

Marcadores séricos de inmunidad innata (CD14) y adaptativa (CD25, CD26) en pacientes con asma alérgico



Juan José Nieto Fontarigo¹, Francisco Javier González Barcala², María Esther San José Capilla², María del Pilar Arias Crespo¹, Montserrat Nogueira Álvarez¹, Francisco Javier Salgado Castro¹.

¹Grupo Biología del Linfocito (BioInfo). Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS)-Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, ES. ²Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), Santiago de Compostela, ES

Financiación: Este trabajo fue financiado con los proyectos FIS (P113/02046), SEPAR (121/2012) y Xunta de Galicia (PS07/23).

(1)
(2)



1) Objetivos

La inmunidad adaptativa y en particular las células T_{H2} son linfocitos T efectoras (Tef) importantes en asma alérgica, pero es probable que otros linfocitos jueguen también un papel, como por ejemplo los linfocitos T reguladores (Treg). El número y función de las células T reguladoras, efectoras y el equilibrio Tef/Treg podrían estar alterados en asma, lo cual podría relacionarse además con la gravedad. La superficie de las células Treg está caracterizada por unos elevados niveles de expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) y por bajos niveles de expresión de CD26 (fenotipo CD25^{high}CD26^{low}), mientras que las células Tef se caracterizan por un fenotipo inverso (CD25^{low}CD26^{high}). Por otro lado, las células de la inmunidad innata como los monocitos/macrófagos también son importantes en esta patología, y estas células expresan CD14 en su superficie, un receptor de membrana importante para el reconocimiento del lipopolisacárido bacteriano (LPS) y la producción de citoquinas como IL-12/IL18. Dado que en la membrana de las células existe un recambio normal de proteínas por el cual aparecen en el medio extracelular, y dado que muchas proteínas de la superficie celular presentan derivados solubles generados mediante procesos de lipólisis/proteólisis o liberación activa de vesículas (exosomas, microvesículas, vesículas apoptóticas, etc), el objetivo de este trabajo fue evaluar simultáneamente la actividad de las ramas innata y adaptativa del sistema inmunológico a través del análisis de la concentración de los derivados solubles de CD14 (sCD14), CD25 (sCD25) y CD26 (sCD26).

2) Características de la población de estudio

En este estudio se trabajó con una población de 178 individuos (97 controles y 81 pacientes con asma alérgica; rango similar de edad de 18-67 años y de proporción de sexos). Para la confirmación del diagnóstico de asma alérgica se realizaron tests de atopia y espirometría con prueba broncodilatadora, así como se analizaron otros parámetros hematológicos como el número de eosinófilos por mm³, las concentraciones de IgE (U/mL) o la enolasa neural específica (NSE, ng/mL) (Figura 1). Como se puede apreciar, las características de los pacientes asmáticos coinciden con lo esperado. Así, existe una ligera reducción en los niveles del porcentaje del volumen espiratorio forzado en 1 seg (FEV1%) y del cociente entre este parámetro y la capacidad vital forzada (FEV1/FVC). Esta reducción es, en promedio, un 89%, indicando un ligero grado de obstrucción de las vías aéreas en la mayor parte de los pacientes (Tabla 1). También se puede ver un aumento significativo tanto del número de eosinófilos (Tablas 1 y 2; Figura 1) en sangre periférica como de la concentración en suero de IgE (Tablas 1 y 2; Figura 1) en comparación con la población control, signos ambos del asma alérgica. Además, se puede observar la presencia de un aumento de los niveles de inflamación en pacientes con asma alérgico, reflejado en la elevación de la concentración sérica de NSE en comparación con los controles (Tablas 1 y 2; Figura 1).

PARÁMETROS GENERALES	HOMBRES	MUJERES	AMBOS
N	33	48	81
EDAD (Años ± SD)	35.1 ± 13.6	38.0 ± 12.7	36.3 ± 13.1
RANGO EDADES (años)	18 - 63	18 - 67	18 - 67
FUMADORES (%)	45.5	18.75	26.6
IMC (kg/m ² ± SD)	27.2 ± 4.7	25.6 ± 4.2	26.3 ± 4.4
GRAVEDAD ASMA:			
LEVE	2	4	6
MODERADO/ALTA	31	44	75
CONTROL:			
BUENO	23	37	60
MALO	10	11	21
TRATAMIENTO:			
NO	1	2	3
CORTICOSTEROIDES INHALADOS	32	46	78
CORTICOSTEROIDES ORALES	2	3	5
ANTIILEUCOTRIENOS	6	19	25
OMALIZUMAS	0	1	1
FUNCIÓN PULMONAR			
FEV1 (% ± SD)	87.7 ± 21.23	90 ± 19.1	89 ± 19.9
FEV1/FVC (% ± SD)	73.27 ± 12.31	72.9 ± 12.2	73.1 ± 12.2
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLOGICOS			
LINFOCITOS/mm ³ (Mediana ± SD)	2441.3 ± 865.2	2254.5 ± 651.5	2302.8 ± 800.57
EOSINÓFILOS/mm ³ (Mediana ± SD)	263.4 ± 210.2	374.5 ± 278.3	370.9 ± 221.6
NEUTRÓFILOS/mm ³ (Mediana ± SD)	4718.2 ± 2075.7	4097.9 ± 1620.7	4351.75 ± 1840.1
IgE (U/ml ± SD)	636 ± 707.5	477.6 ± 742.8	334.4 ± 721.1
NSE (ng/ml ± SD)	19.7 ± 10.1	15.5 ± 9.1	17.2 ± 9.8

