,60	0,95 \pm 0,09
	T3	24,31 \pm 7,94	21,80 \pm 5,46	0,93 \pm 0,20
CD4	T1	21,46 \pm 7,80	19,74 \pm 7,70	0,95 \pm 0,34
	T2	19,57 \pm 5,98	17,97 \pm 4,97	0,93 \pm 0,13
	T3	19,55 \pm 6,30	16,98 \pm 4,12	0,90 \pm 0,22
CD8	T1	33,94 \pm 14,77	34,30 \pm 14,56	1,02 \pm 0,20
	T2	29,71 \pm 11,63	31,15 \pm 9,87	1,10 \pm 0,29
	T3	35,54 \pm 14,78	33,20 \pm 12,16	0,97 \pm 0,21

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IFN- γ induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.4.8.3 PRODUCCIÓ ESPECÍFICA D'IL-10

Quan s'estudiava l'expressió d'IL-10, es podia observar una menor producció en els cultius dels pacients que milloraven, en tots els temps i per totes les poblacions cel·lulars estudiades (CD3, CD4 i CD8) (Taula 57 i 58). Aquesta diferència quasi arribava a la significació estadística als sis mesos de l'estudi per als CD3 de forma global ($p=0,074$) i per als CD4 ($p=0,059$).

Taula 57. Pacients amb millorança: percentatge d'expressió d'IL-10 en els cultius cel·lulars sense antigen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	<i>D pteronyssinus</i>	Índex
CD3	T1	16,68 ± 6,77	19,25 ± 8,55	1,21 ± 0,39
	T2	14,52 ± 8,99	18,98 ± 8,21	1,60 ± 0,90
	T3	16,68 ± 8,51	15,01 ± 9,78	1,09 ± 0,75
CD4	T1	19,68 ± 8,32	23,51 ± 10,09	1,31 ± 0,53
	T2	17,56 ± 10,80	23,19 ± 9,82	1,60 ± 0,90
	T3	21,16 ± 10,05	18,46 ± 11,18	1,17 ± 1,05
CD8	T1	11,45 ± 4,52	11,50 ± 5,58	1,01 ± 0,23
	T2	8,79 ± 5,37	11,14 ± 5,32	1,56 ± 0,92
	T3	9,59 ± 5,72	8,86 ± 6,91	0,95 ± 0,35

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IL-10 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Taula 58. Pacients sense millorança: percentatge d'expressió d'IL-10 en els cultius cel·lulars sense antigen o amb *D pteronyssinus*

Població cel·lular	Temps	Control	D pteronyssinus	Index
CD3	T1	23,43 ± 10,24	20,59 ± 13,96	0,90 ± 0,34
	T2	25,78 ± 12,98	22,51 ± 10,63	0,97 ± 0,41
	T3	22,07 ± 8,29	22,15 ± 10,08	1,08 ± 0,44
CD4	T1	27,73 ± 10,47	24,31 ± 15,43	0,88 ± 0,35
	T2	29,65 ± 13,17	27,14 ± 11,87	1,01 ± 0,42
	T3	25,88 ± 9,34	26,53 ± 11,38	1,10 ± 0,47
CD8	T1	15,53 ± 9,13	12,15 ± 8,96	0,96 ± 0,26
	T2	16,98 ± 13,00	13,22 ± 8,21	0,88 ± 0,26
	T3	14,24 ± 7,08	12,59 ± 7,53	0,98 ± 0,44

A la columna "Índex" apareix el resultat de l'expressió d'IL-10 induïda pel *D pteronyssinus* dividit pel control. T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

Quan es comparaven els "índex" d'expressió específica d'IL-10, s'observava que al principi de l'estudi era superior en el grup que milloraria, especialment per a les cèl·lules CD4 ($p=0,040$), disminuint posteriorment aquesta diferència.

4.4.8.4 ÍNDEX ENTRE IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ I IL-4/IL-10 ESPECÍFIC PER *D Pteronyssinus*

Amb l'intenció de valorar conjuntament l'influència de l'expressió de les diferents citocines estudiades, es van establir unes relacions en la producció de les diferents citocines en els cultius estimulats amb *D pteronyssinus* : IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10. Els resultats es mostren a les Taules 59, 60 i 61.

La relació entre el percentatge de limfòcits que expressaven IL-4 i els que expressaven IFN- γ es va mantenir força constant en els dos grups durant l'estudi (Taula 59).

Taula 59. Índex d'expressió d'IL-4/IFN- γ específica per *D pteronyssinus* en els pacients amb millorança o sense millorança

		IL-4/IFN-γ	
		Millorança	No millorança
CD3	T1	0,38 \pm 0,31	0,38 \pm 0,47
	T2	0,41 \pm 0,43	0,39 \pm 0,37
	T3	0,42 \pm 0,53	0,35 \pm 0,34
CD4	T1	0,66 \pm 0,59	0,59 \pm 0,75
	T2	0,61 \pm 0,67	0,61 \pm 0,61
	T3	0,64 \pm 0,87	0,61 \pm 0,72
CD8	T1	0,13 \pm 0,11	0,10 \pm 0,10
	T2	0,13 \pm 0,20	0,10 \pm 0,07
	T3	0,16 \pm 0,16	0,10 \pm 0,09

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

S'observava una disminució de la relació entre el percentatge de limfòcits que expressaven IL-10 i els que expressaven IFN- γ en els pacients que presentaven millorança (Taula 60 i Fig. 70), sense arribar a la significació estadística.

Taula 60. Índex d'expressió d'IL-10/IFN- γ específica per *D pteronyssinus* en els pacients amb millorança o sense millorança

		IL-10/IFN- γ	
		Millorança	No millorança
CD3	T1	1,62 \pm 2,12	1,00 \pm 0,66
	T2	1,33 \pm 1,51	1,12 \pm 0,48
	T3	1,17 \pm 1,10	1,08 \pm 0,47
CD4	T1	2,16 \pm 2,48	1,45 \pm 0,99
	T2	1,66 \pm 1,49	1,65 \pm 0,74
	T3	1,53 \pm 1,18	1,65 \pm 0,61
CD8	T1	0,84 \pm 1,14	0,47 \pm 0,40
	T2	0,90 \pm 1,65	0,52 \pm 0,40
	T3	0,69 \pm 1,02	0,47 \pm 0,34

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

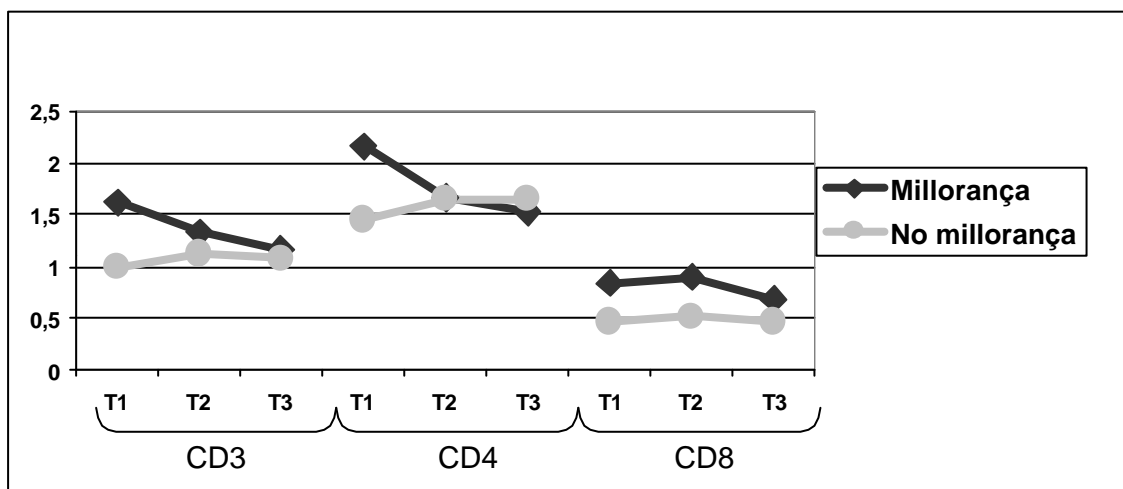


Figura 70. Índex d'expressió d'IL-10/IFN- γ específica per *D pteronyssinus* en els pacients amb millorança o sense millorança

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

En l'avaluació de l'índex entre els limfòcits que expressaven IL-4 i els que expressaven IL-10 (Taula 61) s'observava que augmentava en el grup amb millorança als 12 mesos comparat amb l'inici de l'estudi (Fig. 71), sense arribar a la

significació estadística.

Taula 61. Índex d'expressió d'IL-4/IL-10 específica per *D pteronyssinus* en els pacients amb millorança o sense millorança

		IL-4/IL-10	
		Millorança	No millorança
CD3	T1	0,36 ± 0,24	0,39 ± 0,26
	T2	0,41 ± 0,32	0,27 ± 0,26
	T3	0,62 ± 0,62	0,41 ± 0,42
CD4	T1	0,49 ± 0,43	0,43 ± 0,33
	T2	0,45 ± 0,35	0,30 ± 0,34
	T3	0,66 ± 0,63	0,46 ± 0,53
CD8	T1	0,23 ± 0,16	0,25 ± 0,19
	T2	0,29 ± 0,28	0,20 ± 0,10
	T3	0,48 ± 0,57	0,33 ± 0,45

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

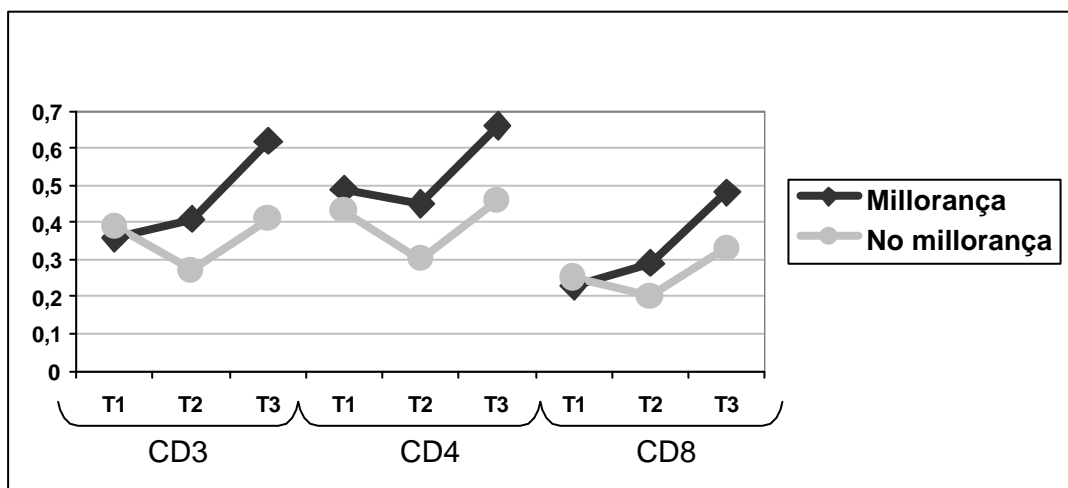


Figura 71. Índex d'expressió d'IL-4/IL-10 específica per *D pteronyssinus* en els pacients amb millorança o sense millorança

T1=inici de l'estudi; T2=6 mesos de l'estudi; T3=12 mesos de l'estudi.

4.5 RESUM DELS RESULTATS

A continuació s'exposen els resultats més significatius del treball realitzat, de forma conjunta i resumida. Es comparen els grups de pacients tractats amb IT o no (Taules 62), els canvis associats amb la IT (Taula 63), els associats amb la millorança (Taules 64 i 65) i les correlacions significatives (Taules 66, 67 i 68).

Taula 62. Resultats significatius en les proves cutànies i conjuntivals en el grup sense IT i amb IT

Paràmetre		No IT	IT	p
P. Cutànies 0,1 HEP/ml	T2	2,33 ± 1,50	1,06 ± 1,34	0,029
	T3	2,17 ± 1,40	0,69 ± 1,08	0,008
P. Cutànies 1 HEP/ml	T2	4,50 ± 1,78	2,47 ± 1,73	0,013
	T3	3,25 ± 1,29	1,63 ± 1,71	0,023
P. Conjuntivals	1 HEP/ml	92 %	50 %	0,039
	10 HEP/ml	8 %	50%	

Taula 63. Resultats significatius en els pacients que van rebre IT

Paràmetre	T1	T2	T3	p
FVC	86,44 ± 12,52	93,31 ± 10,92	-	0,022
VEMS	86,31 ± 14,83	95,69 ± 9,57	-	0,007
MEF	73,81 ± 21,02	84,94 ± 19,03	-	0,021
Símtomes	10,08 ± 8,01	-	6,67 ± 5,32	0,014
Medicació	3,12 ± 2,56	-	1,83 ± 1,56	0,006
IgE total	361,38 ± 389,39	526,56 ± 587,65	-	0,044
% LB CD23+	41,82 ± 10,76	58,91 ± 16,31	-	0,024
	41,82 ± 10,76	-	58,55 ± 15,33	0,024
% CD3+CD69+	85,54 ± 11,84	90,00 ± 5,97	-	0,008
	85,54 ± 11,84	-	93,43 ± 3,48	0,002
Índex proliferació	6,04 ± 3,94	-	3,69 ± 1,96	0,026

Taula 64. Millorança segons l'aplicació d'immunoteràpia

	Millorança	No millorança
Sense IT	3 (10,7%)	9 (32,1%)
Amb IT	13 (46,4%)*	3 (10,7%)
TOTAL	16	12

*p=0,004 associació positiva entre millorança i IT

Taula 65. Correlacions significatives (grup no tractat i tractat amb IT)

	r	p
Limfòcits B CD23+/Limfòcits T CD69+	0.261	0.039
Limfòcits T CD69+/Síntomes	-0.365	0.002
CD3+IL-4+/CD3+IFN-γ	0.316	0.009

Taula 66. Correlacions significatives en el grup tractat amb IT

	r	p
Limfòcits B CD23+/Limfòcits B CD86	-0.478	0.012
Limfòcits T CD69+/Index proliferació front Dpt	-0.449	0.009
Limfòcits T CD69+/Síntomes	-0.650	<0.001
Index proliferació front Dpt/ Síntomes	0.534	0.001

Taula 67. Resultats significatius en els pacients que van presentar millorança

Paràmetre	T1	T2	T3	p
FVC	85,81 ± 12,69	92,75 ± 9,94	-	0,005
VEMS	89,00 ± 11,83	97,13 ± 8,66	-	0,003
MEF	79,94 ± 16,39	90,38 ± 18,80	-	0,021
TBD	25%	0%	-	0,024
	25%	-	0%	0,024
Monòcits CD23+	9,89 ± 4,26	9,40 ± 4,5	-	0,020
	9,89 ± 4,26	-	10,22 ± 3,31	0,012
CD69	86,00 ± 12,27	90,33 ± 4,81	-	0,05
	86,00 ± 12,27	-	89,5 ± 7,28	0,017
Index proliferació	5,88 ± 4,05	-	3,25 ± 1,92	0,003

Taula 68. Correlacions significatives en el grup amb millorança

	r	p
Limfòcits B CD23+/Monòcits CD23	-0.442	0.008
Limfòcits B CD23+/Limfòcits B CD86+	-0.421	0.021
Limfòcits T CD69+/Index proliferació front Dpt	-0.415	0.016
Limfòcits T CD69+/Síntomes	-0.651	<0.001
Index proliferació front Dpt/ Síntomes	0.422	0.014

5 DISCUSSIÓ

5.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'ESTUDI

La hipòtesi que es formula en aquesta tesi és que la immunoteràpia amb al·lèrgens indueix canvis immunològics que es tradueixen bàsicament en la derivació d'una resposta de producció de citocines tipus 2 cap a una resposta de tipus 1.

Per tal de demostrar-ho, es va dissenyar un estudi de tipus prospectiu de casos i controls, obert, aleatoritzat, en el que el grup casos va rebre immunoteràpia mentre que el grup control no la va rebre. Es va considerar adient aquest disseny ja que es volien estudiar principalment paràmetres immunològics, el resultat dels quals no està influenciat per un efecte placebo. Per tan, no es va optar per un estudi prospectiu a doble cec controlat amb placebo que hauria estat el més correcte si el propòsit principal hagués estat demostrar l'efectivitat clínica de la IT específica, la qual cosa es considera suficientment demostrada en diversos estudis publicats^{196, 206, 207}. A més dels pacients al·lèrgics, també es va incloure un grup d'individus sans per tal d'obtenir valors de referència d'algunes de les determinacions immunològiques

Per tal d'avaluar si aquests canvis immunològics es relacionaven amb una resposta clínica, es van controlar una sèrie de paràmetres tal com símptomes, ús de medicació, proves cutànies, proves de provocació conjuntival i proves de funció respiratòria. Aquests paràmetres a l'inici de l'estudi foren similars entre el grup que havia de rebre immunoteràpia i el que serviria com a control.

Un dels principals problemes que van sorgir durant l'estudi fou el seguiment dels pacients durant dotze mesos. Encara que es pugui considerar que tres visites de control no haurien de comportar moltes molèsties per al pacient, el cert és que el

grau de faltes era relativament elevat i comportava reprogramar la visita en el menor temps possible per evitar modificacions del protocol d'estudi dissenyat inicialment. El pacient havia de ser contactat via telefònica i informat del nou dia de la cita. Ja que es realitzaven el mateix dia la visita clínica, les proves cutànies i de provocació conjuntival, les proves de funció respiratòria i l'extracció sanguínia, i també aquestes s'havien de tornar a programar de forma convenient. El fet de dur a terme totes les proves el mateix dia comportava que els participants a l'estudi havien d'estar un temps perllongat a l'hospital, el que a vegades dificultava la seva assistència. Es va intentar fer un control de pic de flux espiratori, però el compliment fou molt baix i es va descartar. En canvi, els pacients van aportar les targes de autoregistre de medicació i simptomatologia, segons s'els va indicar, a la majoria de casos.

