



Activación de linfocitos T en niños con asma

Dra. Rosa Elena Huerta Hernández*, Dr. José Antonio Ortega Martell,
Dra. Carola Durán**** Dr. José G Huerta López******

RESUMEN

Cada vez existe más evidencia en la literatura mundial de que la inmunidad mediada por células tiene participación en la patogénesis del asma, de existir este proceso, se esperaría la presencia de linfocitos T activados. La activación de linfocito T se acompaña de la expresión de ciertas moléculas de superficie que incluyen el antígeno de histocompatibilidad clase II (HLA-DR) y el receptor para la interleucina 2 (IL-2R). Estos marcadores dan indicio de la activación celular *in vivo*. Desde 1988 existen trabajos de investigación en adultos con asma grave, en donde se confirma esta hipótesis y se ve que la presencia de estos marcadores de activación correlaciona con la gravedad del cuadro clínico. En este trabajo se estudiaron los casos de 20 niños con asma leve, moderada o grave, a los cuales se les midieron los niveles de linfocitos T en sangre periférica y por medio de citometría de flujo la presencia o no de los marcadores de activación ya mencionados. Se compararon los resultados de citometría de flujo con los obtenidos en un grupo control de niños sin asma y de las mismas edades. La relación entre masculinos-femeninos fue de 2.3:1 y en cuanto a edades el grupo más numeroso fue el de preescolares (50%). En relación a la gravedad del asma, 15% tuvieron asma crónica leve, 70% asma crónica moderada y 15% asma crónica grave. No se encontró diferencia significativa entre los valores de marcadores de activación de linfocitos T de los pacientes que tuvieron crisis asmática leve o moderadas comparados con los niños de la misma edad en el grupo control; sin embargo, sí se encontró una diferencia significativa de la presencia de estos marcadores entre los niños con crisis asmáticas graves y su grupo etario de control. Los niños con crisis asmáticas graves se encontraban en el grupo de asma crónica grave (75%) y asma crónica moderada (25%). **Conclusiones:** De acuerdo a estos resultados podemos afirmar que en nuestro grupo de estudio encontramos una correlación directamente proporcional entre la gravedad del asma y especialmente de la crisis asmática, con la presencia de marcadores de activación de linfocitos T en sangre periférica. Es necesario continuar más estudios orientados en este sentido para poder entender más la fisiopatogenia de la respuesta asmática y así poder ofrecer mejores alternativas terapéuticas a los pacientes.

Palabras clave: Linfocitos T, marcadores de activación, sangre periférica, asma grave.

ABSTRACT

*More and more, there is evidence in world literature indicating that immunity gotten by means of cells has takes part in asthma pathogenesis. If this process really existed, we would expect the presence of activated T lymphocytes. The activation of T lymphocytes goes along with the expression of certain surface molecules that include the class II antigen of hystocompatibility (HLA-DR) and the interleukin-2 receptor (IL-2R). These markers indicate the *in vivo* cellular activation. Since 1988 there are some*

* Alergóloga Pediátrica. Clínica de Alergía Pediátrica. Pachuca, Hidalgo. Miembro del Colegio Mexicano de Pediatras Especialistas en Inmunología Clínica y Alergia.

** Vicepresidente del Colegio Mexicano de Pediatras Especialistas en Inmunología Clínica y Alergia. Periodo 2008-2009.

*** Jefa del Departamento de Dermatología, INP.

**** Jefe del Servicio de Alergias, Instituto Nacional de Pediatría, México.

research works in grown-up people suffering from severe asthma. These studies confirm the mentioned hypothesis and show that the presence of these activation markers is correlated with the severity of the clinical condition. In this study, the cases of 20 children with mild, moderated and severe asthma were studied. The children were measured their levels of T lymphocytes in peripheral blood and the presence or not of the already mentioned activation markers though flow cytometry. The flow cytometry results were compared with the ones obtained from a control group of children having no asthma and with the same age. The male-female ratio 2.3:1 and with relation to the ages, the pre-school group was the most numerous (50%). With regard to the asthma severity, 15% of the children had mild chronic asthma, 70% had moderated chronic asthma, and 15% severe chronic asthma. There was no significant difference among the values of T lymphocytes activation markers in the patients suffering from asthmatic mild or moderated crisis when compared with the values from the children of the same age in the control group. There was, however, a significant difference in the presence of those markers between the children with severe asthmatic crisis and those children from the same age in the control group. The children suffering from severe asthmatic crisis could be found in the group of severe chronic asthma (75%) and moderated chronic asthma (25%). **Conclusions:** According to these results we can assert that, in our group of study, we found a directly proportional correlation between asthma severity –and especially asthmatic crisis– and the presence of activation markers of lymphocytes T in peripheral blood. It is necessary to carry on more studies oriented in this sense in order to be able to understand a lot more the physiopathogeny of the asthmatic response and offer better therapeutical options for the patients.