PARÁMETROS GENERALES	HOMBRES	MUJERES	AMBOS
N	56	41	97
EDAD (Años ± SD)	37.3 ± 11.7	39 ± 12.4	38.6 ± 12.1
RANGO EDADES (años)	18 - 58	19 - 58	18 - 58
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLOGICOS			
LINFOCITOS/mm ³ (Mediana ± SD)	2121.1 ± 600	2050 ± 765.1	2082.9 ± 699.2
EOSINÓFILOS/mm ³ (Mediana ± SD)	234.4 ± 207.3	118.6 ± 89.4	171.9 ± 158.9
NEUTRÓFILOS/mm ³ (Mediana ± SD)	3953.1 ± 1859.4	3993.2 ± 1939.2	3976.3 ± 1895.1
IgE (U/ml ± SD)	177.6 ± 349.7	7 ± 61.7	246.21 ± 8
NSE (ng/ml ± SD)	12.6 ± 5.1	11.2 ± 3.4	11.7 ± 3.5

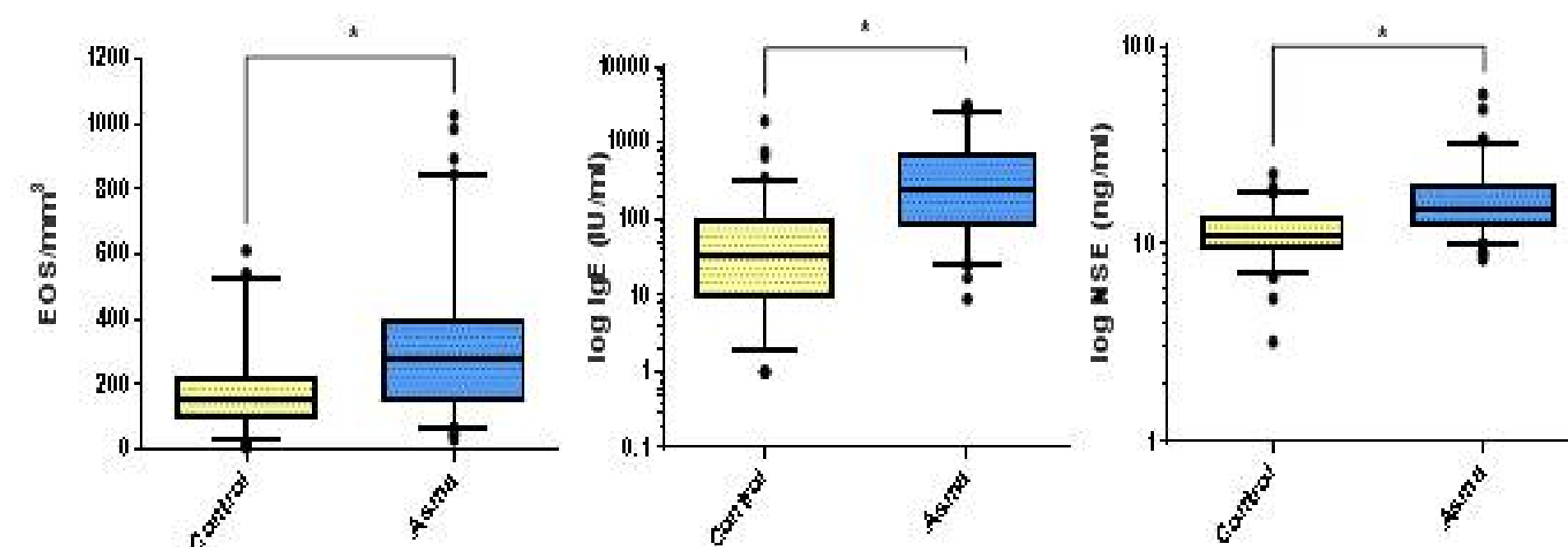


Figura 1. Niveles de eosinófilos en sangre periférica (EOS/mm³), IgE (U/mL) y enolasa neural específica (NSE, ng/mL) en pacientes asmáticos en comparación con la población control. Se muestra la mediana, los cuartiles 25 y 75, la desviación estándar y los valores atípicos. *p < 0.05.

3) Influencia del sexo en sCD26 y asma

Algunas magnitudes bioquímicas pueden verse afectadas por factores preanalíticos como el sexo o la edad. Cuando se estudió dicha influencia se observó el esperado aumento de leptina (LEP) en mujeres considerando conjuntamente las poblaciones control y asmática (población total; Tabla 3), mientras que NSE, IgE, CD14, sCD26 y el cociente sCD26/sCD25 presentaban valores significativamente mayores en hombres (población total; Tabla 3). Este aumento de sCD26 en hombres se observó fundamentalmente en la población asmática (Tabla 3), y contrasta con el papel como adipocina que ha sido atribuido a sCD26 por ciertos investigadores (Sell H *et al.*, Diabetes Care, 2013). Ni la concentración sérica de sCD26 ni otras magnitudes analizadas estaban influenciadas por la edad, tabaquismo, índice de masa corporal (BMI), gravedad o grado de control del asma.