Quan se seleccionen les eines per mesurar paràmetres de pacients al·lèrgics, amb asma o rinitis, s'ha de tenir en compte quin és el propòsit de l'estudi. Els qüestionaris de símptomes, útils per estudis epidemiològics i que requereixen una validació, moltes vegades no tenen la sensibilitat suficient per detectar petites modificacions en la intensitat dels símptomes, importants en estudis d'eficàcia de tractaments²⁷². La majoria d'estudis que mesuren modificacions dels símptomes d'asma ho fan mitjançant diaris de símptomes no validats i sense cap mesura de control intern per comprovar si mesuren el que es pretén²⁷³. En el nostre cas no es va realitzar una validació dels autoregistres, però sí que de forma subjectiva l'avaluador ho podia valorar, al comparar-los amb la necessitat de medicació durant aquell període.

La dificultat que comporta el seguiment dels pacients en un temps concret, així com el fet de que totes les tècniques "in vitro" d'un pacient es realitzessin de forma simultània al finalitzar l'any de seguiment, va comportar que s'hagués d'excloure de

l'estudi a algun d'ells, bé per no haver seguit de forma correcta els controls o bé perquè problemes en la realització de les tècniques immunològiques obligaven a descartar alguna de les mostres de cèl·lules obtingudes al llarg del seguiment.

Les tècniques realitzades en aquest estudi han comportat gran laboriositat. Així la inclusió dels 38 pacients ha implicat dur a terme un elevat nombre d'assajos. Per exemple, per cada individu al·lèrgic es realitzava un total de 27 determinacions de diferents citocines intracitoplasmàtiques, ja que es determinaven tres citocines (IL-4, IFN- γ i IL-10) en tres experiments d'estimulació amb PMA+I, en tres cultius amb antigen i tres cultius control. Això suposa un total de 756 anàlisi de citometries de flux només per les determinacions de citocines.

Cal destacar la importància de fer estudis de seguiment de tipus prospectiu per poder avaluar millor els resultats. Aquest tipus d'estudis són especialment útils en el cas de determinació de paràmetres "in vitro" que requereixen tècniques complicades i d'elevat cost, la qual cosa limita el nombre de possibles assajos a fer. En altres tipus d'investigacions, es possible incloure un gran nombre d'individus, la qual cosa permet crear grups molt homogenis que es diferencien únicament en alguna característica que ens interressi avaluar, com per exemple, el tractament aplicat. En aquesta tesi s'ha mesurat els paràmetres biològics dels mateixos individus des de la seva inclusió a l'estudi, abans de rebre IT o no, i durant un any, permetent comparar els resultats de cada grup amb la situació inicial.

Prèviament a la posada en marxa dels diferents assajos, es va haver de procedir a la estandardització de determinades tècniques. D'aquestes, destaquen els cultius cel·lulars amb antigen (determinació de la concentració òptima d'antigen per estimular la resposta de les CMN), tècnica de detecció de citocines intracel·lulars (inhibició del transport intracel·lular i permeabilització de la membrana cel·lular) i

detecció de citocines en cultius estimulats de forma específica.

5.2 ESTUDI CLÍNIC

Si la immunoteràpia indueix canvis immunològics sistèmics es lògic esperar que s'observin també modificacions a la reacció immunològica local de diversos òrgans com la pell o la conjuntiva, disminuint la seva reactivitat. Aquests possibles canvis es van estudiar amb proves cutànies i proves de provocació conjuntival.

A més, al actuar sobre els mecanismes patogènics de les malalties al·lèrgiques és plausible que es produeixi una milloria en paràmetres clínics malgrat que no es considerin directament dependents de la reacció immunològica. Així, també es van realitzar altres proves com les de funció respiratòria i de resposta broncodilatadora.

5.2.1 PROVES CUTÀNIES D'HIPERSENSIBILITAT A *Dermatophagoides pteronyssinus*

La disminució de la reactivitat cutània pot suposar una forma indirecta de mesurar la disminució de la resposta del sistema immunològic front a l'al·lèrgen. En els altres òrgans de xoc, tal com l'aparell respiratori, aquesta variació en la reactivitat davant l'al·lèrgen és més difícil de mesurar, ja que les proves de provocació són laborioses de realitzar, requereixen un aparatatge específic i no estan exemptes de risc.

La disminució de la reactivitat cutània front l'al·lèrgen en el curs de la IT específica ha estat avaluada per diversos autors. En el cas de la IT a inhalants s'han publicat estudis realitzats amb diferents al·lèrgens en els que els resultats obtinguts són discordants, ja que mentre alguns observen una disminució en la resposta^{225, 227, 232, 249, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285}, altres no troben una variació significativa^{286, 287, 288}. En el cas d'IT amb *Dermatophagoides* diversos treballs han mostrat que disminueix la resposta cutània^{232, 249, 275, 276, 284, 285}. En alguns casos es comprova una correlació entre la disminució de la reactivitat cutània i l'eficàcia del tractament.

En el cas de IT amb verí d'himenòpters, alguns autors han observat una negativització de les proves cutànies i han suggerit que aquest paràmetre podria ser utilitzat com a criteri d'interrupció del tractament²⁸⁹.

En el present estudi es van realitzar les proves cutànies amb quatre concentracions de l'extracte de *D pteronyssinus*. Igual que en altres estudis, es va optar per realitzar les proves amb unes concentracions determinades d'antigen^{225, 227, 275, 276, 277, 279, 283, 284}, enlloc d'arribar a la dilució que ja no indueix reactivitat cutània com han fet altres treballs²³², ja que així el procediment és més curt i requereix menys puncions cutànies. Els resultats d'aquestes proves van mostrar una disminució de la reactivitat cutània associada amb el tractament amb IT, tant quan es comparava amb la reactivitat basal abans d'iniciar el tractament com quan es comparava amb el grup control. De les concentracions emprades per fer les proves cutànies, la de 100 HEP/ml es mostrava poc discriminadora de la variació en la sensibilitat cutània, mentre que les de 0'1, 1 i 10 HEP/ml sí que permetien la seva detecció. Quan es feia una valoració d'aquests resultats segons si el pacient havia presentat millorança o no, es comprovava que la reducció de la reactivitat s'evidenciava tant en pacients del grup amb millorança com en el grup sense millorança. Per tant, suggereix que la modificació immunològica cutània, si bé es relacionava amb la aplicació de IT, no era paral·lela en aquest cas a la resposta clínica. També es podria argumentar que durant aquest període els pacients haguessin implementat unes mesures d'evicció de la pols més estrictes, però sembla poc probable, ja que tots els pacients van rebre les mateixes instruccions durant l'any que va durar l'estudi.

En canvi, Löfkvist *et al*, en un estudi on s'avaluava la reactivitat cutània després d'una any de tractament amb immunoteràpia a *D farinae*, demostraven una reducció de la reactivitat que a més es correlaciona amb la disminució dels símptomes de rinitis i la disminució de la reactivitat conjuntival²⁸⁴.

Pichler i col·laboradors descriuen en el seu treball una reducció de les proves cutànies realitzades amb tres concentracions (1, 3 i 10 HEP) d'un extracte de *D pteronyssinus* i *D farinae* en un seguiment de tres anys d'immunoteràpia específica a aquests àcars. La reducció ja s'objectiva al primer any d'estudi. No estudien la relació entre la modificació de la resposta cutània i l'evolució clínica dels pacients. Descriuen que aquells pacients que presentaven una sensibilització a algun altre al·lergen, no mostraven una modificació de la prova cutània a aquest segon al·lergen²⁷⁶.

5.2.2 PROVES DE PROVOCACIÓ CONJUNTIVAL

Hi ha pocs treballs publicats que estudiïn la variació de la resposta conjuntival al al·lergen durant la immunoteràpia. La major part d'estudis descriuen en els pacients al·lèrgics que reben immunoteràpia una disminució de la reactivitat conjuntival^{227, 242, 276, 283, 284, 290}. En el nostre estudi els pacients que havien rebut IT van mostrar una menor sensibilitat conjuntival a la provocació amb *D pteronyssinus* després d'un any de tractament, de tal manera que es precisaven concentracions majors d'antigen per obtenir una resposta positiva. Aquest resultat concorda amb el de Pichler *et al*²⁷⁶, que descriuen en un grup de pacients tractats amb IT a *D pteronyssinus* (50%) i *D farinae* (50%) durant tres anys, que al cap d'un any de tractament ja presentaven una disminució de la reactivitat tant conjuntival com a nivell cutani i persistia fins al tercer any. Löfkvist i col·laboradors també descriuen una reducció en un grup de pacients al·lèrgics *D farinae*²⁸⁴. Amb altres antígens com *Cladosporium herbarum*²⁸⁸, epiteli de gos²⁹⁰, *Parietaria judaica*²²⁷ i gramínies²⁸³ també s'ha objectivat una reducció de la resposta a la provocació conjuntival després de la IT. Aquesta disminució de la reactivitat conjuntival implica que la modificació induïda per la immunoteràpia sistèmica, repercuteix a nivell d'aquest "òrgan diana" de la reacció al·lèrgica, i reflectiria una menor sensibilitat que

explicaria la disminució dels símptomes de conjuntivitis.

5.2.3 PROVES DE FUNCIO RESPIRATORIA

Una modificació de la funció respiratòria en els pacients tractats amb IT podria reflectir l'efecte que aquest tractament té sobre l'inflamació a nivell bronquial, modulant la participació de les cèl·lules inflamatòries i la producció de mediadors, citocines i factors quimiotàctics que participen en els mecanismes fisiopatològics de l'asma bronquial.

En aquest treball hem observat en el grup tractat amb IT una milloria de la funció respiratòria mesurada mitjançant la espirometria basal forçada (FVC, VEMS i MEF) i la prova broncodilatadora. La milloria es feia significativa als sis mesos de IT, però al cap de l'any, malgrat que els valors eren superiors als de l'inici es perdia la significació estadística. Aquest fet no es pot atribuir a modificacions ambientals, com un augment en l'exposició al·lergen, ja que els àcars de la pols es consideren un al·lergen perenne i, a més, els pacients van ser inclosos dins l'estudi en diferents èpoques de l'any. Una possible explicació seria el major compliment de la medicació a les primeres fases de l'estudi, però dos fets van en contra d'aquesta possibilitat; primer, que si aquesta fos l'explicació, s'observaria també en el grup que no va fer IT, i segon, que quan es feia una avaluació segons si el pacient presentava millorança o no, eren els pacients amb millorança els que incrementaven la seva funció respiratòria (i el criteri millorança inclou la disminució de l'ús de medicació). Es possible que el nombre limitat de pacients inclosos a l'estudi resti poder estadístic, i que en aquest cas es fes més evident als 12 mesos.

L'efecte del tractament amb immunoteràpia sobre la funció pulmonar s'ha revisat en alguns treballs i els resultats són diversos. Alguns estudis avaluen la modificació de la hiperreactivitat bronquial específica^{217, 266, 288, 290, 291, 292, 293} o inespecífica^{217, 276, 294,}

i d'altres estudien la espirometria basal forçada²⁴⁹ o el pic de flux espiratori^{266, 287, 295}.

L'estudi publicat per Creticos *et al*²⁶⁶, mostrava durant tres anys de seguiment un pic de flux espiratori més elevat en el grup tractat amb immunoteràpia a *Ambrosia*. En un altre estudi d'Adkinson realitzat amb nens²⁹⁴, també s'observava una milloria lleugera del pic de flux espiratori en els pacients tractats amb IT. Els mateixos resultats s'han descrit en tractament amb IT sublingual²⁸⁷. En canvi, en l'estudi de Majori no s'objectivaven modificacions dels paràmetres de funció respiratòria (FEV1) després d'un any de tractament amb IT a *D pteronyssinus*²⁴⁹.

5.2.4 SÍMPTOMES CLÍNICS I ÚS DE MEDICACIÓ

Són nombrosos els estudis que avaluen l'eficàcia de la IT mitjançant la milloria dels símptomes i la disminució de l'ús de medicació, malgrat que no hi ha uns criteris unificats per mesurar aquests resultats. Alguns estudis utilitzen escales analògiques visuals^{286, 296}, mentre que altres fan servir escales de puntuació de símptomes i/o de fàrmacs utilitzats^{217, 227, 233, 249, 252, 276, 281, 283, 288, 294, 297, 298, 299, 312}. En aquesta tesi s'ha usat una escala de puntuació de símptomes i de medicació basada en la utilitzada per Creticos i col·laboradors²⁶⁶ (Veure Annexes 1 i 2), adequada als tractaments empleats en el nostre àmbit.

En la meta-anàlisi d'Abramson publicada per la Cochrane Library²⁰⁷, que va incloure 57 estudis aleatoritzats i controlats, es descriu que els pacients que rebien immunoteràpia tenien de forma significativa menys probabilitat de presentar un deteriorament del asma comparat amb els pacients tractats amb placebo (Odds Ratio 0.27, Interval de Confiança 95% 0.21-0.35, $p < 0.05$). La milloria era homogènia i significativa en els tractats amb extractes de pol·len i epíteli d'animals, mentre que era menor i més heterogènia en el cas de la IT a àcars del la pols possiblement per l'utilització d'extractes molt diversos (pols de casa, àcars, *D*

pteronyssinus, etc.). Alguns estudis inclosos en l'anàlisi no mostraven milloria amb el tractament actiu, o inclús descrivien un empitjorament^{300, 301}. En quant a l'ús de medicació també es descriu una disminució (Odds Ratio 0.28, Interval de Confiança 95% 0.19-0.42, $p < 0.05$), si bé tan sols 7 estudis mesuraven aquesta variable mitjançant escales de punts, mentre que 15 ho mesuraven com a disminució, manteniment o augment en l'ús de fàrmacs.

En el present estudi es va comprovar una disminució dels símptomes i de l'ús de medicació en els pacients tractats amb IT. La diferència no arribava a ser significativa quan es comparava el grup de pacients que havien rebut IT i els que no l'havien rebuda. No obstant, en els pacients en tractament amb IT la disminució en els símptomes i els requeriments de fàrmacs al llarg de l'estudi fou significatiu respecte a l'inici, la qual cosa no succeïa en el grup que no rebia IT.

Els primers estudis publicats sobre l'efecte de la IT en pacients al·lèrgics a la pols utilitzaven per al tractament extractes poc estandarditzats i a dosis possiblement inadequades. Tot i així estudis com el de Brunn (1941)³⁰² o el d'Aas (1971)²⁹¹, mostraven una milloria en els malalts que havien rebut IT a àcars de la pols comparat amb els que havien rebut placebo. Un cop caracteritzats els antígens dels àcars es van realitzar nous estudis amb extractes millor definits. El grup de Smith³⁰³ va publicar un estudi on l'administració d'IT s'associava a una milloria subjectiva de l'asma i de la rinitis, i a un inferior requeriment d'altres medicacions. D'Souza i col·laboradors³⁰⁴ en el seu treball mostren que la IT induïa una milloria en els símptomes d'asma, l'ús de medicació i la tolerància a la pols, encara que no es produïa una milloria subjectiva de la rinitis. En un altre assaig realitzat a doble cec, Warner *et al*²⁹³, obtenen que el 85% dels pacients vacunats presentaven una milloria dels símptomes d'asma i un 50% perdien la reactivitat tardana a la provocació bronquial específica. També el grup de Bousquet²⁷⁴ descriu una milloria

dels pacients asmàtics al·lèrgics als àcars de la pols tractats amb IT a *D pteronyssinus* que ve acompanyada d'una reducció a les proves cutànies de prick i de la sensibilitat a la provocació bronquial amb l'al·lergen. Un altre estudi a mencionar és el publicat per Haugaar *et al*²⁹⁵ en el qual van observar una disminució de l'ús de medicació i una milloria del pic de flux espiratori després de dos anys d'IT.

Altres estudis no han demostrat aquesta milloria clínica amb IT d'àcars de la pols³⁰⁵,³⁰⁶. Però aquests treballs són antics, de finals dels anys 70. Dels últims treballs publicats no en trobem cap que no mostri un resultat favorable del tractament amb immunoteràpia tal com es pot comprovar en les diferents meta-anàlisis^{206, 207, 307, 308}. Es pot pensar que és probable que abans, la utilització d'extractes pitjor purificats i estandarditzats que els actuals els hi conferís una menor eficàcia terapèutica. Segons la meta-anàlisi d'Abramson serien necessaris 33 estudis mostrant la no efectivitat de la immunoteràpia per compensar els resultats positius mostrats en els estudis que van avaluar²⁰⁶.

5.3 ESTUDIS “IN VITRO”

5.3.1 CONCENTRACIÓ SÈRICA D’IgE TOTAL I IgE ESPECÍFICA

El coneixement de la participació de la IgE a la reacció al·lèrgica i la simplificació de les tècniques de quantificació han fet que es plantegés utilitzar aquest paràmetre per a fer un seguiment del tractament amb IT.

Alguns estudis descriuen durant el tractament amb IT un augment de la concentració sèrica d’IgE en les fases inicials, que va seguida posteriorment per una tornada als nivells pre-tractament^{279, 284, 286,297, 299, 309, 310}. Aquest fenomen es pot observar tant amb la IgE total com amb la IgE específica. En els pacients pol·línics tractats amb IT s’ha descrit una inhibició de l’augment estacional de la IgE³¹¹. A llarg termini, en ocasions s’observa una disminució de la IgE específica per sota dels nivells inicials. Aquestes variacions no són homogènies en tots els estudis^{225, 227, 274, 283, 312}.

En l’estudi de Löfkvist i col·laboradors, on es mesurava l’efecte de la IT amb *D farinae* en un grup de pacients amb rinoconjuntivitis i es comparava amb un grup control, s’observava una disminució significativa de la IgE específica en el grup en tractament actiu a partir dels 5 mesos, encara que no es va correlacionar amb les variables clíniques estudiades (proves cutànies, conjuntivals o símptomes)²⁸⁴. A l’estudi del grup de Movérare s’observava que el tractament amb IT amb una pauta ràpida amb pol·len de bedoll o de gramínies s’associava a un augment de la IgE total als 2 mesos i de la IgE específica després d’una setmana de tractament comparat amb un grup control que no rebia IT. Posteriorment s’observava una disminució progressiva de la IgE específica en el grup amb IT²⁷¹.