Key words: T lymphocytes, activation markers, peripheral blood, asthma severity.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha dado mucha atención al infiltrado inflamatorio dentro de las vías aéreas de los pacientes con asma.¹ Tal inflamación puede ser la base de la hiperrespuesta que es característica de esta enfermedad; los linfocitos son prominentes entre las células inflamatorias que infiltran los bronquios en los estudios de autopsia de los pacientes que mueren por asma,² pero poco se sabía del posible papel de los linfocitos en esta enfermedad. Además la cuestión de si estas células pueden contribuir de alguna manera a la patogénesis del asma, es relativamente reciente y se le ha dado poca atención.

El primer estudio relacionado a esto, realizado en 1988 utilizando citometría de flujo para medir la expresión de marcadores de activación de los linfocitos T en pacientes con crisis asmática grave, demostró linfocitos T activados en la sangre periférica de estos pacientes y el porcentaje de estas células disminuyó después del tratamiento y la mejoría clínica.³

Los marcadores de activación que se han medido son los antígenos de histocompatibilidad clase II (HLA-DR), el receptor de interleucina – 2 (IL-2R)⁵ y VLA-1, un marcador que aparece después de activación prolongada *in vitro*.⁶

Un estudio posterior mostró que los marcadores de activación se presentaron solamente en las células CD4 + y no en las CD8 +; además estas alteraciones se correlacionaron con cambios en las medidas objetivas de la obstrucción de las vías aéreas

de los pacientes, sugiriendo que las dos pudieran estar causalmente relacionadas.⁷ Interesantemente, se vieron menos células CD4 + activadas y concentraciones menores de sus productos de activación (interferón gamma, interleucina 2), en los pacientes atópicos comparado con los asmáticos no atópicos, sugiriendo que pueden haber otros factores que estén contribuyendo a la broncoconstricción aguda en el grupo atópico.⁷ Una explicación para estas observaciones es que diferentes subgrupos de células CD4 + se activen preferencialmente en asmáticos atópicos y no atópicos. Se sabe desde hace varios años que los linfocitos T juegan un papel importante en la producción y función de los eosinófilos, a través de la liberación de mediadores solubles. Una de las linfocinas más importantes en este sentido es la interleucina-5, la cual promueve la diferenciación terminal de los precursores de eosinófilos,⁸ así como aumenta la capacidad efectora de los eosinófilos maduros.⁹ Se ha visto que el número de células T activadas correlaciona con el grado de eosinofilia de sangre periférica;¹⁰ con el número de eosinófilos en líquido de lavado broncoalveolar, con la severidad de los síntomas y el grado de hiperrespuesta bronquial.¹¹

Hasta la fecha se han descrito 2 subpoblaciones de células T CD4 + de acuerdo a su patrón de secreción de citocinas: las células Th1 producen IL-2 e interferón gamma, pero no IL-4 o IL-5, mientras que las Th2 producen IL-4 e IL-5, pero no interferón gamma ni IL-2.¹² Las células Th1 median reacciones de hipersensibilidad retardada mientras que las Th2 pro-

mueven la producción preferencial por las células B de IgE, IgA, IgG1 e IgM.¹³

En humanos se ha demostrado también la existencia de 2 subpoblaciones de células CD4+ con características similares a las murinas y recientemente se demostró en el líquido de lavado broncoalveolar de asmáticos adultos atópicos, la presencia de células activadas compatibles con la subpoblación de células Th2; la mayoría de estas células mostró el fenotipo CD45RO (células de memoria).¹⁴

JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos que determinan la selección del fenotipo de células T en enfermedades atópicas, son de considerable importancia para el entendimiento de la alergia. El conocimiento de estos mecanismos dará la oportunidad para la manipulación terapéutica de los diferentes subgrupos de las células T cooperadoras, dando manejo dirigido hacia el posible factor etiológico.