PARÁMETROS	POBLACION TOTAL	CONTROLES	ASMÁTICOS
NSE	Significativo (p=0.003) **	Significativo (p=0.017) **	Significativo (p=0.028) **
IgE	Significativo (p=0.009) **	Significativo (p=0.003) **	No Significativo
LEP	Significativo (p=0.001) **	Significativo (p=0.001) **	Significativo (p=0.001) **
CD14	Significativo (p=0.020) **	No Significativo	No Significativo
sCD26	Significativo (p=0.018) **	No Significativo	Significativo (p=0.002) **
sCD26/sCD25	Significativo (p=0.007) **	No Significativo	Significativo (p=0.028) **
BAFOFILOS	Significativo (p=0.007) **	No Significativo	Significativo (p=0.002) **
MONOCITOS	No Significativo	No Significativo	Significativo (p=0.018) **
RBP	No Significativo	No Significativo	Significativo (p=0.008) **
IgM	No Significativo	Significativo (p=0.007) **	No Significativo

*-Student, **U de Mann-Whitney

4) Inmunidad innata: CD14, sCD14 y asma alérgico

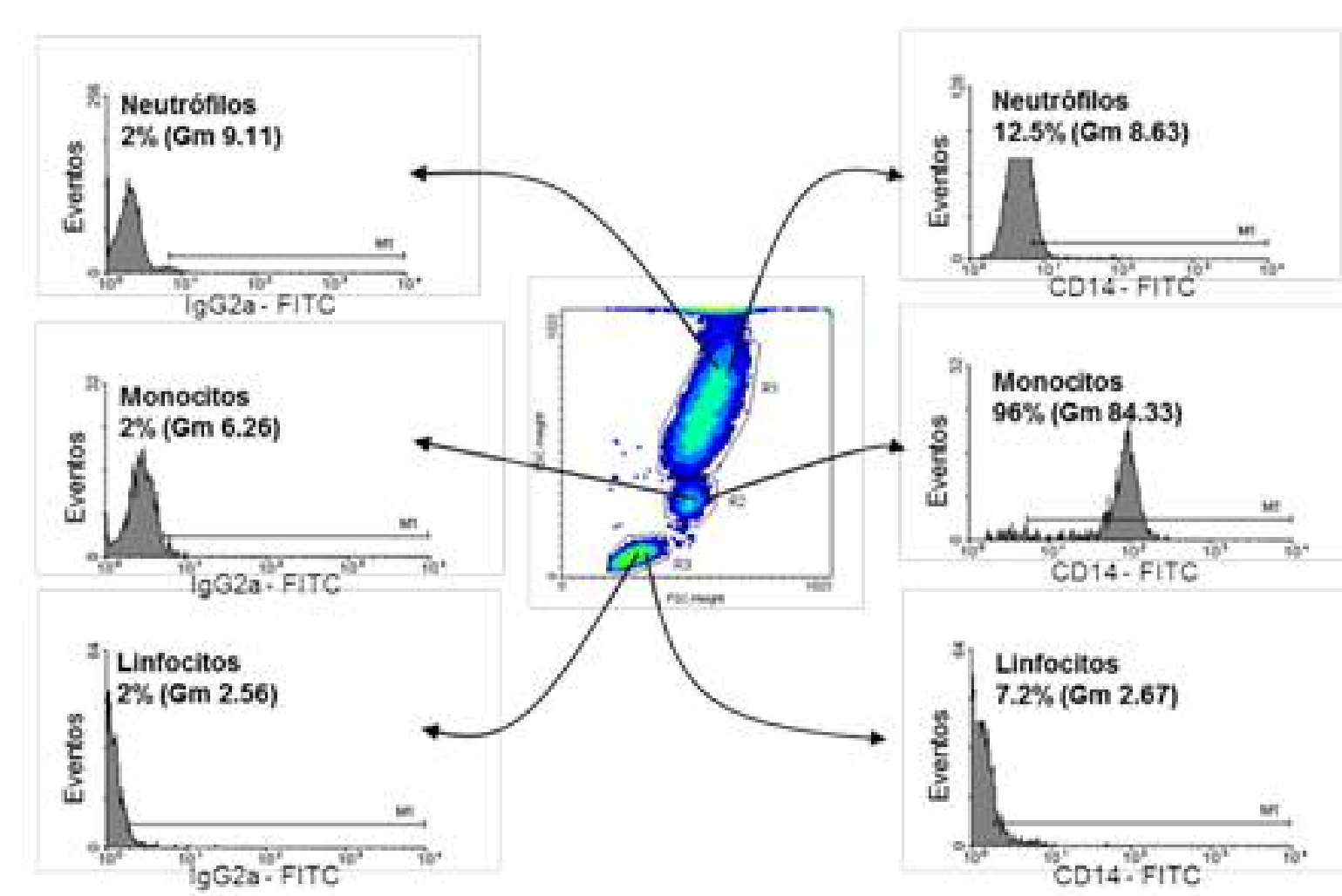


Figura 2. Expresión de CD14 en las principales subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica. Los resultados de los ensayos de citometría de flujo muestran la expresión de CD14 en diferentes poblaciones de leucocitos seleccionadas en base a sus valores de forward scatter (FSC, eje x) y side scatter (SSC, eje y). Neutrófilos/R1, monocitos/R2 y linfocitos/R3. Las células se marcaron bien con CD14-FITC o en el caso de los controles isotipos con el anticuerpo inespecífico correspondiente (IgG2a-FITC). En los histogramas la intensidad de fluorescencia (eje x) se representa frente al número de eventos analizados (eje y) para cada subpoblación (R1-R3). Durante el análisis se ha seleccionado un umbral inespecífico del 2%. Se muestra un resultado representativo de uno de los donantes. Se observa claramente que CD14 es fundamentalmente expresado por monocitos.

Dentro del sistema inmune innato CD14 es expresado fundamentalmente en los monocitos/macrófagos (Figura 2). El número de moléculas de CD14 en la superficie de monocitos, inferido a partir de los valores de intensidad media de fluorescencia (MF), se reduce significativamente (p < 0.05) en pacientes asmáticos en comparación con la población de referencia (Figura 3A). Sin embargo, y contrario a lo esperado, no se han detectado diferencias significativas en los niveles de sCD14 entre individuos asmáticos y controles (Figura 3B), ni tampoco existe correlación entre el número de moléculas de CD14 en la superficie de los monocitos (MF) y la concentración de sCD14 en el suero (Figura 3C).