En el present estudi, es registra un augment significatiu de la IgE total en els

pacients que rebien IT al mig any d'haver iniciat el tractament i també s'observa un augment paral·lel de la IgE específica. Aquesta elevació podria explicar-se per l'estímul antigènic que suposa l'administració repetida de l'al·lergen a dosis baixes en les fases inicials, mentre que la disminució posterior podria significar la modificació immunològica cap a la tolerància del al·lergen. L'exposició a antígens en petites dosis s'ha relacionat amb el desenvolupament de respostes immunològiques del tipus TH2^{94, 103}. En canvi, a mesura que aquestes dosis es van incrementant s'arriba a un efecte tolerogènic.

5.3.2 VALORS D'EOSINOFILIA PERIFÈRICA

A les malalties al·lèrgiques la participació dels eosinòfils té gran importància en el desenvolupament de la reacció inflamatòria. Per exemple, en l'asma, on s'observa freqüentment una eosinofilia sanguínia, els eosinòfils tenen també un paper important en la inflamació bronquial crònica. A més, la IL-5, una de les citocines de tipus Th2 relacionada amb les malalties al·lèrgiques, és indispensable per la diferenciació i supervivència dels eosinòfils.

En aquest estudi, no es van observar modificacions en la eosinofilia perifèrica en cap dels grups de pacients (tractats o no amb IT). De fet, els estudis publicats sobre les modificacions immunològiques que tenen lloc durant el tractament amb IT no consideren la eosinofilia sanguínia un paràmetre a estudiar, i no s'hi han descrit variacions. En canvi, si s'ha observat que la IT indueix una disminució dels eosinòfils presents en els òrgans diana. Així s'ha descrit una disminució d'eosinòfils en la reacció cutània tardana a pol·len de gramínies^{213, 214}, en el rentat nasal post-provocació²¹⁵, a la mucosa nasal post-provocació²¹⁶, i al BAL de pacients al·lèrgics a *Betula*²⁰⁸.

En el present estudi crida l'atenció que, a la determinació realitzada al cap de sis

mesos de seguiment, s'observava una menor eosinofilia en els pacients sense immunoteràpia. Aquest fenomen podria haver-se degut a un major ús per aquests pacients de medicació. No obstant, l'ús de medicació (inclosos els corticoides inhalats) en el grup de pacients que no va rebre IT no fou més elevada en aquest punt de l'estudi. No hi va haver cap pacient que precisés corticoteràpia sistèmica

5.3.3 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CD23 I CD86 EN CÈL·LULES PRESENTADORES DE L'ANTIGEN

Un possible mecanisme d'actuació de la immunoteràpia seria mitjançant modificacions en l'expressió de molècules de superfície de les cèl·lules presentadores de l'antigen, quan amb la IT aquest antigen entra en contacte amb l'individu d'una forma diferent a l'exposició ambiental natural. És possible doncs, que l'al·lergen que penetra per una via distinta, a unes dosis més elevades, amb un ritme d'exposició diferent, impliqui a CPA's diferents a les de les mucoses respiratòries, o que tot i ser del mateix tipus, modifiquin el senyal transmès a les cèl·lules T. El desenvolupament d'un tipus determinat de resposta està en funció entre d'altres condicionaments del tipus de CPA així com l'expressió de diferents molècules coestimuladores i de la producció de diverses citocines^{74, 88, 94, 97, 98}. S'ha proposat que el receptor de baixa afinitat per la IgE (CD23) a través de la IgE fixada podria afavorir la presentació de l'antigen^{46, 47, 48}.

Per comprovar si la IT podia modificar les cèl·lules coestimuladores expressades a la superfície de les CPA, s'han estudiat en aquest treball l'expressió de CD23 i de CD86 (B 7.2) en monòcits i en limfòcits B obtinguts de sang perifèrica.

En concordància amb publicacions prèvies, els pacients atòpics presentaven una major percentatge monòcits que expressaven CD23 en comparació amb els individus sans^{70, 313}. És possible que aquesta major expressió de CD23 en els

monòcits afavoreixi la presentació antigènica mediada per complexes IgE/CD23 i que activi una resposta per part de les cèl·lules T del tipus TH2, i que per això aquestes individus desenvolupin preferentment una resposta inflamatòria de tipus al·lèrgic enfront dels antígens. Una altra possibilitat és que participi en els processos de fagocitosi previs a la presentació antigènica⁵⁴. Aquesta major expressió de CD23 en els monòcits dels pacients al·lèrgics pot ser deguda a l'increment d'IL-4 i de la IgE que regulen la seva expressió⁵¹.

En aquesta tesi, el tractament amb IT s'associava a un increment en el percentage de limfòcits B que expressaven CD23 i a una disminució del percentage de monòcits que l'expressaven. La disminució de monòcits que expressaven CD23 també es va observar en els pacients que presentaven millorança. Així, aquestes modificacions s'associaven tant a l'ús de la IT com a la milloria clínica dels pacients. Aquest resultat està en contradicció amb els del grup de Gagro que van observar una reducció en l'expressió de CD23 en cèl·lules B de sang perifèrica de pacients tractats amb IT a *D pteronyssinus*³¹⁴. En el mencionat estudi el seguiment fou tan sols de sis setmanes, mentre que en aquesta tesi els controls es van dur a terme als 6 i dotze mesos. Un altre estudi fet per Jung amb pacients que van rebre IT a pol·len de gramínies també associava una disminució de l'expressió de CD23 en cèl·lules B en pacients amb bona resposta a la IT quan es comparen els resultats abans i després de la IT³¹⁵. En aquest cas, els limfòcits B foren estimulats amb pol·len de gramínies o antígens control. A diferència d'aquesta tesi, en aquest treball els pacients eren vacunats amb un al·lèrgen estacional (pol·len de gramínies) en una pauta pre-estacional.

Els resultats obtinguts estan en concordança amb els de Corominas i col·laboradors, els quals van estudiar l'expressió de CD23 en els limfòcits B en dos grups de pacients atòpics, un no tractat i l'altre tractat amb IT. En el seu estudi, no

van trobar una diferència significativa en l'expressió de CD23 en els limfòcits B, si bé el percentatge de cèl·lules CD20+/CD23+ era més elevat en el grup de pacients que havia rebut IT³¹⁶.

En la revisió de la bibliografia mèdica, no s'han trobat publicacions que avaluessin la modificació de l'expressió de CD23 en monòcits amb el tractament amb immunoteràpia. El CD23b expressat en els monòcits és important en la fase efectora de la immunitat IgE mediada. La unió de complexos IgE/al·lèrgen al CD23 indueix l'entrecruament del receptor i activa l'alliberament de mediadors proinflamatoris i citocines^{317, 318}. Cal destacar que en aquest treball, l'administració d'IT i la milloria dels paràmetres clínics es van associar a una disminució en l'expressió de CD23 en els monòcits. Aquest fet suggeriria que un possible mecanisme d'actuació de la IT seria la menor activació d'aquestes cèl·lules, amb una reducció de la seva capacitat d'actuar com a CPA i com a iniciadores de la inflamació al·lèrgica. Una altra hipòtesi seria que aquesta disminució en el CD23 de superfície s'acompanyés d'una reducció en el CD23s, que està implicat en la modulació de la producció d'IgE i que es traduiria en una reducció d'aquesta.

El senyal co-estimulador establert per les molècules B7 de la CPA al interaccionar amb el CD28 de les cèl·lules T es fonamental per l'activació d'aquestes. Estudis recents suggereixen que el CD86 (B7.2) pot influir en el desenvolupament de respostes del tipus TH2^{319, 320}. En un estudi publicat per Hofer *et al*, els pacients asmàtics al·lèrgics presentaven una major expressió de CD86 en les cèl·lules B implicades en la presentació antigènica³²¹. El grup de Morikawa va evidenciar una major expressió de CD86 en limfòcits B de pacients amb pol·linosi per cedre, acompanyada d'una major producció d'IL-4 i una menor producció d'IFN- γ que en pacients no atòpics³²². L'associació entre la major expressió de CD86 en cèl·lules B de pacients al·lèrgics a D pteronyssinus també va ser descrita per Van Neerven *et*

$aI^{\beta 23}$, amb un model d'estimulació específica amb antigen.

En el nostre treball no es va comprovar una diferència significativa entre els pacients al·lèrgics i els individus sans, però si es va observar una disminució en el percentatge de cèl·lules B CD86+ en aquells pacients tractats amb IT, és a dir, una aproximació cap a l'estat "no atòpic", segons els autors prèviament citats. Aquesta menor expressió de CD86 pot modular la presentació antigènica i que no s'activi la cèl·lula T cap a una resposta al·lèrgica. No s'han trobat altres treballs a la recerca bibliogràfica que haguessin investigat la modificació de l'expressió de CD86 en cèl·lules B durant la IT.

5.3.4 ESTIMULACIÓ LIMFOCITÀRIA AMB PMA I IONOMICINA I DETECCIÓ DE CITOCINES INTRACEL·LULARS IL-4, IFN- γ I IL-10

Treballs recents suggereixen que l'habilitat de les cèl·lules T efectores o de memòria per produir una citocina en concret està molt influenciada per les condicions microambientals presents en el moment de la seva activació. Els primers estudis sobre les citocines produïdes per les cèl·lules T es van dur a terme en clones cel·lulars. Les clones s'establien mitjançant cultius de CMN estimulades repetidament amb antigen, IL-2, limfòcits autòlegs irradiats i PHA. Aquestes manipulacions dels cultius de llarga durada, necessàries per clonar cèl·lules T, podrien modular el tipus de citocines sintetitzades per les clones resultants. En canvi, mitjançant la determinació de citocines intracel·lulars de CMN de sang perifèrica o de cultius obviem aquest inconvenient d'haver d'afegir IL-2 que pot modificar la producció de citocines.

L'estimulació és imprescindible per poder detectar les citocines intracel·lulars, per que només en les cèl·lules CD69+ (estimulades) poden determinar-se aquestes

citocines intracel·lulars^{254, 324}.

Un dels problemes que van sorgir a l'inici de l'estudi fou que quan van realitzar-se els primers experiments de determinació de citocines per citometria de flux, no es detectaven cèl·lules CD4+. Aquest fenomen ha estat descrit per altres autors^{328, 325, 326} i s'atribueix a alteracions de l'expressió del CD4 a la superfície cel·lular, induïdes per l'exposició a la PMA+I, que provoca que no sigui possible el posterior marcatge de d'aquesta molècula amb anticossos monoclonals. Això va implicar marcar les subpoblacions de limfòcits T amb CD8, i assumir que les cèl·lules CD3+ CD8- corresponien a les CD4+.

En general, el nombre de cèl·lules positives per IL-4 era molt baix, així que la sensibilitat del mètode pot resultar insuficient per detectar diferències significatives en certs experiments. Els percentatges de cèl·lules positives per cada citocina concorden amb els d'altres autors^{327, 328, 329}.

En humans s'ha especulat que entre les cèl·lules TH1 i les TH2 existeix tot un ventall de diferents fenotips que produeixen diferents combinacions de citocines. Així es va avaluar la possibilitat, i es van realitzar un total de 19 experiments per estudiar la possible expressió simultània d'IL-4 i IFN- γ . La mitjana de cèl·lules que expressaven les dues citocines era 0,77. Aquest baix percentatge ens va suggerir que no era un fet freqüent, i es va decidir no continuar determinant aquesta co-expressió. Aquest resultat està d'acord amb els estudis publicats per Picker *et al*³²⁹, on pràcticament no es van trobar cèl·lules que expressessin simultàniament IL4 i IFN- γ . Això ens indica que aquest dos fenotips de cèl·lules T són diferents i mútuament excloents, i recolza l'última definició dels limfòcits TH2 que són aquells que produeixen IL-4, sense contemplar la producció d'altres citocines⁸⁶.

Una altra característica fou la subpoblació de cèl·lules T que produïa cada tipus de

citocina. Així la IL-4 es detectava preferentment en les cèl·lules CD4+ i l'IFN- γ a les CD8+.

5.3.4.1 ESTUDI EN PACIENTS ATÒPICS I INDIVIDUS SANS

Els resultats de l'expressió de CD69, com a marcador d'activació cel·lular, mostraven que els limfòcits dels pacients atòpics presentaven un menor percentatge d'activació. Aquesta troballa podria significar que els limfòcits d'aquests pacients presenten un dèficit funcional intrínsec i que la seva resposta front certs estímuls és diferent de la dels individus sans. A la revisió de la bibliografia, no s'han trobat treballs que hagin explorat aquest fenomen directament. Només el grup de Segura descriu una menor expressió de CD69 en limfòcits CD3 després d'estimulació amb PMA+I en pacients al·lèrgics a verí d'abella²⁵⁴.

En el present estudi també es va observar que els pacients al·lèrgics tenien una inferior producció d'IL-4 i IFN- γ , malgrat que les diferències no eren significatives. Aquests resultats no s'ajusten al model clàssic segons el qual la malaltia al·lèrgica seria un trastorn caracteritzat per citocines TH2 com la IL-4, amb una baixa expressió d'IFN- γ .

Els estudis de Magnan *et al*³²⁸ tenien un disseny experimental similar al del treball d'aquesta tesi ja que feien detecció de citocines intracel·lulars després d'estimulació amb PMA i ionomicina, si bé es detectaven en sang total enlloc de cèl·lules mononuclears. Els autors descriuen una capacitat disminuïda de les cèl·lules T per produir IFN- γ en els pacients atòpics. En canvi, no troben diferències en la producció d'IL-4 entre individus normals, atòpics no asmàtics, asmàtics no atòpics o asmàtics atòpics. No obstant si que descriuen una major producció d'IL-4 en pacients atòpics quan es determinava en els sobrenedants dels cultius. Altres treballs realitzats en població infantil descriuen una baixa producció d'IFN- γ en nens

asmàtics i/o atòpics. Per exemple, el grup de Tang³³⁰ va examinar la producció d'IL-4 i IFN- γ en cultius de cèl·lules mononuclears estimulades amb fitohemaglutinina (PHA). En un grup de pacients definits com a moderadament atòpics (asma lleu intermitent o eczema lleu i IgE inferior a 600 U/mL), no troben diferència en quan a la producció d'IL-4 ni IFN- γ comparant amb control sans. En canvi, en un grup de nens molt atòpics (eczema atòpic en brot agut i IgE total > 600 U/mL), si que troben una major producció d'IL-4 i una menor d'IFN- γ , amb una bona correlació entre IL-4/IFN- γ i la IgE sèrica total. És possible que en aquest treball l'augment de l'índex IL-4/IFN- γ es relacionés amb la activitat de la dermatitis atòpica o amb els nivells d'IgE, més que amb la malaltia respiratòria.

El grup de Smart *et al* va estudiar la producció de citocines per CMN de sang perifèrica estimulades de forma inespecífica amb superantigen d'estafilococ. Aquest grup descriu una menor producció d'IFN- γ en el grup de pacients al·lèrgics comparat amb els no al·lèrgics. En canvi, la producció d'IL-4 i IL-5 era més elevada. Curiosament, en la estimulació amb al·lergen s'objectivava una major producció d'IFN- γ , IL-5 i IL-13 en els pacients atòpics de forma significativa comparat amb els no atòpics³³¹.

En un estudi comparatiu de l'expressió d'IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 i IFN- γ entre pacients asmàtics atòpics i individus normals, el grup de Cho només va evidenciar diferències en la producció d'IFN- γ (tant en cèl·lules CD4+ com en CD8+) que era major en els individus al·lèrgics que en els no al·lèrgics³³².

Krug i col·laboradors³²⁷ van comparar l'expressió intracel·lular d'IL-4 i IL-5 després d'estimulació amb PMA + ionomicina en nens (amb una mitjana d'edat de 9 anys) i adults (mitjana d'edat 33 anys) dividits en atòpics asmàtics, atòpics sense asma i controls sans aparellats per edat. Van descriure que en els nens atòpics amb asma

o sense asma hi havia una major expressió d'IL-4 quan es comparava amb nens sans. Així mateix, els atòpics asmàtics expressaven més IL-5 que els no asmàtics. No obstant aquestes diferències no s'observaven en població adulta. En el treball de Jung *et al*³²⁵ es va comparar un grup de 23 pacients nens i adults atòpics (asmàtics i/o afectes de dermatitis atòpica) amb un grup de voluntaris sans (14 individus). El protocol experimental consistia en determinar l'expressió intracel·lular d'IL-4, IL-2 i IFN- γ després d'estimulació amb PMA + Ionomicina. Descriuen una expressió inferior d'IFN- γ en limfòcits CD4+ dels pacients atòpics comparats amb els controls sans. No es va observar cap diferència en les cèl·lules T CD8+. L'expressió d'IL-4 fou similar en ambdós grups.

Així doncs, l'edat de la població d'estudi (nens o adults), el tipus de patologia atòpica (asma o dermatitis atòpica), el mètode de determinació de les citocines (en sobredants, intracel·lular, etc.), i la possibilitat de definir el tipus de cèl·lula productora de la citocina, poden variar considerablement el resultat de l'estudi. A més hem de tenir en compte que quan es determina ARN, no implica que s'arribi a traduir en proteïna, ni la presència intracel·lular de la mateixa implica la seva secreció a l'exterior. A més, la detecció de citocines intracel·lulars mitjançant citometria de flux es tracta d'un mètode qualitatiu però no quantitatiu, que detecta que una cèl·lula produeix aquella citocina però no la quantitat.