OBJETIVO

Evaluar en una población pediátrica con asma la existencia de marcadores de activación en linfocitos T y comparar con la severidad clínica del cuadro.

HIPÓTESIS

Existe correlación entre la presencia de marcadores de activación de células T y la severidad del asma (asma grave).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 20 niños que acudieron al Servicio de Alergia del Instituto Nacional de Pediatría con el diagnóstico de asma.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Niños de uno y otro sexo, de 1 a 18 años de edad con diagnóstico de asma de cualquier severidad (leve, moderada o grave) con o sin crisis asmática (leve, moderada o grave) al momento del estudio, con o sin etiología alérgica.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Niños que estén tomando o hayan recibido esteroides sistémicos 15 días previos a la toma de la muestra.

Niños que están tomando o hayan recibido esteroides inhalados en las 12 horas previas a la toma de la muestra.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Niños que no cumplan con los requisitos de los datos planteados.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

A los pacientes se les realizó una evaluación clínica para determinar la gravedad del asma y en caso de encontrarse en crisis asmática se hizo también una evaluación de la gravedad de la misma. Se les tomó una muestra de 4 mililitros de sangre total para determinar los siguientes exámenes de laboratorio: cuenta de leucocitos totales en sangre periférica con diferencial de linfocitos, polimorfonucleares, eosinófilos; CD4, CD8, CD3/HLA-DR, IL-2R, T4/CD45, T4/CD29, con un flujo fluorocitómetro marca Coulter. Se incubaron 100 microlitros de sangre total para cada anticuerpo y 100 microlitros de sangre total para su respectivo control isotópico; se agregaron 10 microlitros del anticuerpo correspondiente, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y se leyó unificando a la población de linfocitos, leyendo 5,000 eventos. Como control se tomó un grupo de niños de edades similares a las de los pacientes, sin antecedentes de enfermedad alérgica para la determinación de las subpoblaciones de los linfocitos, y que acudieron a la toma de productos para la extracción de muestras sanguíneas para procedimientos preoperatorios a cirugías menores, previa autorización de los padres o tutores.

DEFINICIONES OPERACIONALES¹⁵

Asma. Síndrome clínico caracterizado por aumento en la respuesta traqueobronquial a diferentes estímulos manifestada por grados variables de inflamación y obstrucción de las vías aéreas con reversibilidad espontánea o con tratamiento.

Flujo máximo espiratorio. (Peak Expiratory Flow Rate) (PEFR). Es la máxima velocidad de flujo que se puede obtener durante una espiración forzada después de una inhalación máxima.

Asma leve. Exacerbación de tos y sibilancias menos de dos veces por semana, tos nocturna menos de dos veces por mes, no necesita tratamiento de prehospitalización ni hospitalización.

Asma moderada. Exacerbación de tos y sibilancias más de dos veces por semana, tos nocturna menos de 3 veces por semana, prehospitalización menos de 3 veces al año y hospitalización menos de dos veces al año.

Asma grave. Ttos y sibilancias todos los días, tos nocturna todas las noches, prehospitalización más de 3 veces al año y hospitalización más de dos veces al año.



Pulso paradójico. Es la diferencia de presión sistólica que existe entre la inspiración y la espiración. La presión cae con la inspiración y se eleva con la espiración.

Crisis asmática leve. Estado de alerta normal, pulso paradójico menor de 10 mmHg, retracción xifoidea, coloración normal, sibilancias respiratorias, PEFR 70-90% del estimado para la edad y talla del paciente.

Crisis asmática moderada. Estado de alerta normal, pulso paradójico 10-20 mmHg, retracción xifoidea y tiros intercostales, coloración pálida, sibilancias respiratorias e inspiratorias, PEFR 50-69% del estimado para la edad y talla del paciente.

Crisis asmática grave. Estado de alerta disminuido, pulso paradójico mayor de 20 mmHg, retracción xifoidea, tiros intercostales y aleteo nasal, coloración cianótica, ausencia de ruidos respiratorios, PEFR menor al 50% del estimado para la edad y talla del paciente.

Atópico. Individuo con pruebas cutáneas positivas (roncha de 2 mm o más de diámetro a los 15 minutos con presencia de control negativo y control positivo con histamina) a uno o más aeroalergenos ambientales y/o niveles elevados de IgE.

Eosinofilia. Más de 400 eosinófilos totales en sangre periférica.

Niveles elevados de marcadores de activación de células T. Cuando se encuentren por arriba de dos desviaciones estándar con relación al promedio que se haya obtenido de la muestra de sangre del niño del grupo control.