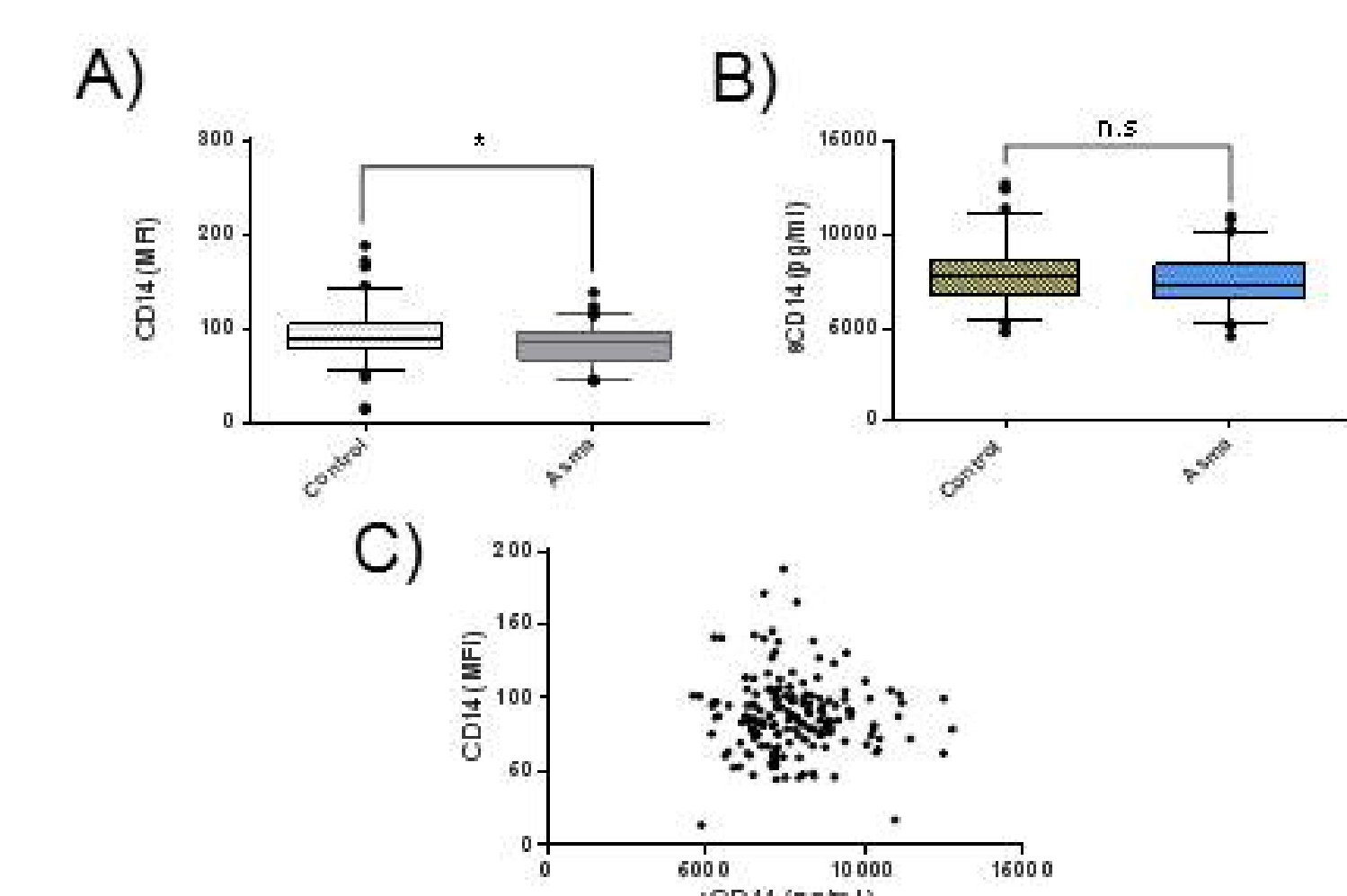


Figura 3. Niveles de CD14 y sCD14 en controles y asmáticos. A) Gráfico de caja y bigotes mostrando la intensidad media de fluorescencia (MF) de CD14 en la superficie de monocitos. Cada uno de los valores de partida utilizados para generar la gráfica (control, n=97; asma, n=81) se correspondía con una media geométrica de unidades arbitrarias de fluorescencia procedente de un número total de 10000 eventos. Se aprecia una reducción significativa de los niveles de CD14 en la superficie de monocitos en pacientes con asma alérgica en comparación con la población control. B) Los niveles de sCD14 en el suero (ng/ml) de controles (n=97) y pacientes asmáticos (n=81) no muestran diferencias significativas. C) Ausencia de correlación entre los niveles de CD14 (MF) y la concentración de sCD14 en suero (ng/ml). *p < 0.05, n.s. = no significativo.