Un altre fet a destacar, que mostren diverses publicacions, és que cada citocina actua mitjançant diverses activitats biològiques que poden ser pro o antiinflamatòries segons la concentració, el tipus de cèl·lula responedora a la seva activitat, i el moment en que actua dins la resposta immune. Aquestes proteïnes tenen efectes pleiotròpics i no es pot reduir la seva acció de forma simplista a un model d'accions oposades. Aquest fet també explicaria els diferents resultats de treballs que aborden un mateix problema amb dissenys experimentals diferents.

En aquest treball, l'expressió d'IL-10 en els limfòcits T era més elevada en els pacients al·lèrgics estudiats comparat amb els individus no al·lèrgics. Aquesta citocina fou inicialment considerada com una citocina pròpia de les respostes tipus TH2, denominada factor inhibidor de la síntesi de citocines, ja que actua inhibint l'activació i la producció de citocines per cèl·lules Th1^{333, 334}. Posteriorment s'ha vist que pot tenir una acció reguladora. Així s'ha vist que inhibeix la producció d'IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TNF- β i Mip-1 α per part de diverses cèl·lules que participen en reaccions inflamatòries^{118, 335}. A més pot modular l'activació de clones Th0, Th1 i Th2^{117, 118, 336}. S'ha vist que també la IL-10 redueix la proliferació antigen-específica de cèl·lules T per disminució de la capacitat de presentació de l'antigen pels monòcits³³⁵. Un mecanisme important mitjançant el qual la IL-10 inhibeix l'activació de les cèl·lules T és la reducció de l'expressió de MHC classe II per les cèl·lules presentadores d'antigen, a través d'un bloqueig en l'exocitosi i reciclatge del MHC^{337, 338}. Els diferents estudis publicats sobre l'expressió d'IL-10 per pacients al·lèrgics no són unànimes a l'hora d'establir si és major o menor que en la població sana.

Koning i el seu grup van estudiar nens fins als 4 anys amb asma al·lèrgica, asma no al·lèrgica o dermatitis atòpica, així com un grup de controls sans. Van descriure una expressió disminuïda de ARNm per IL-10 en cèl·lules T en els nens amb asma, tant al·lèrgica com no al·lèrgica, i en els nens amb dermatitis atòpica, malgrat que quan es valorava en CMN totals de sang perifèrica només es trobava una disminució significativa en pacients amb asma al·lèrgica³³⁹. En aquest treball es planteja la qüestió de si la menor expressió d'IL-10 per cèl·lules T es devia a una manca de supressió del procés inflamatori. Aquests resultats difereixen dels d'aquesta tesi, però s'ha de tenir present que les poblacions estudiades són diferents en quant a edat, i la metodologia, també és diferent ja que en els experiments de Koning es

realitzava determinació de ARNm mentre que en aquest treball es detectava la citocina intracitoplasmàtica.

Kenyon i col·laboradors van comparar tres grups d'individus adults: uns asmàtics al·lèrgics, uns amb rinitis al·lèrgica i controls sans. Va observar una menor producció d'IL-10 per CMN estimulades amb PHA, mesurada per ELISA, en els al·lèrgics amb asma o amb rinitis³⁴⁰. Aquest resultat coincideix amb el de Borish i col·laboradors, que van estudiar un grup de pacients asmàtics, si bé en aquest treball la determinació es va realitzar en BAL o en resposta a estimulació amb lipopolisacàrid de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica³⁴¹. En canvi, Robinson *et al* van mostrar un augment del ARNm per IL-10 en cèl·lules de BAL de pacients asmàtics atòpics simptomàtics quan es comparava amb controls no asmàtics, així com un augment en l'expressió d'IL-10 després de la provocació bronquial amb al·lergen.

Cal remarcar que tots aquests treballs analitzen la producció de citocines mitjançant l'estimulació inespecífica amb un mitogen potent, i que per tant, no és selectiu sobre les cèl·lules específiques d'antigen. Per tant és lògic esperar que no hi hagin diferències significatives en la producció de citocines entre sans i atòpics, ja que en cap cas s'ha demostrat que els individus al·lèrgics presentin un dèficit immunitari. Si que hem observat en aquesta tesi una menor activació cel·lular (segons l'estudi d'expressió de CD69), que pot comportar una menor producció d'IL-4 i IFN- γ , la qual cosa podria explicar les discrepàncies dels estudis.

5.3.4.2 ESTUDI EN PACIENTS AL·LÈRGICS EN FUNCIÓ DELS PARÀMETRES IT I MILLORANÇA

En el nostre treball hem observat que els pacients al·lèrgics presentaven una menor activació de les cèl·lules T quan s'estimulaven amb PMA+I. Aquest fet

concorda amb la correlació negativa que es va trobar entre la puntuació de símptomes i l'expressió de CD69, es a dir, quan més símptomes presentava l'individu més baixa era la capacitat d'activació de les cèl·lules T. Quan s'avaluava després d'un any, el grup que havia rebut IT augmentava la capacitat d'activació de les cèl·lules T que s'equiparava pràcticament al dels individus no al·lèrgics. En canvi, els pacients que no van rebre IT mantenien la diferència. També resulta molt interessant el fet que si l'anàlisi es feia segons si el pacient presentava millorança o no, també s'observava un augment en la capacitat de les cèl·lules T de ser estimulades, quasi fins a arribar als nivells del individus no al·lèrgics, a diferència dels que no milloraven. L'associació d'aquesta major resposta de les cèl·lules T amb el tractament amb al·lèrgen i amb la milloria, suggereix que aquesta modificació pugui estar implicada en l'efecte immunològic subjacent de la milloria clínica. El CD69 es un proteïna de superfície que s'expressa de forma precoç després de l'activació dels limfòcits³⁴². Així, aquesta major capacitat de resposta dels limfòcits T podria implicar la producció de citocines o altres mediadors amb una funció reguladora que reduís la resposta al·lèrgica.

Amb les tècniques utilitzades en aquesta tesi, no s'ha evidenciat una diferència en la producció inespecífica d'IL-4, IFN- γ ni IL-10 durant el tractament amb IT ni quan es comparaven els pacients que l'havien rebut amb els que no. Tenint en compte que sembla rellevant l'equilibri entre les citocines es van establir els índex IL-4/IFN- γ , IL-10/IFN- γ i IL-4/IL-10, però tampoc es van demostrar diferències en aquests paràmetres. S'ha de tenir en compte que aquesta tècnica d'estimulació amb PMA+I es tracta d'una activació policlonal potent sobre el total de CMN, la qual cosa pot justificar que no es trobin diferències en la producció de citocines ja que el percentatge de cèl·lules específiques per l'al·lèrgen és molt baix.

En canvi, altres grups si que han trobat modificacions en la producció de citocines.

Per exemple, el grup de Bellighausen²⁴⁰ estudia mitjançant citometria de flux, després d'estimulació amb PMA+I, la producció de citocines abans d'iniciar la IT i quan s'arribava a la dosis de manteniment, en pacients vacunats amb verí d'abelles o vespes. Descriuen un augment en el nombre de cèl·lules que produeixen IFN- γ sense variació en el nombre de cèl·lules productores d'IL-4. Aquests resultats contrasten amb la producció induïda per al·lèrgen que ocasionava un increment en la secreció d'IFN- γ , IL-10 i una disminució en la d'IL-4.

5.3.5 CULTIUS CEL·LULARS

La finalitat de la IT és induir canvis en el sistema immunològic de l'individu. En el cas dels limfòcits T, aquests canvis es concretaran a les cèl·lules T específiques per l'antigen, les quals constitueixen un percentatge molt petit dins del total de CMN. Per tant, és important estimular la funcionalitat d'aquestes cèl·lules mitjançant l'antigen amb el que aquell individu ha mostrat que presenta hipersensibilitat. Per demostrar que aquesta estimulació així com la producció de citocines era específica, les CMN també es van estimular amb TT i es va comparar la resposta front a cada antigen.

5.3.5.1 ASSAJOS DE PROLIFERACIÓ LIMFOCITÀRIA

Tots els individus al·lèrgics van mostrar proliferació limfocitària específica front al *D. pteronyssinus* que posteriorment disminuïa en els que havien rebut IT. També la millorança va associar-se a la disminució de l'índex de proliferació. El grup d'Akdis descriu la disminució de la proliferació front a fosfolipasa A₂ (PLA) en pacients que havien rebut IT amb verí d'abella, mentre que la proliferació front a un altre antigen no relacionat (toxoides tetànics) no es va modificar²³¹. També Lack i col·laboradors demostren que la resposta immunològica a la IT és específica per l'al·lèrgen emprat²³². No obstant en cap d'aquests treballs es va avaluar la possible associació

amb l'eficàcia clínica de la IT. En els pacients d'aquesta tesi la disminució de la proliferació front l'antigen s'associava a la millorança, i això indica que pot estar vinculat als mecanismes subjacents a la modificació de la resposta al·lèrgica. Aquest resultat concorda amb el del grup de Lu, que van descriure que la disminució de les respostes proliferatives front a *D pteronyssinus* no succeïa en tots els pacients que havien rebut IT sinó amb aquells que van presentar una bona resposta clínica²⁴⁷.

Altres grups també descriuen aquesta disminució de la proliferació^{242, 343}. Els mecanismes que indueixen aquesta anèrgia de les cèl·lules T específiques per l'al·lèrgen no estan ben determinats. El fet que la proliferació es pugui restablir mitjançant l'addició d'IL-2 o IL-15 fan pensar que no es produeix una delecció de les cèl·lules T específiques per l'antigen²³¹. "In vitro" es pot induir anèrgia de cèl·lules T específiques mitjançant el tractament amb pèptids³⁴⁴ o si s'estimula el TCR sense altres senyals coestimuladors^{345, 346}. Els treballs d'Akdis mostren que la IL-10, una citocina supressora de la proliferació de cèl·lules T i de la resposta mediada per citocines, té un paper regulador en la inducció de tolerància a antigens durant la IT³⁴⁷. La generació d'IL-10 pot produir-se en poblacions de cèl·lules T reguladores induïdes durant el tractament amb IT^{81, 258}. Es possible que modificacions en les CPA, induïdes per les altes dosis d'antigen, la via d'administració, etc., alterin els segons senyals imprescindibles per activar les cèl·lules T. Una altra possibilitat és que actuïn com a CPA tipus cel·lulars diferents que transmetin un senyal anergitzant en aquestes condicions.

5.3.5.2 CANVIS EN LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES PELS CULTIUS ESTIMULATS AMB *D pteronyssinus*

A part de les modificacions directes de l'activació de les cèl·lula T que s'associen a la IT, a l'actualitat existeix evidència que la IT pot canviar el tipus de citocines que

es produeixen en l'estat al·lèrgic. Tal com exposa Larché en una editorial, la IT té múltiples efectes en diferents poblacions de cèl·lules T, alguns molt evidents i d'altres més subtils³⁴⁸. Els més profunds poden estudiar-se mitjançant estimulació amb mitògens, mentre que els més lleugers s'han d'estudiar amb respostes al·lèrgen-específiques. Els estudis de producció de citocines per CMN de sang perifèrica després de l'estimulació amb al·lèrgen són complicats degut als baixos nivells de citocines produïdes, especialment IL -4. Per tant, seguint un protocol d'estimulació amb l'al·lèrgen i posterior estimulació amb mitògens, tal com havien fet prèviament altres grups^{241, 245, 269, 270, 271}, es va amplificar la resposta de les CMN, per magnificar les possibles diferències. Es considerà que, malgrat l'estimulació amb PMA+I produeix una important estimulació policlonal, després de 6 dies de cultiu amb antigen ja hi ha cèl·lules específiques que han proliferat arribant a un percentatge rellevant dins el total de CMN. L'especificitat en la producció de citocines es va comprovar comparant amb la resposta front a un al·lèrgen diferent com el TT.

Ja que tal com s'ha demostrat en models animals de malalties al·lèrgiques, les cèl·lules T CD8 són importants immunoreguladores, i que el seu paper en la fisiopatogènia d'aquestes malalties en humans encara és poc coneguda^{349, 350}, es van estudiar les citocines produïdes per les CD8, a més d'estudiar les produïdes per les cèl·lules CD4.

En les investigacions d'aquesta tesi es va comprovar que les CMN cultivades amb *D pteronyssinus* mostraven un augment en les cèl·lules que expressaven IL-4 i una disminució en les que expressaven IFN- γ respecte a les mateixes cèl·lules no estimulades. Es a dir, *D pteronyssinus* afavoria un predomini de la resposta TH2 en CMN d'individus al·lèrgics. Aquests resultats concorden amb els publicats en l'article de Leonard i col·laboradors³⁵¹, on es descriu que els cultius amb antigen de

CMN de sang perifèrica de pacients al·lèrgics a *D pteronyssinus* induïa la producció d'IL-4 detectada en els sobredants i una menor producció d'IFN- γ , especialment en els pacients asmàtics. En canvi, Tang *et al*³⁵² en un treball que tenia com a finalitat estudiar la influència de les cèl·lules presentadores d'antigen en el desenvolupament de la resposta immunitària front l'al·lèrgen, descriuen un augment de la producció d'IL-4 i IFN- γ induïda per l'al·lèrgen (àcars de la pols o *Lolium perenne*) detectada per ELISA en sobredants de cultius de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica. En un grup de pacients no atòpics, el mateix experiment donava lloc únicament a un increment en la producció d'IFN- γ .

En el nostre estudi no es va observar una modificació en l'expressió d'IL-4 durant el tractament amb IT. Quan es va analitzar l'expressió d'IFN- γ , es va trobar que de forma fortuïta el grup que havia de rebre IT presentava un menor percentatge de cèl·lules que expressaven IFN- γ que el grup que no havia de rebre IT. Aquest fet no es va esbrinar fins que ja s'havien realitzat tots els experiments, ja que es van dur a terme simultàniament tots els cultius del mateix malalt per tal d'obviar possibles variacions degudes a la tècnica. No obstant, el fet que es comparessin els resultats de cada malalt amb si mateix, es a dir, els dels 6 i 12 mesos amb els d'abans d'iniciar la IT obvia aquest biaix. La diferència inicial en la producció d'IFN- γ desapareixia durant l'estudi, i per tant, hi havia un augment en la producció d'IFN- γ associat al tractament amb IT. També es va observar aquesta tendència a augmentar l'expressió d'IFN- γ en els pacients que havien presentat milloria. Una altra modificació que es va observar a l'extracció dels 6 mesos fou un augment de la IL-10, que després tornava a disminuir fins a nivells inferiors als inicials, tan en els pacients amb IT com en els que van presentar millorança, malgrat no era estadísticament significatiu. Aquests resultats concorden parcialment amb els de Bellinghausen *et al*, que en un model d'IT amb verí d'himenòpters descriuen un

augment en la producció d'IFN- γ i una reducció en la producció d'IL-4²⁴⁰. A més, descriuen un augment en la producció d'IL-10 en aquesta determinació tant precoç, ja que aquests canvis es detectaven al cap d'una setmana d'iniciar la IT, quan s'arribava a la dosi de manteniment. En el nostre cas, amb una pauta estàndard, la dosi de manteniment s'assolia cap als dos mesos d'iniciar-se la IT i per tant la modificació en les citocines es detectava a l'extracció dels sis mesos. Segons les hipòtesis d'Akdis, durant el tractament amb immunoteràpia, la IL-10 actua induint tolerància per part de les cèl·lules T mitjançant inhibició selectiva del senyal coestimulador del CD28, controlant la immunitat antígen-específica³⁴⁷.

Però els canvis descrits per altres grups són diferents en alguns resultats. Per exemple, el grup de Benjaponpitak descriuen un augment inicial en la ràtio IL-4/IFN- γ durant la IT, que després disminuïa en els pacients amb bona resposta clínica, en gran part degut al descens de la IL-4²⁴¹. Altres grups descriuen una reducció de l'índex IL-4/IFN- γ ²⁵⁰. En el nostre estudi no vàrem objectivar modificacions en la ràtio IL-4/IFN- γ . En canvi, el grup de Secrist va trobar que en els cultius amb al·lèrgen, havia una menor producció d'IL-4 en el grup que va rebre IT comparat amb un grup no tractat, sense modificacions en la producció d'IFN- γ ²³³. També Van Bever *et al* van comparar un grup de pacients al·lèrgics a àcars de la pols rebent IT i un que no en rebia, presentant una menor expressió d'IL-4 en cultius de CMN amb àcars de la pols els pacients amb IT, mentre que l'IFN- γ era igual en els dos grups²⁵⁷.

5.4 DISCUSSIÓ GENERAL

Aquesta tesi estudia en pacients asmàtics al·lèrgics els canvis immunològics induïts per la immunoteràpia amb al·lèrgens, així com els canvis immunològics associats a una milloria clínica. La realització d'aquest tipus d'estudis comporta tota una sèrie de problemes, ja que la majoria de paràmetres a analitzar poden variar considerablement d'individu a individu. Per tant és important incloure en l'estudi uns individus ben seleccionats així com utilitzar unes tècniques ben estandarditzades, i evitar al màxim la variabilitat intratècnica per tal de poder avaluar de forma acurada els resultats. Quan es revisen els treballs publicats per diferents grups, es detecta una gran disparitat en els resultats; la metodologia diferent emprada pels diversos autors, pot explicar moltes vegades les discrepàncies entre els resultats dels estudis. A més, cal tenir en compte que s'estudien paràmetres biològics, el resultat dels quals pot estar influït per condicionants de la tècnica, com l'homogeneïtat entre lots de reactius, manteniment de la potència dels antígens, etc. La variabilitat dels resultats quan es mesuren paràmetres biològics queda palesa en algunes de les dades aportades. Així, els cultius de CMN dels dos grups de pacients evidenciaven a l'inici de l'estudi diferent grau de proliferació front a *D. pteronyssinus* (si bé no arribava a la significació estadística). Però aquest paràmetre no va ser controlable fins al cap d'un any quan es va efectuar l'anàlisi de resultats, degut a que tots els cultius corresponents a cada pacient es realitzaven de forma simultània per evitar variabilitat. Per tant, és molt important avaluar els resultats intragrup, com s'ha fet en aquest treball, mentre que en molts dels estudis publicats comparen els resultats amb un grup control, possiblement per la dificultat que comporta fer estudis prospectius de seguiment.