Alteración en el patrón de subpoblaciones de linfocitos. Cuando sea diferente al patrón mostrado por el niño que le sirva como control.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

- 1) Se compararon primero los valores de los linfocitos del paciente con sus respectivos controles por medio de una prueba t de Student.
- 2) Se compararon entre los diferentes grados de severidad del asma.
- 3) Se comparó entre los niños con atopia y sin datos de atopia (t de Student).
- 4) Se compararon los valores de los linfocitos con la tasa de flujo máximo espiratorio (gravedad funcional) (análisis de varianza de doble entrada).

RESULTADOS

La relación entre masculinos:femeninos fue de 2.3:1 y en cuanto a edades, el grupo más numeroso fue el de preescolares (50%) (Cuadro I).

Cuadro I.

Grupo de edad	Masculinos	Femeninos
Lactantes	2	0
Pre-escolares	6	4
Escolares	3	1
Adolescentes	3	1
Total	14	6

Cuadro II. Crisis asmática.

	Leve	Moderada	Grave
Asma leve	2	1	0
Asma moderada	10	3	1
Asma grave	0	0	3
Total	12	4	4

En relación a la gravedad del asma, 15% tuvieron asma crónica leve, 70% asma crónica moderada y 15% asma crónica grave. Todos los pacientes fueron estudiados durante una crisis asmática y se encontraron 60% en crisis leve, 20% en crisis moderada y 20% en crisis grave (Cuadro II).

Los niños con crisis asmáticas graves se encontraban en el grupo de asma crónica grave (75%) y asma crónica moderada (25%).

No se encontró diferencia significativa entre los valores de marcadores de activación de linfocitos T de los pacientes que tuvieron crisis asmáticas leves o moderadas, comparados con los niños de la misma edad en el grupo control; sin embargo, sí se encontró una diferencia significativa en la presencia de estos marcadores, específicamente HLA-DR y el receptor de IL-2 (IL-2R) entre los niños con crisis asmática grave y su grupo etario de control como se demuestra en el cuadro III.

DISCUSIÓN

Ying, Corrigan, Durhan, Kay y cols.¹⁶ en 1997 encontraron que tanto en el líquido de lavado broncoalveolar, como en las biopsias de mucosa endobronquial de pacientes con asma existían células T activadas. Demostraron que estas células expresaban antígenos de superficie HLA-DR y CD25 (IL-2 R) en mayor cantidad que las células del grupo control. En nuestro estudio encontramos también evidencia de activación de linfocitos T de sangre periférica durante las crisis asmáticas graves, lo cual apoya la hipótesis de la gran partici-

Cuadro III. Correlación entre los niveles obtenidos de los marcadores de activación (%) entre cada paciente y su control.

Paciente/control	CD4	CD8	HLA-DR	IL-2R	CD45	CD29	p
Crisis asmática leve							
1	45	40	22	20	2	0	3
2	33	36	24	23	3	1	2
4	45	48	22	24	3	1	1
6	44	46	26	27	2	4	4
8	44	40	23	22	2	1	2
9	48	44	30	31	4	2	4
10	45	42	27	28	5	4	1
11	46	44	22	24	4	3	1
15	45	46	26	23	3	1	1
17	40	37	20	22	3	2	3
18	37	39	28	26	4	4	1
20	47	46	31	30	3	1	2
Crisis asmática moderada							
7	38	36	29	23	1	3	3
13	39	37	34	30	2	3	2
16	44	42	22	20	2	2	4
19	44	42	30	27	2	3	1
Crisis asmática grave							
3***	42	40	28	27	29	2	4
5***	39	40	29	28	30	4	2
12***	38	36	28	30	3	2	33
14***	48	49	28	26	1	2	38

pación que tienen estas células como coordinadoras de la respuesta alérgica. Debido a que los linfocitos de los pacientes de nuestro estudio fueron obtenidos de sangre periférica, es explicable que no hayamos encontrado datos de activación en pacientes con crisis asmáticas leves o moderadas, ya que los linfocitos circulantes son solamente un reflejo indirecto de la inflamación que ocurre en esos momentos en el tejido bronquial y por lo tanto, a mayor gravedad del proceso inflamatorio es también mayor la probabilidad de encontrar linfocitos activados, circulando en sitios lejanos al tejido bronquial.^{3,7} En diferentes estudios, se ha podido caracterizar a estos linfocitos T como del subtipo Th2 por el patrón de citocinas que producen y el UNAM para IL-4 e IL-5 existente en el citoplasma de estas células¹⁶⁻¹⁸ y recientemente también se han encontrado evidencias de que los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) también producen citocinas con patrones semejantes a los de las subpoblaciones Th1 y Th2, por lo que se les ha