5) Inmunidad adaptativa: sCD25, sCD26, cociente sCD26/sCD25 y asma alérgico

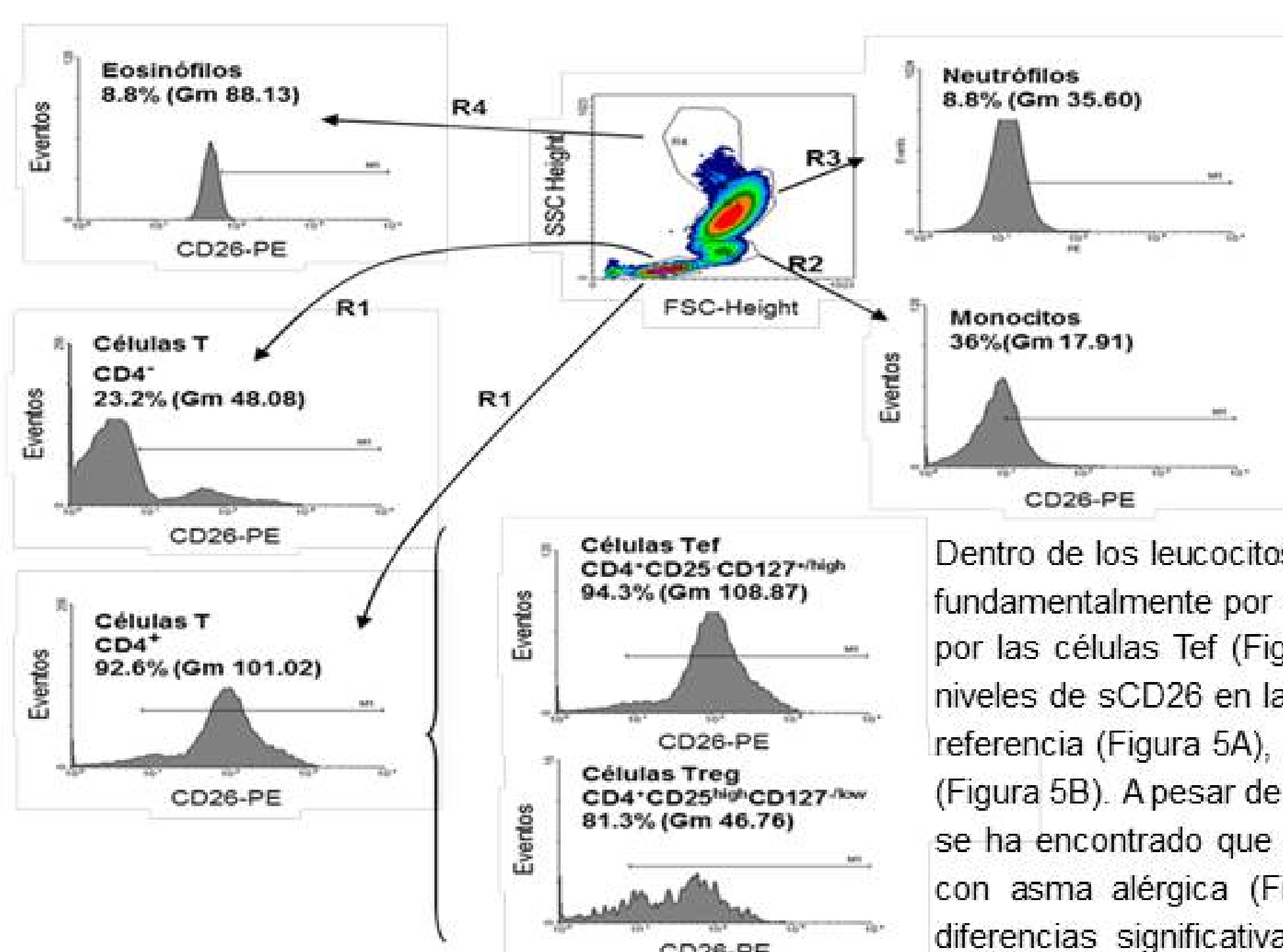


Figura 4. Expresión de CD26 en las principales subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica. Los gráficos de citometría de flujo muestran la expresión de CD26 seleccionada en diferentes poblaciones de leucocitos. Las células se marcaron con CD4-FITC, CD25-PE-Cy7, CD127-Alexa 647, CD26-PE o con los anticuerpos isotipos correspondientes (IgG1e-FITC, IgG1k-PE-Cy7, IgG1k-Alexa 647 y IgG1k-PE). Las diferentes subpoblaciones se seleccionaron en función de sus características de "forward scatter" (FSC) y "side scatter" (SSC). Linfocitos/R1, monocitos/R2, neutrófilos/R3 y eosinófilos/R4. Dentro de los linfocitos (R1) las células se subdividieron en función de la expresión del marcador CD4, y dentro de las células CD4+ (linfocitos T helper o T) las células se separaron en función de los niveles de CD25 y CD127 en células T efectoras (Tef) y células T reguladoras (Treg). En cada una de estas poblaciones se analizó la expresión de CD26. Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia de CD26 (eje y) frente al número de eventos (eje x) para cada subpoblación. Los controles negativos se omitieron para la mayoría de los gráficos de la figura, aunque siempre se consideró un 2% de falsos positivos. Se muestra un resultado de un donante representativo. Como se puede observar la expresión de CD26 es mayor en células Tef que en células Treg y otras subpoblaciones leucocitarias.

Dentro de los leucocitos de sangre periférica CD26/dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) es expresado fundamentalmente por las células T CD4⁺ (T_H o T helper), y dentro de esta última subpoblación por las células Tef (Figura 4). Sin embargo, no se observa una reducción significativa en los niveles de sCD26 en la población de pacientes asmáticos en comparación con la población de referencia (Figura 5A), a menos que los valores sean relativizados por el número de linfocitos (Figura 5B). A pesar de ser un marcador de activación celular (Hoeger PH *et al.*, Allergy, 1994), se ha encontrado que los niveles de sCD25 están significativamente reducidos en pacientes con asma alérgica (Figura 6A y B). En cambio, la proporción sCD26/sCD25 no muestra diferencias significativas entre ambos grupos muestrales (Figura 7), lo que parece ser un indicativo de la inexistencia de diferencias significativas en la proporción de células Tef/Treg en los pacientes asmáticos. Este último dato ha sido confirmado midiendo directamente mediante citometría de flujo el cociente Tef/Treg en una nueva cohorte de pacientes (Figura 8).