Un altre factor important és com es relacionen aquests paràmetres entre si i amb la situació clínica dels pacients, aspecte que no s'ha investigat en molts dels treballs

que avaluen exclusivament l'aspecte immunològic.

Quan es planteja un projecte com el d'aquesta tesi, un dels primers problemes es la selecció del tipus de pacient. En aquest cas es van seleccionar pacients monosensibilitzats a un al·lergen perenne. El fet que els pacients fossin monosensibilitzats evitava que l'exposició no controlada a altres antigens pugues modificar l'expressió clínica de la malaltia al·lèrgica. A més, els consensos sobre IT recomanen utilitzar extractes d'un sòl al·lergen¹⁹⁶, i per tant, no hauria estat correcte tractar-los amb barreges de diversos al·lergens. Els pacients pol·línics solen presentar variacions dels símptomes segons els comptatges de pol·len, que depenen de l'estació de l'any, del lloc de residència i de les característiques meteorològiques d'aquell any en concret. Aquest fet suposa la introducció d'una sèrie de variables de difícil control, que poden tenir gran influència en l'avaluació clínica i immunològica dels pacients. Per aquesta raó es va decidir incloure pacients al·lèrgics a un al·lergen perenne com els àcars de la pols. A la nostra regió climàtica, Catalunya, els àcars són l'al·lergen que amb més freqüència ocasiona al·lèrgia respiratòria. A més, els nivells d'antigen es mantenen força estables durant tot l'any. El fet d'haver realitzat un estudi aleatori ha ocasionat que els pacients dels dos grups s'incorporessin a l'estudi durant tot l'any de forma similar.

Per a l'estudi del desequilibri en la producció de citocines per part dels pacients al·lèrgics, s'han desenvolupat diferents estratègies. Una és l'estimulació inespecífica de les cèl·lules T amb mitògens com PHA, enterotoxina B de l'estafilococ o PMA+I que serveix per avaluar la predisposició "basal" per produir citocines. D'aquesta manera s'estudia la resposta del conjunt de cèl·lules T. L'altra és més específica i consisteix en la utilització de tècniques d'estimulació de cèl·lules T amb antigen, que ens dona informació sobre la producció de citocines induïda per l'exposició prèvia a l'al·lergen. En aquesta tesi s'han abordat els dos tipus d'estudi,

amb la intenció d'explorar tant la resposta immunitària global dels individus al·lèrgics com la resposta front a l'al·lèrgen implicat en la patogènia de la malaltia al·lèrgica, i a l'hora veure quines variacions s'associaven al tractament amb IT.

Els resultats d'aquest estudi mostren que la IT induïx en els pacients al·lèrgics una modificació de la resposta immunològica front a Dpt. Aquesta modificació no es tracta d'un clar canvi en la producció de citocines com la IL-4 i l'IFN- γ , com s'ha descrit prèviament. Quan s'estudiava l'estimulació inespecífica s'observava que la IT no modificava l'expressió d'IL-4, IFN- γ ni IL-10. S'ha de tenir en compte que l'estimulació inespecífica policlonal és molt intensa, i pot fer que no es detectin subtils modificacions que únicament afectin a la població de cèl·lules específiques per l'al·lèrgen, que es un percentatge molt petit de les cèl·lules T.

Una tècnica emprada en alguns estudis, és la generació de clones específiques per l'antigen, però l'utilització d'aquesta tècnica té diversos inconvenients ja que s'han de mantenir afegint cèl·lules mononuclears de sang perifèrica irradiades, citocines com la IL-2, etc. La derivació específica cap a un tipus de resposta immunològica està molt influenciada per les citocines presents en el medi i per tant, l'addició d'aquestes substàncies pot modificar la resposta immunològica.

En el present treball es va optar per un mètode de cultiu amb al·lèrgen que permet obtenir cèl·lules específiques al cap de sis dies, i que no precisa tantes manipulacions. Amb aquesta estimulació específica amb el *D pteronyssinus* es va constatar un augment relatiu de la producció d'IFN- γ amb la IT, mentre que l'expressió d'IL-4 es mantenia igual.

També es va observar que la producció d'IL-10 induïda per l'estimulació amb *D pteronyssinus* s'incrementava a la determinació efectuada després d'arribar a les dosis de manteniment de la IT (6 mesos), per tornar a davallar a la determinació de

l'any. Aquest augment inicial podria recolzar la hipòtesi de l'activitat de la IL-10 com a citocina reguladora, inhibint de forma selectiva el senyal coestimulador del CD-28 que es imprescindible per estimular les cèl·lules T que reben l'activació d'un baix nombre de TCRs³⁴⁷. Bellinghausen, Akdis i altres autors, han destacat la importància cabdal de la IL-10 en l'actuació de la IT, tant amb verí d'himenòpters com amb pneumoal·lergens. La IL-10, junt amb el TGF- β , és produïda per cèl·lules T reguladores (Tcr o Th3), que es generarien durant la IT. Platts-Mills suggereix també que la IL-10 és fonamental per generar la tolerància que s'ha observat que es produeix front a l'exposició natural a determinats al·lergens a dosis elevades (com per exemple l'epiteli de gat), i que s'acompanya d'un augment de la ràtio IgG4/IgE específica. És el que anomena "resposta Th2 modificada" i es tracta d'una forma de tolerància immunològica³⁵³.

Com s'ha exposat prèviament, es possible que una de les primeres modificacions induïdes per la IT sigui un canvi en els senyals entre la CPA i la cèl·lula T. Per aquesta raó es van estudiar dos tipus cel·lulars que poden actuar com CPA: els limfòcits B i els monòcits. En aquestes CPA va determinar-se l'expressió de CD23 i de CD86, molècules que participen en els senyals entre CPA i cèl·lula T.

Es va observar que la IT s'associava a un increment en l'expressió de CD23 en els limfòcits B. Aquest resultat discrepa amb els d'autors com Gagro i Jung^{314, 315}. Malgrat que aquest augment sembli paradoxal, és possible que conduïxi a un augment en la densitat de presentació d'al·lergen a les cèl·lules T, i que contribueixi a la generació de la tolerància immunològica al igual que la poden modular la dosi de l'antigen o el grau d'afinitat entre el TCR i els seus lligands^{101, 102}.

En la revisió de la bibliografia mèdica no s'ha trobat cap estudi que analitzi l'expressió de CD23 en monòcits o de CD86 en limfòcits B, en relació a l'aplicació d'IT, malgrat la importància que tenen en l'activació de la cèl·lula T. El present

treball és el primer que estudia i descriu la disminució del CD23 en els monòcits durant la IT. Possiblement aquesta disminució s'associaria a una menor capacitat d'activació d'aquestes cèl·lules i una reducció de la seva capacitat d'actuar com a CPA. A més, podria induir una disminució del CD23s, implicat en la modulació de la producció d'IgE. En el LB el CD23 intervé en la presentació antigènica mediada per la IgE específica ("IgE mediated antigen focusing"). En els monòcits es desconeix si el CD23 intervé també en el procés de presentació antigènica, encara que és probable que sigui així. Tenint en compte que el monòcit és una CPA més potent que el LB, la disminució de l'expressió de CD23 en els monòcits pot suposar una modificació molt rellevant, que comporten una menor activació de les cèl·lules T específiques per l'al·lèrgen. Morinobu *et al* van descriure "in vitro" que la IL-10 suprimeix l'expressió de CD23 induïda per IL-4 en els monòcits però no en els limfòcits B, destacant així les diferències en els mecanismes reguladors de l'expressió de CD23 en aquests dos tipus de cèl·lules³⁵⁴.

L'expressió de CD86 es produeix en limfòcits B activats. Com s'ha comentat prèviament, l'expressió elevada de CD86 en els LB s'ha descrit en pacients al·lèrgics^{97, 98, 99, 320, 321, 322, 355, 356}. En aquest treball es descriu per primer cop, la disminució de l'expressió de CD86 en els limfòcits B durant la IT. Així, la IT revertiria la situació cap a la que es considera "normal" en individus no al·lèrgics. Cal remarcar que tant en el grup que va rebre IT com en els pacients que van presentar millorança, es va observar una correlació inversa entre l'expressió de CD86 i el CD23 en els limfòcits B, en el sentit que els pacients tractats amb IT o que milloraven disminuïa el CD86 i augmentava el CD23.

Els senyals coestimuladors durant la presentació antigènica al limfòcit T són molt importants. Per aquesta raó s'ha plantejat el seu potencial en estratègies terapèutiques per al tractament de les malalties al·lèrgiques³⁵⁷. Seria ideal poder

modificar l'expressió de molècules com el CD86 o el CD23, per tal d'induir un canvi en la resposta immunològica front a l'al·lèrgen i modificant l'expressió clínica de l'al·lèrgia. La IT sembla un bon sistema per induir aquest canvi, si bé encara no està descrit fins a quin punt la modificació de la coestimulació pot estar implicada en la forma d'actuar de la IT amb al·lèrgens.

Quan es van realitzar els estudis d'estimulació inespecífica, la capacitat d'estimulació de les cèl·lules T (expressió de CD69) dels pacients al·lèrgics va ser menor quan es comparava amb els individus sans. Només un altre autor havia descrit aquesta circumstància i es tractava d'una població d'individus al·lèrgics a verí d'himenòpters²⁵⁴. Aquesta lleugera disminució de l'activació no queda explicada en el context dels coneixements actuals, ja que no s'observa que els pacients al·lèrgics presentin un trastorn d'immunodeficiència ni que adquireixin més infeccions i més greus que els individus sans.

Els individus al·lèrgics presentaven una major expressió d'IL-10. Aquest fet podria fer pensar que la IL-10 actuaria com un mecanisme natural per frenar la resposta al·lèrgica en aquests individus, però que encara seria insuficient per revertir-la.

Un altre resultat molt destacat en aquesta tesi és el fet que la capacitat d'activació es recuperava amb la IT. Aquest efecte de la IT no ha estat descrit prèviament. Molts dels treballs publicats que estudien les citocines intracitoplasmàtiques en poblacions de pacients atòpics o en relació a l'administració d'IT, no medeixen prèviament el percentatge d'activació de les cèl·lules T^{232, 240, 249, 251, 358}. No obstant, és necessari assegurar que la estimulació ha sigut suficient ja que com s'ha comentat prèviament, és imprescindible per a la correcta expressió de les citocines^{254, 324}. Al no haver determinat de forma sistemàtica l'activació limfocitària reflectida per l'expressió de CD69 no s'ha observat prèviament aquest defecte

d'activació limfocitària en els individus atòpics, ni la seva modificació durant la IT.

En aquest treball, la IT induïa una disminució de la proliferació front al *D pteronyssinus*. S'ha observat una correlació positiva entre la puntuació de símptomes i l'índex de proliferació de les cèl·lules T front al *D pteronyssinus*, es a dir quants menys símptomes presentava el pacient menor era la proliferació de les cèl·lules T quan eren estimulades amb *D pteronyssinus*. Es a dir, s'observava una relativa anèrgia front a l'al·lèrgen emprat en la IT. A més, la disminució de la resposta cel·lular front l'al·lèrgen s'acompanyava de l'augment de la capacitat d'activació inespecífica de les cèl·lules T, amb una major expressió del CD69 quan es feia una activació mitogènica. Aquestes dades fan pensar que existeix una relació directa entre l'aplicació d'IT, la milloria clínica presentada pels pacients i les modificacions immunològiques associades, es a dir la reducció de la resposta proliferativa de les cèl·lules T i la recuperació de la seva capacitat d'activació. I aquestes modificacions, probablement estan mediades per canvis en els senyals coestimuladores de les CPA, com les descrites prèviament.

La valoració conjunta dels resultats d'aquest estudi mostren que la IT induïa en els pacients al·lèrgics una modificació en la resposta immunològica front al *D pteronyssinus* que s'acompanya d'una milloria en la malaltia al·lèrgica. La IT, que implica l'administració de dosis molt elevades d'al·lèrgen, actuaria modificant els senyals entre CPA i cèl·lules T, generant-se una tolerància immunològica expressada en la disminució de la resposta proliferativa front l'al·lèrgen. Aquesta "anèrgia" estaria modulada, al menys parcialment, per la IL-10 produïda per cèl·lules T reguladores, que augmenta durant l'inici de la IT. Amb aquest tractament l'individu al·lèrgic recupera la capacitat d'activació dels limfòcits T (demostrat per l'augment de l'expressió de CD69 després de l'activació) aproximant-se a l'estat "no al·lèrgic". La tolerància immunològica també es demostra "in vivo" mitjançant la

disminució de la reactivitat cutània i conjuntival. Clínicament, aquesta tolerància a l'al·lergen dona lloc a una milloria dels símptomes i a una disminució de l'ús de medicació, es a dir, a una milloria clínica, que condueix a una alteració del curs natural de la malaltia. Prova d'això és que s'observa una associació significativa entre la milloria clínica i l'aplicació de la IT.

6 CONCLUSIONS

Els individus al·lèrgics comparat amb els individus no al·lèrgics, mostren les següents característiques::

1. Els pacients al·lèrgics presenten una major percentatge de monòcits que expressen CD23.
2. La capacitat d'activació de les cèl·lules T (expressada segons l'expressió de CD69) està disminuïda en els pacients al·lèrgics.
3. Els individus al·lèrgics presenten un major percentatge de cèl·lules T que expressen IL-10, mentre que no s'observa cap diferència significativa en el percentatge de cèl·lules que expressen d'IL-4 ni IFN- γ .

La IT indueix en els pacients al·lèrgics a *D pteronyssinus*:

1. Una milloria clínica, reflexada en la disminució dels valors de la puntuació de símptomes i de l'ús de medicació, així com dels paràmetres de funció respiratòria. De forma simultània, s'observa una milloria en les proves que mostren la magnitud de la sensibilització a l'al·lèrgen: proves cutànies de prick i proves de provocació conjuntival.
2. La IT s'associa a un augment de la capacitat d'activació de les cèl·lules T reflectida en l'augment de l'expressió de CD69 després de l'estimulació inespecífica. No s'observa modificació en el percentatge d'expressió d'IL-4, IFN- γ i IL-10 amb la estimulació inespecífica de CMN de sang perifèrica.
3. La IT s'acompanya d'una reducció en la resposta proliferativa de les cèl·lules T front l'al·lèrgen. L'estimulació al·lèrgen-específica de les CMN va mostrar una tendència a l'augment en el percentatge de cèl·lules que expressen

d'IFN- γ amb el tractament amb IT. El percentatge de cèl·lules T que expressaven d'IL-10 es va incrementar en la primera determinació després d'arribar a la dosi de manteniment d'IT, recolzant la hipòtesi de la funció immunoreguladora de la IL-10 en el desenvolupament de tolerància immunològica a l'al·lèrgen.

4. A nivell de CPA tals com els limfòcits B i els monòcits, la IT induïx modificacions en l'expressió de molècules de superfície involucrades en la generació de senyals de coestimulació de la cèl·lula T:
 - a. S'observa una disminució del percentatge de monòcits que expressen CD23.
 - b. En els limfòcits B s'observa un augment el percentatge que expressen CD23 i una disminució en el percentatge que expressen CD86.

La milloria clínica es va associar als següents canvis immunològics:

1. Es va evidenciar una correlació entre la milloria clínica i la pèrdua de la resposta proliferativa front l'antigen, es a dir, la milloria clínica es correlacionava amb la tolerància immunològica.
2. La milloria clínica va mostrar una relació inversa amb la capacitat d'activació inespecífica de les cèl·lules T; es recupera així l'estat "no al·lèrgic" d'activació limfocitària.
3. En els pacients amb millorança es va observar una disminució en els monòcits que expressaven CD23 comparat amb els que no milloraven.

7 ANNEXES

7.1 ANNEX 1

NOM:

MES:

MEDICACIÓ:

	SETMANA 1	SETMANA 2	SETMANA 3	SETMANA 4	SETMANA 5

SIMPTOMES:

	SETMANA 1	SETMANA 2	SETMANA 3	SETMANA 4	SETMANA 5
PICOR NAS					
ESTERNUTS					
NAS TAPAT					
MOCS					
PICOR ULLS					
TOS					
SIBILANTS					
OFEC					

Per cada símptoma doneu una puntuació segons s'indica:

0 – Res

1 – Mínim, dubtós

2 – Lleu, lleugera molèstia

3 – Molest

4 – Moderat

5 – Greu, interfereix amb la son o activitats

6 - Incapacitant

7.2 ANNEX 2

Puntuació de la medicació:

FÀRMAC	PUNTUACIÓ
β2-adrenèrgic inhalat < 3 cops per setmana	0.5
β 2-adrenèrgic inhalat 3 cops per setmana	1
Budesonida 400 µg/d	1.5
Budesonida 400-800 µg/d	2
Budesonida 800 µg/d	2.5
Fluticasona 250 µg/d	1
Fluticasona 250-500 µg/d	1.5
Fluticasona 500 µg/d	2.5
Antileucotriens (Montelukast 10 mg/d o Zafirlukast 40 mg/d)	1.5
Antihistamínics < 3 cops per setmana	0.5
Antihistamínics 3 cops per setmana	1
Corticoides nasals nebulitzats	1.5
Corticoides orals	3

8 REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1 Coombs R, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. En: Gell P, Coombs RRA, Lachman PJ, editors. Clinical aspects of immunology. Oxford , UK. Blackwell Scientific Publications, 1975: 761-81.

2 Bellanti JA, Kadlec JV. Overview of immune-mediated disease: structure, function, and regulation of the immune response. En: Weiss EB, Stein M, eds. Bronchial asthma. Mechanisms and therapeutics, 3rd ed. Boston, Little, Brown and Company, 1993: 50-56.

3 Von Pirquet C. Allergie. Munch Med Wochenschr, 1906; 30: 1457.

4 Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. J Immunol, 1923; 8: 163-82.