llamado Tc1 y Tc2.¹⁹ Es probable que los linfocitos Tc2 produzcan IL-5 e IL-4 en respuesta a infecciones virales y así puedan favorecer la respuesta inflamatoria alérgica.²⁰ En nuestro estudio solamente valoramos la activación de linfocitos en general y se requieren más estudios para conocer si existen diferencias entre la activación de linfocitos Th1, Th2, Tc1 y Tc2 *in situ* en el tejido bronquial.

CONCLUSIONES

De acuerdo a estos resultados podemos afirmar que en nuestro grupo de estudio encontramos una correlación directamente proporcional entre la gravedad del asma y especialmente de la crisis asmática, con la presencia de marcadores de activación de linfocitos T en sangre periférica. Es necesario continuar más estudios orientados en este sentido para poder entender más la fisiopatogenia de la respuesta asmática y así poder ofrecer mejores alternativas terapéuticas a los pacientes.



BIBLIOGRAFÍA

- Cheng KF. Role of inflammation in the hyperreactivity of the airways. *Thorax* 1986; 41: 657-62.
- Dunnill MS. The pathology of asthma. In: Middleton E. Jr. Reed CE, Ellis EF eds. *Allergy Principles and practice*. St. Louis: CB Mosby 1989: 768-86.
- Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T Lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1988; 1: 1129-32.
- Reinhertz EL, Kung PC, Pesando JM, Ritz J, Goldstein G, Schlossman SF. Ia determinants in human T cell subsets defined by monoclonal antibody. *J Exp Med* 1979; 150: 1472-82.
- Centrell DA, Smith KA. Transient expression of interleukin-2 receptors. *J Exp Med* 1983; 158: 1895-911.
- Hemler ME, Jacobson JG, Brenner MB, Mann D, Stroununger JL. VLA-1 a T cell surface antigen which defines a novel late stage of human T cell activation. *J Immunol* 1985; 15: 502-8.
- Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 970-7.
- Clutterbuck EJ, Hirst EMA, Sanderson CJ. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* 1988; 73: 1504-13.
- Lopez AF, Sanderson CJ, Gomble JR, Campbell HR, Young IG, Vadas MA. Recombinant human IL-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988; 167: 219-24.
- Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JB, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1745-53.
- Robinson AS, Bentley AM, Durham SR, Kay AB. T helper lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage (BAL) from atopic asthmatics: correlation with eosinophils, symptoms, and bronchial hyperresponsiveness. Vienna, Austria. *Eur Res Rev* 1991. Abstract.
- Mosman TR, Cherwinski H, Bond MW, Guldin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Immunol* 1986; 136: 2348-57.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham S, Kay AB. Predominant TH2 like bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326: 298-304.
- National Asthma Education Program. *Expert panel report. Guidelines for the diagnosis and management of asthma*. National Heart, Lung and Blood Institute. National Institute of Health. Publication # 91 - 3,042. Bethesda, Maryland. 1991: 10, 17, 23, 104-5.
- Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Larche M, Durham SR, Kay AB. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and non-atopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1997; 158: 3539-44.
- Corrigan CJ, Hamid Q, North J et al. Peripheral blood CD4, but not CD8 T lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern; effect of glucocorticoid therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 567-78.
- Robinson DS, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased Th2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 313-24.
- Till S, Li B, Durham SR et al. Secretion of the eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 by bronchoalveolar lavage CD4+ and CD8+ T cell lines in atopic asthmatics, and atopic and non-atopic controls. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2727-31.
- Coyle AJ, Erard F, Bertrand C, Walti S, Pircher H, Le Gros G. Virus-specific CD8+ cells can switch to interleukin-5 production and induce airway eosinophilia. *J Exp Med* 1995; 181: 1229-33.

Dirección para correspondencia:

Dr. José Antonio Ortega Martell

Alergia e Inmunología

Vicepresidente del Colegio Mexicano de

Pediatras Especialistas en Inmunología

Clinica y Alergia.

Tel. y fax: (52) 771 719 1245