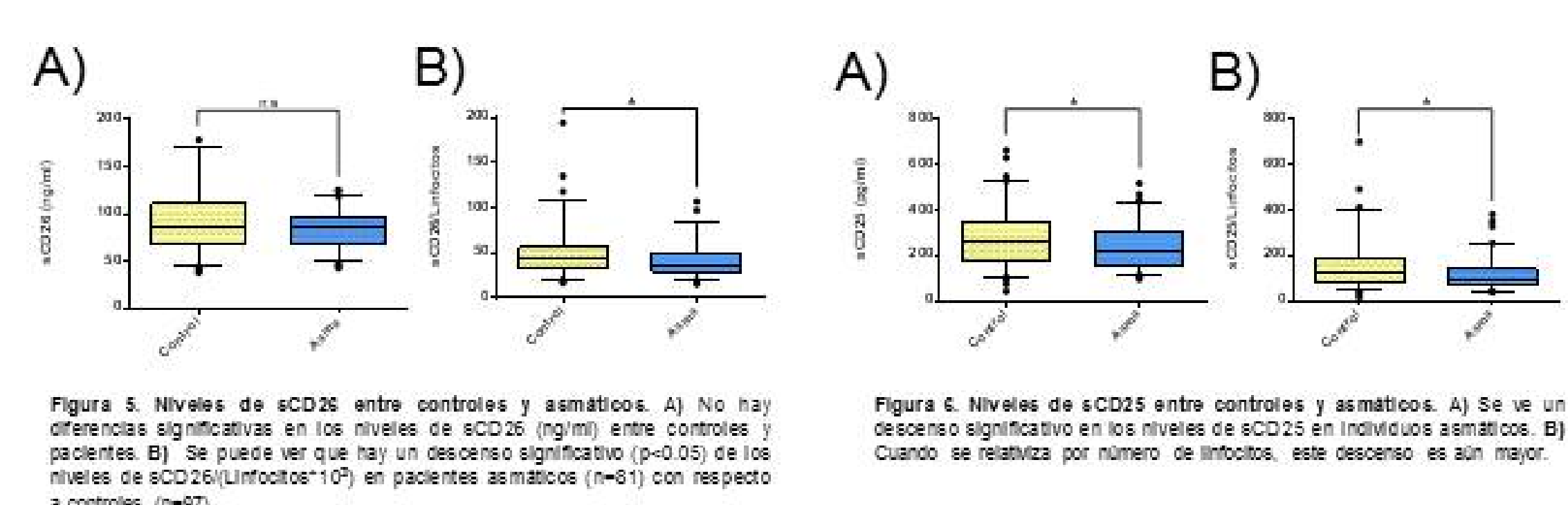


Figura 5. Niveles de sCD26 entre controles y asmáticos. A) No hay diferencias significativas en los niveles de sCD26 (ng/ml) entre controles y pacientes. B) Se puede ver que hay un descenso significativo (p < 0.05) de los niveles de sCD26 (Linfocitos*10⁹) en pacientes asmáticos (n=81) con respecto a controles (n=97).

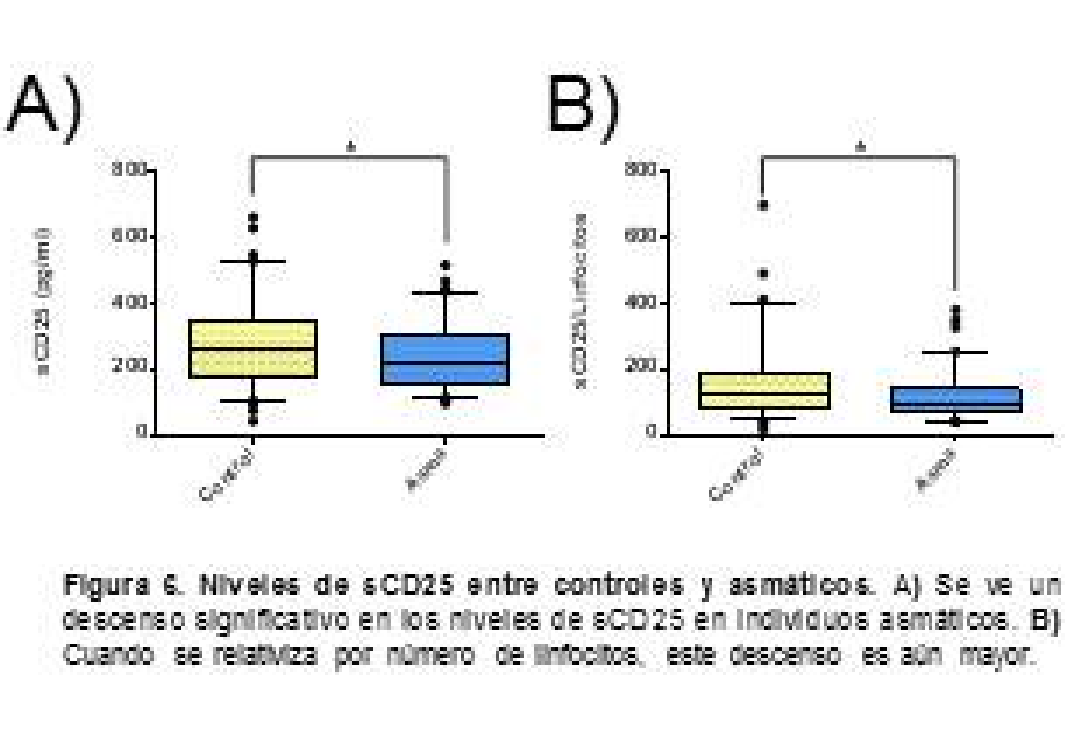


Figura 6. Niveles de sCD25 entre controles y asmáticos. A) Se ve un descenso significativo en los niveles de sCD25 en individuos asmáticos. B) Cuando se relativiza por número de linfocitos, este descenso es sin mayor.