5 Cooke RA, van der Veer A Jr. Human sensitization. J Immunol, 1916; 1: 201-305.

6 Röcken M, Schallreuter K, Renz H, Szentivanyi A. Controversies in experimental dermatology: what exactly is "atopy"? Exp Dermatol, 1998; 7: 97-104.

7 Johanson SGO, Hourihane JOB, Bousquet C et al. A revised nomenclature for allergy. Allergy, 2001; 56: 813-824.

8 Solana R, Alonso C. Reacciones de hipersensibilidad: hipersensibilidad inmediata. En: Peña-Martínez J, ed. Inmunología clínica. Bases moleculares y celulares. Madrid, Arán Ediciones S.A., 1998:127-141.

9 Bukantz SC, Lockey RF. IgE immediate hypersensitivity. En: Weiss EB, Stein M, eds. Bronchial asthma. Mechanisms and therapeutics, 3rd ed. Boston, Little, Brown and Company, 1993: 68-79.

10 Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE, Thomas W. Allergen Nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. World Health Organization, 1994; 72:796-806.

11 Duce F, Fraj J. Aspectos inmunológicos. En: Perpiñá M, ed. Asma. Lo esencial. Menarini S.A., 1997: 61-79.

12 Prausnitz C, Küstner H. Studien über die überempfindlichkeit. Zentralbl Bakteriol I. Abt Orig, 1921; 86: 160.

13 Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with γ E-globulin antibody. J Immunol, 1966; 97: 840.

14 Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of γ E-antibodies as a carrier of reaginic activity. J Immunol, 1966; 99: 1187.

15 Johansson SGO, Bennich H. Studies on a new class of human immunoglobulins: I. Immunological and physical properties. In: Killander J, ed. Gammaglobulins. Structure and control of biosynthesis. Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1967: 199-205.

16 Bennich H, Johansson SGO. Studies on a new class of human immunoglobulins: II. Immunological and physical properties. In: Killander J, ed. Gammaglobulins. Structure and control of biosynthesis. Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1967: 199-205.

17 Bennich H, Ishizaka K, Johansson SGO, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. Bull WHO, 1968; 38: 151-152.

18 French DL. Immunoglobulin: Structure and genetics. En: Kaplan AP, ed. Allergy. Philadelphia. WB Saunders Company, 1997: 13-29.

19 Huston DP. The biology of the immune system. JAMA 1997; 278 (22): 1804-1814.

20 Buendía E, Mestre M. Inmunoglobulinas. En: Buendía E, Pregrado Inmunología. Madrid. Luzán 5 S.A. de ediciones, 1991: 101-152.

21 Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A, Capron M. IgE-binding molecules (Mac-2/ ϵ BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. Eur J Immunol, 1993; 23: 3230-3235.

22 Metzger H, Alcaez G, Hohman R, Kinet JP, Pribluda V, Quarto R. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. Annu Rev Immunol, 1986; 4: 419-470.

-
- 23 Wang B, Rieger A, Kilgus O, et al. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI. *J Exp Med*, 1992; 175: 6448-6452.
- 24 Bieber T, de la Salle H, Wollenbeg A, et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med*, 1992; 175: 1285-1290.
- 25 Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature*, 1994; 367: 183-186.
- 26 Maurer D, Fiebigner E, Reiningger B, et al. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals *J Exp Med*, 1994; 179: 745-750.
- 27 Maurer D, Fiebiger S, Ebner C, et al. Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol*, 1996; 157: 607-616.
- 28 Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, et al. Expression and functions of the high affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur J Immunol*, 1997; 27: 2212-2218.
- 29 Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 1991; 9: 457-492.
- 30 Ra C, Jouvin MH, Blank U, Kinet JP. A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature*, 1989; 341: 752-754.
- 31 Orloff DG, Ra CS, Frank SJ, Kluasner RD, Kinet JP. Family of disulphide-linked dimmers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. *Nature*, 1990; 347: 189-191.
- 32 Haikimi J, Seals C, Kondas JA, Pettine L, Danho W, Kochan J. The alpha subunit of the human IgE receptor (FcεRI) is sufficient for high affinity IgE binding. *J Biol Chem*, 1990; 265: 22079-22081.

33 Lin S, Cicala C, Schrenberg AM, Kinet JP. The Fc(epsilon)RI beta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RI gamma-mediated cell activation signals. *Cell*, 1996; 85: 985-995.

34 Jankovic D, Kullberg MC, Dombrowicz D, et al. Fc epsilonRI-deficient mice infected with *Schistosoma mansoni* mount normal Th2-type responses while displaying enhanced liver pathology. *J Immunol*, 1997; 159: 1868-1875.

35 Matsuda H, Watanabe N, Kiso Y, et al. Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. *J Immunol*, 1990; 144: 259-262.

36 Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kai AB. Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 99: 699-706.

37 Lawrence DA, Weigle WO, Spielberg HL. Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils. *J Clin Invest*, 1975; 55: 268-287.

38 González-Molina A, Spielberg HL. A subpopulation of normal human peripheral B lymphocytes that bind IgE. *J Clin Invest*, 1977; 59: 616-624.

39 Capron A, Dessaint JP, Capron M, Bazin H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, 1975; 253: 474-475.

40 Ambrad DH. FcεRII/CD23: the low affinity receptor for IgE. *Annu Rev Immunol*, 1990; 8: 623-645.

41 Ambrad DH, Campbell KA, Barlett WC, Squire CM, Dierks SE. Structure and function of the low affinity IgE receptor. *Adv Exp Med Biol*, 1994; 347: 17-30.

42 Delespesse G, Suter U, Mossalaini D, et al. Expression, structure and function of CD23 antigen. *Adv Immunol*, 1991; 49: 149-191.

43 Yukawa K, Kikutani H, Owaki H et al. A B cell specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (FcεR) on lymphocytes. *J Immunol*, 1987; 138: 2576-2580.

-
- 44 Bonnefoy JY, Aubry JP, Peronne C, Wijdenes J, Banchereau J. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD23 is a low affinity receptor for IgE. *J Immunol*, 1987; 138: 2970-2978.
- 45 Bonnefoy JY, Lecoanet-Henchez S, Gauchat JF, et al. Structure and functions of CD23. *Int Rev Immunol*, 1997; 16: 113-128.
- 46 Pirron U, Schlunck T, Prinz JC, Rieber EP. IgE-dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low-affinity receptor for IgE. *Eur J Immunol*, 1990; 20:1547-1551.
- 47 Santamaria LF, Bheekha R, van Reijssen FC, et al. Antigen focusing by specific monomeric immunoglobulin E bound to CD23 on Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Hum Immunol*, 1993; 37: 23-30.
- 48 Mudde GC, Reischul IG, Corvaria N, Hren A, Poellabauer EM. Antigen presentation in allergic sensitization. *Immunol Cell Biol*, 1996; 74: 167-173.
- 49 Sarfati M, Delespesse G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J Immunol*, 1988; 141: 2195-2199.
- 50 Sarfati M, Bettler B, Letellier M, et al. Native and recombinant soluble CD23 fragments with IgE suppressive activity. *Immunology*, 1992; 76: 662-667.
- 51 Yokota A, Kikutani H, Tanaka T, et al. Two species of human Fc ϵ Receptor II (Fc ϵ RII/CD23): Tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene. *Cell*, 1988; 55: 611-618.
- 52 Punnonen JG, Aversa G, Cocks BG, et al. Interleukin-13 induces interleukin-4 independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression bi human B cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1993; 90: 3730-3734.
- 53 Soussi Gounni A, Morita M, Aldebert D, Sarfati M, Capron A, Capron M. Molecular characterization of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII/CD23 expressed by human eosinophils. *Int Immunol*, 1998; 10: 395-404.

54 Yokota A, Yukawa K, Yamamoto A, et al. Two forms of the low affinity Fc receptor for IgE differentially mediate endocytosis and phagocytosis: identification of the critical cytoplasmatic domains. *Proc Natl Acad Sci*, 1992; 89: 5030-5034.

55 Corominas M, Mestre M, Bas J, Buendía E. Distinct modulation by interferon-gamma (IFN- γ) of CD23 expression on B and T lymphocytes of atopic subjects. *Clin Exp Immunol*, 1998; 12: 276-280.

56 Aubry JP, Pochon S, Graber P, et al. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature*, 1992; 358: 505-507.

57 Sherr E, Macy E, Kimata H, Gilly M, Saxon A. Binding the low affinity Fc epsilon R on B cells suppresses ongoing human IgE synthesis. *J Immunol*, 1989; 142:481-489.

58 Tsicopoulos A, Joseph M. The role of CD23 in allergic disease. *Clin Exp Allergy*, 2000; 30: 602-605.

59 Gosset P, Tillie-Leblond I, Oudin S, et al. Production of chemokines and proinflammatory and antiinflammatory cytokines by human alveolar macrophages activated by IgE receptors. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 103: 289-297.

60 Klouche M, Klinger MH, Kuhnel W, Wilhelm D. Endocytosis, storage, and release of IgE by human platelets: differences in patients with type I allergy and nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: 289-297.

61 Capron M, Truong MJ, Aldebert D, et al. Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur J Immunol*, 1991; 21: 2423-2429.

62 Lecoanet-Henchoz S, Gauchat JF, Aubry JP, et al. CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity*, 1995; 3: 119-125.

63 Spielberg HL, O'Connor R, Simon RA, Mathison DA. Lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors in patients with atopic disorders. *J Clin Invest*, 1979; 64: 714-720.

-
- 64 Suemura M, Kikutani H, Barsumian EL, et al. Monoclonal anti-Fc ϵ receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fc ϵ receptors on Human B and T cells. *J Immunol*, 1986; 137: 1214-1220.
- 65 Gagro A, Rabatic S. Allergen-induced CD23 on CD4+ T lymphocytes and CD21 on B lymphocytes in patients with asthma: evidence and regulation. *Eur J Immunol*, 1994; 24: 1109-1114.
- 66 Baniyash M, Alkalay I, Eshhar Z. Monoclonal antibodies specific of the alpha-subunit of the mast cells Fc ϵ R block IgE binding and trigger histamine release. *J Immunol*, 1987; 138: 2999-3004.
- 67 Isersky C, Taurong JD, Poy G, et al. Triggering of cultures neoplastic mast cells by antibodies to the receptor for IgE. *J Immunol*, 1978; 121: 549-558
- 68 Saxon A, Ke Z, Bahati L, Stevens R. Soluble CD23 containing B cell supernatants induce IgE from peripheral blood B lymphocytes and costimulate with interleukin 4 in induction of IgE. *J Allergy Clin Immunol*, 1990; 86: 333-344.
- 69 Bonnefoy J, Gauchat J, Life P, Graber P, Mazzei G, Aubri J. Pairs of surface molecules involved in human IgE regulation: CD23-CD21 and CD40-CD40L. *Eur Respir J*, 1996; 9: 63s-66s.
- 70 Capron A, Dessiant JP, Capron M, Joseph M, Ameisen JC, Tonnel AB. From parasites to allergy: a second receptor for IgE. *Immunology Today*, 1986; 7: 15-18.
- 71 Shevach EM. T and B lymphocytes. En: Kaplan AP, ed. *Allergy*. Philadelphia. WB Saunders Company, 1997: 30-44.
- 72 Delves PJ, Roitt IV. The immune system. *N Engl J Med*, 2000; 343: 108-117.
- 73 Mosmann TR, Coffman RL. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunology Today*, 1987; 8: 223-227.
- 74 Mossman TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 1996; 17: 138-146.

75 Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 1994; 265: 1237-1240.

76 Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*, 1996; 98: 70-77.

77 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta mediated oral tolerance. *J Exp Med*, 1996; 183: 2605-2616.

78 Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RBlow CD4+ T cells. *J Exp Med*, 1996; 183: 2669-2674.

79 Han HS, Jun HS, Utsugi T, Yoon JW. A new type of CD4+ suppressor T cell completely prevents spontaneous autoimmune diabetes and recurrent diabetes in syngenic islet-transplanted NOD mice. *J Autoimmun*, 1996; 9: 331-339.

80 Bridoux F, Badou A, Saoudi A, et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta) - dependent inhibition of T helper cell 2 (Th2)-induced autoimmunity by self-major histocompatibility complex (MHC) class II-specific, regulatory CD4+ T cell lines. *J Exp Med*, 1997; 185: 1769-1775.

81 Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997; 389: 737-742.

82 Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 1998; 102: 98-106.

83 Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol*, 1992; 98: 279-285.

84 Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Th1 and Th2 cytokine dysregulation in human infections, neoplastic and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1996; 9: 532-562.

-
- 85 Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*, 1994; 12: 227-257.
- 86 Hu-Li J, Huang H, Ryan J, Paul WE. In differentiated CD4⁺ T cells, IL-4 production is cytokine autonomous while IFN- γ production is cytokine dependent. *Proc Natl Acad Sci*, 1997; 94: 3189-3194.
- 87 Umetsu DT, DeKruyff RH. Th1 and Th2 CD4⁺ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: 1-6.
- 88 Seder RA, Paul WE, David MM, et al. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*, 1996; 176: 1091-1098.
- 89 Paul WE, Seder RA. Lymphocyte and cytokine production by Fc ϵ RI⁺ cells. *Adv Immunol*, 1993; 53: 1-29.
- 90 Yoshimoto T, Paul WE. CD4⁺, NK1.1⁺ T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med*, 1994; 179: 1285-1295.
- 91 Szabo SJ, Glimcher LH, Ho IC. Genes that regulate interleukin-4 expression in T cells. *Curr Opin Immunol*, 1997; 9: 776-781.
- 92 Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing cells. *J Exp Med*, 1993; 177:1199-1204.
- 93 Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, et al. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in Th1 cells. *Science* , 1995; 269: 245-247.
- 94 Secrist H, DeKruyff RH, Umetsu DT. Interleukin 4 production by CD4⁺ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type. *J Exp Med*, 1995; 181: 1081-1089.
- 95 Kalinski P, Hilgert CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol today*, 1999; 20: 561-567.

96 Hartley JA, Semper AE, Holgate ST. *In vivo* and *in vitro* expression of FcR1 in human peripheral blood (PB). *Immunology*, 1996; 89 (suppl 1): 41.

97 Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*, 1995; 2: 523-532.

98 Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity*, 1995; 2: 555-559.

99 Webb L, Feldmann M. Critical role CD28/B7 costimulation in the development of human Th2 cytokine producing cells. *Blood*, 1995; 86: 3479-3486.

100 Oshima Y, Yang LP, Uchiyama T, et al. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4 producing effectors. *Blood*, 1998; 92: 3338-3345.

101 Pfeiffer C, Stein J, Southwood S et al. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med* 1995; 181: 1569-1574.

102 Constant SL, Bottomly K. Induction of TH1 and TH2 CD4+ T cell responses. *Annu Rev Immunol*, 1997; 15: 297-322.

103 Carballido JM, Carballido-Perrig N, Teres G, Heusser CH, Blaser K. Bee venom phospholipase A2-specific T cell clones from human allergic and nonallergic individuals: cytokine patterns change in response to the antigen concentration. *Eur J Immunol*, 1992; 22: 1357-1363.

104 Coffman RL, Ohara J, Bond MW, et al. B-cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol*, 1986; 136: 4538-4541.

105 Paul WE. Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*, 1991; 77: 1859-1870.

106 Vercelli D, Geha RS. Regulation of IgE synthesis: from the membrane to the genes. *Springer Semin Immunopathol*, 1993; 15: 5-16.

-
- 107 Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PLB. IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol*, 1992; 149: 1432-1438.
- 108 Defrance T, Carayon P, Billian G. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med*, 1994; 179: 135-143.
- 109 Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 105: 1063-1070.
- 110 Sanderson CJ. Pharmacological implications of interleukin-5 in the control of eosinophilia. *Adv Pharmacol*, 1992; 23: 163-177.
- 111 Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S et al. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*, 1989; 245: 308-310.
- 112 Rosenwasser LJ, Borish L. Cytokines, interleukins and growth factors. En: Kaplan AP, ed. *Allergy*. Philadelphia. WB Saunders Company, 1997: 53-71.
- 113 Fiorentino DF, Bond MW, Mossman TR. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 1989; 170: 2081-2095.
- 114 Yssel H, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG, et al. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol*, 1992; 149: 2378-2384.
- 115 Pretolani M, Goldman M. IL-10: A potential therapy for allergic inflammation? *Immunol Today*, 1997; 18: 277-280
- 116 De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennet B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocyte: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 1991; 174: 1209-1220.
- 117 Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*, 1993; 150: 353-356.

118 De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 1991; 174: 915-924.

119 Ding L, Shevach EM. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage co-stimulatory function. *J Immunol*, 1992; 148: 3133-3139.

120 Willems F, Marchant A, Deville JP, et al. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol*, 1994; 24: 1007-1009.

121 Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 1991; 254: 707-710.

122 Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, et al. Lack of IL-4 induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, 1996; 380: 630-633.

123 Worm M, Henz BM. Molecular regulation of human IgE synthesis. *J Mol Med*, 1997; 75: 440-447.

124 Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, et al. CD40 gene ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*, 1993; 259: 990-993.

125 Schwartz LB. Basophils and mast cells. En: Kaplan AP, ed. *Allergy*. Philadelphia. WB Saunders Company, 1997: 133-148.

126 Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol*, 1999; 17:931-972.

127 Beer DJ, Rocklin RE. Histamine-induced cell-cell activity. *J Allergy Clin Immunol*, 1984; 73: 439-452.

128 Braude S, Coe C, Royston D, et al. Histamine increases lung permeability by an H2-receptor mechanism. *Lancet*, 1984; 2: 372-374.