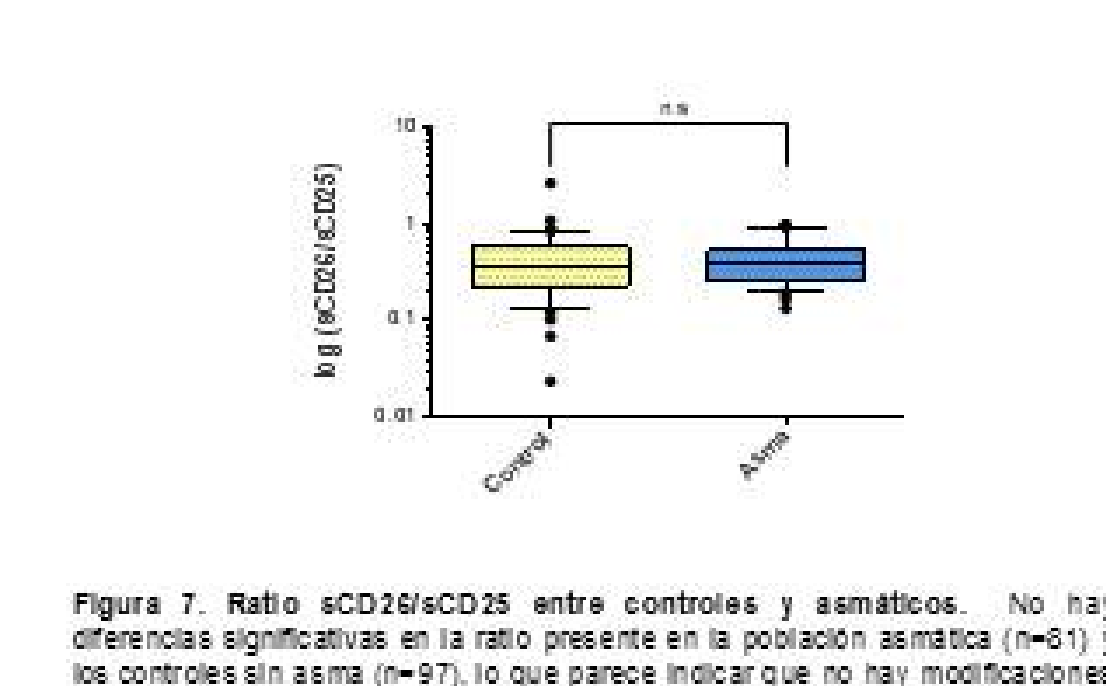


Figura 7. Cociente sCD26/sCD25 entre controles y asmáticos. No hay diferencias significativas en el cociente sCD26/sCD25 entre controles y asmáticos.

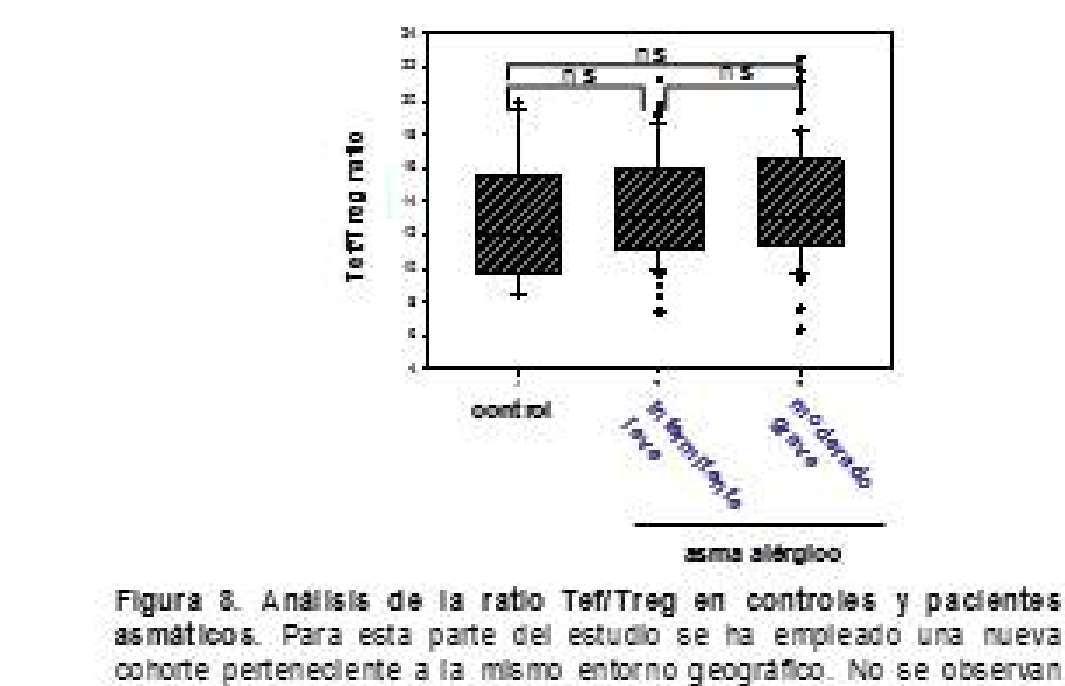


Figura 8. Análisis de la relación Tef/Treg en controles y pacientes asmáticos. Para esta parte del estudio se ha empleado una nueva cohorte perteneciente a la misma entorno geográfico. No se observan diferencias significativas en la proporción de células Tef/Treg (Teff/Treg ratio) entre la población con asma alérgica intermitente-leve (n=50) y moderado-grave (n=33) y la población control sin asma (n=11).

6) Conclusiones

La reducción de CD14 en monocitos de pacientes está posiblemente correlacionada con el perfil T_{H2}^{high} del asma alérgico. Los niveles de sCD26, mayores en hombres, son similares entre controles y pacientes; sólo al relativizar por el número de linfocitos estos se reducen en asmáticos. Los niveles de sCD25 también disminuyen en la población con asma alérgica. Los resultados de sCD26 y sCD25 contradicen así lo publicado por otros investigadores. Además, la ausencia de diferencias en el cociente sCD26/sCD25 entre controles y pacientes y los datos de medición directa mediante citometría de flujo en muestras de sangre periférica parecen indicar que al menos la proporción de células Tef/Treg no está alterada en asma alérgica, si bien podría estarlo su funcionalidad.