-
- 129 Clark RA, Gallin JI, Kaplan AP. The selective eosinophil chemotactic activity of histamine. *J Exp Med*, 1975; 142: 1462-1476.
- 130 Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, et al. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Eng J Med*, 1987; 316: 1622-1626.
- 131 Schwartz LB, Bradford TR, Littman BH et al. The fibrinogenolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *J Immunol*, 1985; 135:2762-2767.
- 132 Sekizawa K, Caughey GH, Lazarus SC, et al. Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest*, 1989; 83:175-179.
- 133 Brown JK, Jones CA, Tyler CL, et al. Tryptase-induced mitogenesis in airway smooth muscle cells: potency, mechanisms, and interactions with other mast cell mediators. *Chest*, 1995; 107 (suppl): 95S-96S.
- 134 Hartmann T, Ruoss SJ, Raymond WW, et al. Human tryptase as a potent, cell-specific mitogen: role of signaling pathways in synergistic responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1992; 262: L528-534.
- 135 Wintroub BU, Schechter NB, Lazarus GS, et al. Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *J Invest Dermatol*, 1984; 83: 336-339.
- 136 Saarinen J, Kalkkinen N, Welgus HG, et al. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem*, 1994; 269:18134-18140.
- 137 Briggaman RA, Schechter NM, Fraki J, et al. Degradation of the dermal-epidermal junction by a proteolytic enzyme from human skin and human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, 1984; 160:1027-1042.
- 138 Caughey GH. Roles of mast cell tryptase and chymase in airway function. *Am J Physiol*, 1989; 257:139-146.
- 139 Sommerhoff C, Caughey GH, Finkbeiner WE, Lazarus SC, Barbaum CB, Nadel JA. Mast cell chymase: A potent secretagogue for airway gland serous cells. *J Immunol*, 1989; 142:2450-2456.

140 Hoover RL, Karnovsky MJ, Austen KF, et al. Leukotriene B4 action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81:2191-2193.

141 Nagy L, Lee TH, Goetzi EJ, et al. Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. *Clinical Exp Immunol*, 1982; 47:541-547.

142 Sirois P, Roy S, Borgeat P, et al. Evidence for a mediator role of thromboxane A2 in the myotropic action of leukotriene B4 (LTB4) on the guinea-pig lung. *Prostaglandins Leukot Med*, 1982; 8:157-170.

143 Joris I, Majno G, Corey EJ, et al. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4. Endothelial contraction. *Am J Pathol*, 1987; 126:19-24.

144 Camp RDR, Coutts AA, Greaves MW, et al. Response of human skin to intradermal injection of leukotrienes C4, D4, and B4. *Br J Pharmacol*, 1983; 80:497-502.

145 Drazen JM, Austen KF. Leukotrienes and airway responses. *Am Rev Respir Dis*, 1987; 136:985-998.

146 Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, et al. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis*, 1982; 126:449-451.

147 Nasser SM, Lee TH. Lipid mediators-Leukotrienes, prostanoids, platelet-activating factor, and lipotoxins. En: Kaplan AP, ed. *Allergy*. Philadelphia. WB Saunders Company, 1997: 178-218.

148 Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood*, 1998; 91:2240-2248.

149 Wardlaw AJ. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: A multistep paradigm. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 104: 917-926.

150 Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 105:651-663.

151 NHLBI/WHO workshop report. Global Initiatives for Asthma. National Heart, Lung and Blood Institute. Publication 96-3659B , 1995.

152 Holgate ST. The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history. *Lancet*, 1997; 350 (suppl II): 5-9.

153 Howard TD, Meyers DA, Bleecker ER. Mapping susceptibility genes for asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 105: S477-481.

154 Warner JA, Jones AC, Miles EA, Colwell BM, Warner JO. Materno-fetal interaction and allergy. *Allergy*, 1996; 51: 447-451.

155 Warner JA, Miles EA, Jones AC, Quint DJ, Colwell BM, Warner JO. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy*, 1994; 24 : 423-430.

156 Miles EA, Warner JA, Jones AC, Colwell BM, Warner JO. Peripheral blood mononuclear cell proliferation responses in the first year of life in babies born of allergic parents. *Clin Exp Allergy*, 1996; 26: 780-788.

157 Tang MLK, Kemp AS, Thornburn J, Hill DJ. Reduced interferon- γ and subsequent atopy. *Lancet*, 1994; 344: 983-985.

158 Weinberg ED. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis*, 1984;6 : 814-831.

159 Wegman TG, Lin H, Guilbert L, Mossman TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, 1993; 14: 353-356.

160 Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-tipe cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol*, 1995; 155: 128-133.

161 Jones CA, Williams KA, Finlay-Jones JF, Hart PH. Interleukin 4 production by human amnion epithelial cells and regulation of its activity by glycosaminoglycan binding. *Biol Reprod*, 1995; 52: 839-847.

162 Cadet P, Radi PL, Tiring SK, Yandell RB, Hughes TK. Interleukin 10 messenger ribonucleic acid in human placenta: implication of a role for interleukin 10 in fetal allograft protection. *Am J Obstet Gynecol*, 1995; 173: 25-29.

163 Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 104: 1119-1127.

164 Holt PG, Sly PD. Allergic respiratory disease: strategic targets for primary prevention in childhood. *Thorax*, 1997; 52: 1-4.

165 Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: S2-24.

166 Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a 2nd international workshop. *J Allergy Clin Immunol*, 1992; 89: 1046-1060.

167 Kuehr J, Frischer T, Meinert R, Barth R, Forster J, Schraub S, Urbanek R, Karmaus W. Mite exposure is a risk for incidence of specific sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 1994; 94: 44-52.

168 Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE, Cogswell JT. Exposure to house dust mite allergen (Der P1) and the development of asthma in childhood: a prospective study. *N Engl J Med*, 1990; 323: 502-507.

169 Alergológica: Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Alergia e Inmunología Clínica Abelló, S.A., 1995: 81-114.

170 Rook GAW, Stanford JL. Give us this day our daily germs. *Immunol Today*, 1998; 19:113-116.

-
- 171 Shaheen SO, Aabi P, Hall AJ, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet*, 1996; 347: 1792-1796.
- 172 Strachan DP. Allergy and family size: a riddle worth solving. *Clin Exp Allergy*, 1997; 27: 235-36.
- 173 Strachan D. Socioeconomic factors and the development of allergy. *Toxicol Lett*, 1996; 86: 199-203.
- 174 Shirikawa T, Enomoto T, Shimazu SI, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*, 1997; 275: 77-79.
- 175 Weichmann HE. Environment, lifestyle and allergy: the German answer. *Allergy*, 1995;50: 315-316.
- 176 Martínez FO. Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood: could they be "protective"? *Thorax*, 1994; 49: 1189-1191.
- 177 Hussell T, Spender LC, Georgiou A, O'Garra A, Openshaw PJM. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 1996; 77: 2447-2455.
- 178 D'Amato G. Outdoor air pollution in urban areas and allergic respiratory diseases. *Monaldi Arch Chest Dis*, 1999; 54: 470-474.
- 179 Davies RJ, Rusznak C, Devalia JL. Why is allergy increasing? Environmental factors. *Clin Exp Allergy*, 1998; 28: 8-14.
- 180 Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Charpin D, Paty E, Maccario J, Kauffmann F. Relationship of active and passive smoking to total IgE in adults of the Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA). *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161:1241-1246.
- 181 Cook DG, Strachan DP. Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research. *Thorax*, 1999; 54:357-366.
- 182 Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 99:155-160.

183 Bagglioni M, Dahinden CA. CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol today*, 1994; 15: 127-133.

184 Montefort S, Djukanovic R, Holgate ST, Roche WR. Ciliated cell damage in the bronchial epithelium of asthmatics and non-asthmatics. *Clin Exp Allergy*, 1993; 23:185-189.

185 Holgate ST, Djukanovic R, Howarth PH, Montefort S, Roche W. The T-cell and the airways fibrotic response in asthma. *Chest*, 1993; 103:125S-28S.

186 Fish JE, Peters SP. Airway remodeling and persistent airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 104: 509-516.

187 Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM et al. Quantitation of mast cell and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunochemistry. *Am Rev Respir Dis*, 1990; 142: 863-871.

188 Broide DH, Gleich GJ, Cuomo DA, et al. Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway. *J Allergy Clin Immunol*, 1991; 88: 637-648.

189 Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, et al. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*, 1991; 88: 661-674.

190 Roche WR, Easley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*, 1989; 1 (8637): 520-524.

191 Laitinen A, Altraja A, Kämpe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Resp Crit Care Med*, 1997; 156: 951-958.

192 Polito AJ, Proud D. Epithelial cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 1998; 102: 714-8.

-
- 193 Sousa AR, Poston RN, Lane SJ, Nakhosteen JA, Lee TH. Detection of GM-CSF in asthmatic epithelium and decrease by inhaled corticosteroids. *Am Rev Respir Dis*, 1993; 147: 1557-1561.
- 194 Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Gagliardo R, Bonsignore G, Bousquet J. Growth factors in remodeling of asthma. *Allergy Clin Immunol Int*, 1998; 10: 149-153.
- 195 Springall DR, Howarth PH, Counihan H, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. *Lancet*, 1991; 337: 697-701.
- 196 Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. *Allergy*, 1998; 44 (53): 2-42.
- 197 Cooke RA, Barnard J, Hebald S, Stull A. Serological evidence on immunity with co-existing sensitization in a type of human allergy, hay fever. *J Exp Med*, 1935; 62: 733-750.
- 198 Noon L. Prophylactic inoculation for hay fever. *Lancet*, 1911; 1: 1572-3.
- 199 Cooke RA, Stull A. The preparation and standardization of pollen extracts for the treatment of hay fever. *J Allergy*, 1933; 4: 87-91.
- 200 Aas K, Backman A, Belin L, Weeke B. Standardization of allergen extracts with appropriate methods. *Allergy*, 1978; 33: 130-137.
- 201 Belin L. Biologic Standardization – The HEP Unit. Control and standardization of allergenic extracts. Gustav Fisschler Verlag, Stuttgart-New York: *Arbeiten aus dem Paul Erlich Institut*, 1987: 145.
- 202 Brighton WD, Topping MD, Henocq E. Activity units for allergen extracts. *Clin allergy*, 1979; 9: 591-596.
- 203 Carreira J. Cuantificación de extractos alergénicos en unidades de masa. En: Carreira J, Ed. *Cuantificación de alergenos en unidades de masa. Alergia e Inmunologia Abelló, SA, Madrid*. 1992, 45-72.

204 Fernández-Távora L. Alergoides y nuevas pautas en la inmunoterapia. En: Sánchez Palacios, Ed. Inmunoterapia: avances, eficacia y seguridad. CBF-Leti, Barcelona. 1998, 107-122.

205 Vidal C, Fernández-Távora L. Inmunoterapia cluster con extracto depot de Dermatophagoides. Rev Esp Alergol Inmunol Clin, 1997; 12: 351-355.

206 Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Is allergen immunotherapy effective in asthma? Am J Respir Crit Care Med, 1995; 151: 969-974.

207 Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen specific immunotherapy for asthma (Cochrane Review). In : The Cochrane Library, Issue 3, 1998. Oxford: Update Software.

208 Rack S, Lowhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen allergic patients. J Allergy Clin Immunol, 1988; 82: 470-480.

209 Zlotnik I, Chyrek-Borowska S, Siergiejko Z. Specific immunotherapy in patients with bronchial asthma hypersensitive to house dust mite. Pneumol Alergol Pol, 1995; 63: 42-51.

210 Varney VA, Edwards J, Tabbah K, Brewster H, Mavroleon G, Frew AJ. Clinical efficacy of specific immunotherapy to cat dander: a double blind placebo controlled trial. Clin Exp Allergy, 1997; 27: 60-67.

211 Creticos PS, Adkinson NF Jr, Kagey-Sobotka A et al. Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy. J Clin Investt, 1985; 76: 2247-2253.

212 Otsuka H, Mezawa A, Ohnishi M, Okubo K, Seki H, Okuda M. Changes in nasal metachromatic cells during allergen immunotherapy. Clin Exp Allergy, 1991; 21: 115-119.

213 Nish WA, Charlesworth EN, Davies TL et al. The effect of immunotherapy on cutaneous late phase response to antigen. J Allergy Clin Immunol, 1994; 93: 484-493.

-
- 214 Varney VA, Hamid QA, Gaga M, et al. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest*, 1993; 92: 644-651.
- 215 Furin MJ, Norman PS, Creticos PS et al. Immunotherapy decreases antigen-induced eosinophil cell migration into the nasal cavity. *J Allergy Clin Immunol*, 1991; 88: 27-32.
- 216 Durham SR, Ying S, Varney VA et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messengerRNA for interferon- γ . *J Allergy Clin Immunol*, 1996; 97: 1356-1365.
- 217 Kohno Y, Minoguchi K, Oda N, et al. Effect of rush immunotherapy on airway inflammation and airway hyperresponsiveness after bronchoprovocation with allergen in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1998; 102:927-934.
- 218 Golden DB, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM. Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1982; 69: 489-493.
- 219 García BE, Sanz ML, Gato JJ, Fernández J, Oehling A. IgG4 blocking effect on the release of antigen-specific histamine. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 1993; 3: 26-33.
- 220 Ohashi Y, Nakai Y, Okamoto H et al. Significant correlation between symptom score and Ig-G4 antibody titer following long-term immunotherapy for perennial allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1997; 106: 483-489.
- 221 Blaher B, McCluskey J, Puy R, Czarny D, Rolland JM. T cell response to grass pollen allergens: correlation with skin test reactivity and serum IgE levels. *Immunol Cell Biol*, 1995; 73: 17-22.
- 222 Djurup R, Malling HJ. High IgG4 antibody level is associated with failure of immunotherapy with inhalant allergens. *Clin Allergy*, 1987; 17: 459-460.
- 223 Daron M. Negative regulation of mast cell activation by receptors for IgG. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997; 113: 138-141.

224 Peng Z, Nacleiro RM, Norman PS, Adkinson NF. Quantitative IgE- and IgG-subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1989; 89: 519-529.

225 Gehlhar K, Schlaak M, Becker WM, Bufe A. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy*, 1999; 29:497-506.

226 De García-Robaina JC, La Torre-Morin F, Vazquez-Moncholi C, Fierro J, Bonnet-Moreno C. The natural history of *Apis*-specific IgG and IgG4 in beekeepers. *Clin Exp Allergy*, 1997; 27:418-423.

227 Ortolani C, Pastorello EA, Incorvaria et al. A double-blind, placebo controlled study of immunotherapy with an alginate-conjugated extract of *Parietaria judaica* in patients with *Parietaria* hay fever. *Allergy*, 1994; 49: 13-21.

228 Skrbic D, Jutel M, Fishler H, Pitarch D, Müller UR. Ultrarush-immunotherapy with Hymenoptera venoms. *Allergologie*, 1996; 19: 123-129.

229 Gleich GJ, Zimmerman BS, Hendersson LL, Yunginger JW. Effects of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six year prospective study. *J Allergy Clin Immunol*, 1982; 70: 261-271.

230 Gatien JG, Merler E, Colten HR. Allergy to ragweed antigen E. Effect of specific immunotherapy on the reactivity of human T lymphocytes in vitro. *Clin Immunol Immunopathol*, 1975; 4: 32-37.

231 Akdis CA, Akdis M, Blesken T et al. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest*, 1996; 98: 1676-1683.

232 Lack G, Nelson HS, Amran D, et al. Rush immunotherapy results in allergen-specific alterations in lymphocyte function and interferon- γ production in CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 99:530-538.

233 Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin-4 production in CD4-T cells from allergic individuals. *J Exp Med*, 1993; 178: 2123-30.

-
- 234 Drazen J, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma. *Exp Med*, 1996; 183: 1-5.
- 235 Bousquet J, Chanez P, Lacoste JI, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Eng J Med*, 1990; 323: 1033-1039.
- 236 Robinson DS, Hamid Q, Ling S et al. Predominant Th2-like bronchioalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Eng J Med*, 1990; 326: 298-304.
- 237 Pene J, Rousset F, Briere F, et al. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E. *Proc Natl Acad Sci*, 1988; 85: 6880-6884.
- 238 Saint-Remy JM. Novel approaches in immunotherapy. *Clin Rev Allergy*, 1994; 12: 23-41.
- 239 Akoum H, Tscopoulos A, Vorng H et al. Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon- γ messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology*, 1996; 87: 593-598.
- 240 Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol*, 1997; 27: 1131-1139.
- 241 Benjaponpitak S, Oro A, Maguire P, Marinkovich V, DeKruyff RH, Umetsu DT. The kinetics of change in cytokine production by CD4+Tcells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 103: 468-475.
- 242 Ebner C, Siemann U, Bohle B et al. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*, 1997; 27: 1007-1015.
- 243 Hamid QA, Schotman E, Jacobson MR, Walker SM. Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 99: 254-260.

244 Holter W, Majdic O, Kalthoff ES, Knapp W. Regulation of interleukin-4 production in human mononuclear cells. *Eur J Immunol*, 1992; 22: 2765-2767.

245 Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol*, 1995; 154: 4187-4194.

246 Kämmerer R, Chvatchko Y, Kettner A et al. Modulation of T-cell response to phospholipase A2-derived peptides by conventional bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: 96-103.

247 Lu F-M, Chou C-C, Chiang B-L, Hsieh K-H. Immunologic changes during immunotherapy in asthmatic children: incubated IL-13 and allergen-specific IgG4 antibody levels. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1998; 80: 419-423.

248 Mac Donald SM, Nacleiro RM, Hamilton RG, Langdon JM, White JM, Lichtenstein LM. Cytokine measurements in patients receiving standard immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1994; 93: 230.

249 Majori M, Caminati A, Corradi M, Brianti E, Scarpa S, Pesci A. T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mite-sensitive asthma. *Clin Exp Allergy*, 2000; 30: 341-347.

250 McHugh SM, Deighton J, Steward AG, Lachman PJ, Ewan PW. Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from Th2 to Th1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 1995; 25: 328-238.

251 Meissner N, Kochs S, Coutelle J et al. Modified T-cell activation pattern during specific immunotherapy (SIT) in cat-allergic patients. *Clin Exp Allergy*, 1999; 29: 618-625.

252 O'Brien RM, Byron KA, Varigos GA, Thomas WR. House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN- γ and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. *Clin Exp Allergy*, 1997; 27: 46-51.

253 Pène J, Desroches A, Paradis L et al. Immunotherapy with Fel d 1 peptides decreases IL-4 release by peripheral blood T cells in patients allergic to cats. *J Allergy Clin Immunol*, 1998; 102: 571-578.

254 Segura JA, Assenmacher M, Irsch J, Hunzelmann N, Radbruch A. Systemic T-cell unresponsiveness during rush bee-venom immunotherapy. *Allergy*, 1998; 53: 233-240.

255 Söderlund A, Gabrielsson S, Paulie S, Hammarström M-L, Rak S, Troye-Blomberg M. Allergen induced cytokine profiles in type I allergic individuals before and after immunotherapy. *Immunology Letters*, 1997; 57: 177-181.

256 Till S, Walker S, Dickson R et al. IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol*, 1997; 110: 114-121.

257 Van Bever HP, Vereecke IF, Bridts CH, DeClerck LS, Stevens WJ. Comparison between the *in vitro* cytokine production of mononuclear cells of young asthmatics with and without immunotherapy (IT). *Clin Exp Allergy*, 1998; 28: 943-949.

258 Rocklin RE, Sheffer AL, Greineder DR, Melmon KL. Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization. *N Eng J Med*, 1980; 302: 1213-1219.

259 Trinchieri G. Interleukin-12. A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995; 13: 251-276.

260 Gavett SH, O'Hean DJ, Li X et al. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway, hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med*, 1995; 182: 1527-1536.

261 Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncaarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*, 1996; 184: 19-29.

262 Gaglani B, Borish B, Bartelson BL, et al. Nasal immunotherapy in weed-induced allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1997; 79: 259-265.

263 Ippoliti F, Ragno V, Del Nero A, McEwen N, McEwen H, Bussinco L. Effect of preseasonal desensitization on plasma IL-6 and IL-10 of grass pollen sensitive asthmatic children. *Allerg Immunol (Paris)*, 1997; 29: 123-125.

264 NHLBI/WHO workshop report. Global Initiatives for Asthma. National Heart, Lung and Blood Institute. Publication 97-4051A, 1997.

265 Normativa sobre Inmunoterapia en Enfermedades Alérgicas. Monografía elaborada por el Comité de Inmunoterapia de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Saned, ed. 1994. 23-35.

266 Creticos PS, Reed CE, Norman PS, et al. Ragweed immunotherapy in adult asthma. *N Engl J Med*, 1996; 334: 501-506.

267 Sabbah A, Sainte-Laudy J. Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation. *Allergy Clin Immunol Int*, 1996;8 :116-119.

268 Jung T, Schaur U, Heusser C, et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159: 197-207, 1993.

269 Kurtzhals JAL, Hansen MB, Hey AS, Poulsen LK. Measurement of antigen-dependent interleukin-4 production by peripheral blood mononuclear cells. Introduction of an amplification step using ionomycin and phorbol myristate acetate. *J Immunol Methods*, 1992 ;156:239-45.

270 Jutel M, Wyss Coray T, Carballido JM et al. Selective restimulation of antigen or allergen preactivated T cells using OKT3 F(ab)2 results in the secretion of TH1 or TH2-like cytokine patterns. *Clin Exp Allergy*, 1995; 25: 1108-1117.

271 Movérare R, Rack S, Elfman L. Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy. *Allergy*, 1998; 53: 275-281.

272 Santanello NC. Pediatric asthma assesment: Validation of 2 symtom diaries. *J Allegy Clin Immunol*, 2001; 107: S465-472.

273 Juniper EF, O'Byrne PM, Ferrie PJ, King DR, Roberts JN. Measuring asthma control; clinical questionnaire or daily diary? *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 162: 1330-1334.

274 Bousquet J, Calvayrac P, Guerin B et al. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. I. *In vivo* and *in vitro* parameters after a short course of treatment. *J Allergy Clin Immunol*, 1985; 76: 734-744.

275 Pichler CE, Maquardsen A, Sparholt S et al. Specific immunotherapy with *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D farinae* results in decreased bronchial hyperreactivity. *Allergy*, 1997; 52: 274-283.

276 Pichler CE, Helbling A, Pichler WJ. Three years of specific immunotherapy with house-dust-mite extracts in patients with rhinitis and asthma: significant improvement of allergen-specific parameters and of non-specific parameter and of nonspecific bronchial hyperreactivity. *Allergy*, 2001; 56: 301-30.

277 Bousquet J, Maasch H, Martinot B, Hejjaoui A, Wahl R, Michel FB. Double-blind, placebo controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. II. Comparison between parameters assessing the efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 1988; 82: 439-446.

278 Bousquet J, Hejjaoui A, Soussana M, Michel FB. Double-blind, placebo controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. IV. Comparison of the safety and efficacy of two dosages of a high-molecular weight allergoid. *J Allergy Clin Immunol*, 1990; 85: 490-497.

279 Pastorello EA, Pravettoni V, Inocarvaia C et al. Clinical and immunological effects of immunotherapy with alum-absorbed grass allergoid in grass-pollen-induced hay fever. *Allergy*, 1992; 47: 281-290.

280 Park HS, Nahm DH, Kim HY, et al. Clinical and immunologic changes after allergen immunotherapy with Hop Japanese pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001; 86: 444-448.

281 Walker SM, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Durham SR. Grass pollen immunotherapy during a 4-year follow-up study. *Allergy*, 1995; 50: 405-413.

282 Mosbech H, Østerballe O. Does the effect of immunotherapy last after termination of treatment? *Allergy*, 1988; 43: 523-529.

283 Dolz I, Martínez-Cócerca C, Bartolomé JM, Cimarra M. A double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with grass-pollen extract Alutard SQ during a 3-year period with initial rush immunotherapy. *Allergy*, 1996; 51: 489-500.

284 Löfkvist T, Agrell B, Dreborg S, Svensson G. Effects of immunotherapy with a purified standardized allergen preparation of *Dermatophagoides farinae* in adults with perennial allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy*, 1994; 49: 100-107.

285 Garcia-Ortega P, Merelo A, Marrugat J, Richart C. Decrease of skin and bronchial sensitization following short-intensive scheduled immunotherapy in mite-allergic asthma. *Chest*, 1993; 103: 183-187.

286 Echechipía S, Tabar AI, Lobera T et al. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* glutaraldehyde-modified extract against an unmodified extract: A comparative study of efficacy, tolerance and *in vivo* and *in vitro* modification of parameters. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 1995; 5: 325-332.

287 Bachceciler NN, Isik U, Barlan IB, Basaran MM. Efficacy of sublingual immunotherapy in children with asthma and rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Pediatr Pulmonol*, 2001; 32: 49-55.

288 Dreborg S, Agrell B, Foucard T, Kjellman NIM, Koivikko A, Nilsson S. A double-blind, multicenter immunotherapy trial in children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarum* preparation. *Allergy*, 1986; 41: 131-140.

289 Golden DB, Marsh DG, Freidhoff LR et al. Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: 760-766.

290 Valovirta E, Koivikko A, Vanto T, Viander M, Ingeman L. Immunotherapy in allergy to dog: a double-blind clinical study. *Ann Allergy*, 1984; 53: 85-88.

291 Aas K. Hyposensitization in house dust allergy asthma. A double-blind controlled study with evaluation of the effect on bronchial sensitivity to house dust. *Acta Paediatr Scand*, 1971; 60: 264-268.

292 Ohman JL, Findlay SR, Leitermann KM. Immunotherapy in cat-induced asthma. Double-blind trial with evaluation of in vivo and in vitro responses. *J Allergy Clin Immunol*, 1984; 74: 230-239.

293 Warner JD, Price JF, Soothill JF, et al. Controlled trial of hyposensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus* in children with asthma (abstract). *Lancet*, 1978; 2: 912-915.

294 Adkinson NF, Eggleston PA, Eney D et al. A controlled trial of immunotherapy for asthma in allergic children. *N Engl J Med*, 1997; 336: 324-331.

295 Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L, et al. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol*, 1993; 91: 709-722.

296 Pajno GB, Morabito L, Barberio G, Parmiani S. Clinical and immunologic effect of long-term sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double blind, placebo-controlled study. *Allergy*, 2000; 55: 842-849.

297 Ariano R, Kroon AM, Augeri G, Canonica GW, Passalacqua G. Long-term treatment with allergoid immunotherapy with *Parietaria*. Clinical and immunologic effects in a randomized, controlled trial. *Allergy*, 1999; 54: 313-319.

298 Winther L, Malling HJ, Moseholm L, Mosbech H. Allergen-specific immunotherapy in birch- and grass-pollen-allergic rhinitis. I. Efficacy estimated by a model reducing the bias of annual differences in pollen counts. *Allergy*, 2000; 55: 818-826.

299 Bousquet J, Hejjaoui A, Skassa-Brociek W et al. Double blind, placebo controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. I. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard-grass pollen. *J Allergy Clin Immunol*, 1987; 80: 591-598.

300 Buchanan DJ, Hillis A, Williams PN. A double blind controlled trial of Bencard house dust mite (Migen) hyposensitisation in Zambian asthmatics. *Med J Zambia*, 1981; 15: 14-16.

301 British Tuberculosis Association. Treatment of house dust allergy. *Brit Med J* 1968; 3: 774-777.

302 Brunn E. Control examination of specific desensitization in asthma. *Acta Allergologica*, 1949; 2: 122.

303 Smith AP. Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen: trial in asthma induced by house dust. *Br Med J*, 1971; 4: 204-206.

304 D'Souza ME, Pepys J, Wells ID et al. Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* in house dust allergy: a controlled study of clinical and immunological effects. *Clin Allergy*, 1973; 3: 177-193.

305 Newton DAG, Maberley DJ, Wilson R. House dust mite hyposensitization. *Brit J Dis Chest*, 1978; 72: 21-28.

306 Mite Allergy Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Association. A trial of house dust mite extract in bronchial asthma. *Br J Dis Chest*, 1979;73:260-70.

307 Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of asthma: a meta-analysis of prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther*, 2000; 22: 329-341.

308 Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: a meta-analysis of prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther*, 2000; 22: 342-350.

309 Movérare R, Vesterinen E, Metso T, Sorva R, Elfman L, Haahtela T. Pollen-specific rush-immunotherapy: clinical efficacy and effects on antibody concentrations. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001; 86: 337-342.

310 Norman PS, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, March DG. Controlled evaluation of allergoid in the immunotherapy of ragweed hay fever. *J Allergy Clin Immunol*, 1982; 70: 248-260.

311 Lichtenstein LM, Ishizaka K, Norman PS, et al. IgE antibody measurements in ragweed hay fever: relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest*, 1973; 47: 165-180.

-
- 312 Mungan D, Misirligil Z, Gürbüz L. Comparison of the efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite-sensitive patients with rhinitis and asthma—a placebo controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1999; 82: 485-490.
- 313 Capron A, Dessaint JP. Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Annu Rev Immunol*, 1985; 3: 455-476.
- 314 Gagro A, Rabatic S, Trescec A, Dekaris D, Medar-Lasic M. Expression of lymphocyte Fc epsilon RII/CD23 in allergic children undergoing hyposensitization. *Int Arch Allergy Immunol*, 1993; 101: 203-208.
- 315 Jung CM, Prinz JC, Rieber EP, Ring J. A reduction in allergen-induced FcεR2/CD23 expression on peripheral B cells correlates with successful hyposensitization in grass pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*, 1995; 95: 77-87.
- 316 Corominas M, Mestre M, Bas J, et al. CD23 expression on B-lymphocytes and its modulation by cytokines in allergic patients. *Clin Exp Allergy*, 1993; 23: 612-617.
- 317 Gosset P, Tsicopoulos A, Wallaert B, Joseph M, Capron A, Tonnel A. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. *Am Rev Respir Dis*, 1992; 146: 768-774.
- 318 Dugas N, Vouldoukis I, Bécherel P et al. Triggering of CD23b antigen by anti-CD2 monoclonal antibodies induces interleukin-10 production by human macrophages. *Eur J Immunol*, 1996; 26: 1394-1398.
- 319 Thompson CB. Distinct role of the costimulatory ligands B7.1 and B7.2 in T helper cell differentiation? *Cell*, 1995; 81: 979-982.
- 320 Nakada M, Nishizaki K, Yoshino T et al. CD86 (B7-2) antigen on B cells from atopic patients shows selective, antigen-specific upregulation. *Allergy*, 1998; 53: 527-531.
- 321 Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, Leung DYM. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1998; 101: 96-102.

322 Morikawa H, Nagashima S. The role of costimulatory molecules (B7-1 and B7-2) on allergen-stimulated B cells in cedar pollinosis subjects. *Clin Exp Allergy*, 2000; 30: 383-392.

323 Van Nerveen RJ, Van de Pol MM, Van der Zee JS, Stiekema FE, De Boe M, Kapsenberg ML. Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression. *Clin Exp Allergy*, 1998; 28: 808-16.

324 Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, et al. Kinetics of intracytoplasmatic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry*, 1999; 35: 318-328.

325 Jung T, Lack G, Schauer U, Überück W, et al. Decreased frequency of interferon- γ and interleukin-2-producing cells in patients with atopic diseases measured at the single cell level. *J Allergy Clin Immunol*, 1995; 96: 515-527.

326 Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, Zembala M. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001; 8: 303-13.

327 Krug N, Jung T, Napp U, et al. Frequencies of T cells expressing interleukin-4 and interleukin-5 in asthmatic children: comparison with atopic asthmatic adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158: 754-759.

328 Magnan AO, Mély LG, Camilla CA et al. Assessment of the Th1/th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: 1790-1796.

329 Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood*, 1995; 86: 1408-1419.

330 Tang M, Kemp A, Varigos G. IL-4 and interferon-gamma production in children with atopic disease. *Clin Exp Immunol*, 1993; 92: 120-124.

331 Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy*, 2002; 32: 796-802.

332 Cho S-H, Stanciu LA, Begishvili T, Bates PJ, Holgate ST, Johnston SL. Peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell type 1 and type 2 cytokine production in atopic asthmatic and normal subjects. *Clin Exp All*, 2002; 32: 427-433.

333 Vieira P, De Waal Malefyt R, Dang MN, et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 1172-1176.

334 Moore KW, O'Garra A, De Waal Malefyt R, Vieira P, Mossmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, 1993; 11: 165-190.

335 Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF et al. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRFE. *Science*, 1990; 250: 830-832.

336 Koulis A, Robinson DS. The anti-inflammatory effects of interleukin-10 in allergic disease. *Clin Exp Allergy*, 2000; 30: 747-750.

337 Arock M, Zuany Aamorim C, Singer M, Benhamou M, Pretolani M. Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol*, 1996; 26: 166-170.

338 De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 1991; 174: 915-924.

339 Koning H, Neijens HJ, Baert MRM, Oranje AP, Savelkoul HFJ. T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis of IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production. *Cytokine*, 1997; 9: 427-436.

340 Kenyon NJ, Kelly EA, Jarjour NN. Enhanced cytokine generation by peripheral blood mononuclear cells in allergic and asthma subjects. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2000; 85: 115-120.

341 Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, et al. Interleukin-10 regulation in normal subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1996; 97: 1288-1296.

342 Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med*, 1988; 168: 1621-1637.

343 Baskar S, Hamilton RG, Norman PS, Ansari AA, Grass Immunotherapy induces inhibition of allergen-specific human peripheral blood mononuclear cell proliferation. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997; 112: 184-190.

344 Lamb JR, Skidmore BJ, Green N, Chiller JM, Feldmann M. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med*, 1983; 157: 143-1447.

345 Mueller DL, Jenkins MK, Chiodetti L, Schwartz RH. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *J Immunol*, 1989; 142: 2617-2628.

346 Mueller DL, Jenkins MK, Chiodetti L, Schwartz RH. An intracellular calcium increase and protein kinase C activation fail to initiate T cell proliferation in the absence of a costimulatory signal. *J Immunol*, 1990; 144: 3701-3709.

347 Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10 mediated immune suppression. *Immunology*, 2001; 103: 131-136.

348 Larché M. Changes in interferon- γ production following specific allergen immunotherapy: biology vs methodology. *Clin Exp Allergy*, 2000; 30: 297-300.

349 Stanciu LA, Shute J, Promwong C, Holgate ST, Djukanovic R. Increased levels of IL-4 in CD8+ T cells in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: 373-378.

350 Meissner N, Kussebi F, Jung T, et al. A subset of CD8+ T cells from allergic patients produce IL-4 and stimulate IgE production in vitro. *Clin Exp Allergy*, 1997; 27: 1402-1411.

351 Leonard C, Tormey V, Burke C, Poulter LW. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997; 17: 368-375.

352 Tang C, Rolland JM, Ward C, et al. Differential regulation of allergen-specific Th2-but no Th1-type responses by alveolar macrophages in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1998; 102: 368-375.

353 Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet*, 2001; 357: 752-756.

354 Morinobu A, Kumagai S, Yanagida H et al. IL-10 suppresses cell surface CD23/Fc epsilon RII expression not by enhancing soluble CD23 release, but by reducing CD23 mRNA expression in human monocytes. *J Clin Immunol*, 1996; 16: 326-333.

355 Thompson CB. Distinct role of the costimulatory ligands B7.1 and B7.2 in T helper cell differentiation? *Cell*, 1995; 81: 979-982.

356 Van Nerveen RJ, Van de Pol MM, Van der Zee JS, Stiekema FE, De Boe M, Kapsenberg ML. Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression. *Clin Exp Allergy*, 1998; 28: 808-16.

357 Robinson DS. T cell costimulation: a potential therapeutic target in asthma? *Clin Exp Allergy*, 1998; 28: 788-790.

358 Guerra F, Carracedo J, Solana-Lara R, Sánchez-Guijo P, Ramírez R. TH2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; 107: 647-653.