

APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DIAGNÓSTICO DEL ASMA OCUPACIONAL: EFECTO DE DIFERENTES VARIABLES DEL ENSAYO

M. GONZÁLEZ-MUÑOZ*, E. ALDAY**, M. GÓMEZ**, I. MONEO*

(*Servicio de Inmunología, Hospital Carlos III.

(**) Unidad Clínica de Patología Laboral.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

RESUMEN

La producción de IgE específica contra alérgenos ocupacionales conduce al desencadenamiento de síntomas tras su exposición y es una de las manifestaciones más conocidas es el asma ocupacional por hipersensibilidad. Un correcto diagnóstico, a poder ser precoz en el tiempo, evita la progresión de la enfermedad, por lo que es en la actualidad considerado como el mejor recurso terapéutico.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la activación de basófilos específica de alérgeno mediante citometría de flujo en el diagnóstico del asma ocupacional y determinar el efecto de diferentes variables del ensayo. El método se basa en la detección de un aumento en la expresión del antígeno CD63 en la membrana plasmática de los basófilos activados. En primer lugar se valoró el efecto de la interleucina-3 y del almacenamiento de la muestra en la activación de los basófilos por anti-IgE. Posteriormente se estudió la activación con alérgenos ocupacionales. Los resultados obtenidos muestran que la interleucina-3 potencia la activación de basófilos y que la activación específica alérgeno se mantiene al menos hasta 24 horas después de la extracción de la muestra. Por lo tanto se puede concluir que el estudio de la activación de basófilos es factible en presencia de interleucina-3 transcurridas 24 horas desde la extracción de la muestra, lo que hace posible el envío de muestras a centros de referencia y por lo tanto su aplicación en el medio laboral.

PALABRAS CLAVES

Activación de basófilos; CD63; alérgenos ocupacionales; asma ocupacional.

ABSTRACT

Specific IgE production against occupational allergens causes symptoms after allergen challenge and it is an outstanding manifestation in occupational asthma. Nowadays, an early and accurate diagnosis is considered the best therapeutic resource. The aim of this work was to study by flow cytometry the allergen specific basophil activation in occupational asthma and to determine the effect of several variables in the assay. The method is based on the detection of the up-regulation of CD63 in the plasmatic membrane of basophils. Effect of IL-3 and elapsed time before performing assay were evaluated. The results showed that IL-3 enhanced basophil activation and the specific activation was maintained for at least 24 hours. According to these results, the basophil activation test can be performed 24 hours after sample withdrawal in the presence of IL-3. This would allow the shipment of samples to a reference center to be analyzed and thereby this methodology could be useful in occupational medicine settings.

INTRODUCCIÓN

La exposición en el ámbito laboral a numerosos antígenos conduce con frecuencia a la puesta en marcha de una respuesta del sistema inmune contra estas moléculas. Dentro de las variadas respuestas inmunes que provocan los diferentes antígenos cabe destacar la mediada por IgE, conocida también como respuesta de hipersensibilidad inmediata o alérgica. La producción de IgE específica contra alérgenos a los cuales está expuesto el trabajador en su medio laboral conduce al desencadenamiento de síntomas tras su exposición y una de las manifestaciones más conocidas es el asma ocupacional por hipersensibilidad.

El número de alérgenos responsables de la producción de asma ocupacional es alto y constantemente se describen nuevos productos sensibilizantes (1-4), lo que hace sospechar que este listado se ampliará enormemente en un futuro por lo que el diagnóstico se complica a medida que los posibles agentes inductores aumentan. Sin embargo un correcto diagnóstico, a poder ser precoz en el tiempo, evita la progresión de la enfermedad (5), por lo que es en la actualidad considerado como el mejor recurso terapéutico.

La existencia de una sensibilización a un alérgeno se explora en la práctica habitual mediante el método de puntura (*prick test*) que mide la respuesta cutánea en los primeros 20 minutos tras la microinyección de un alérgeno y la liberación de mediadores inflamatorios que se produce por desgranulación de mastocitos. Aunque la demostración de la existencia de IgE específica unida a la membrana de mastocitos cutáneos mediante la realización de *prick tests* es un método rápido de diagnóstico *in vivo* requiere por su inespecificidad a menudo de métodos complementarios como la determinación de IgE específica en el suero de los pacientes. Sin embargo, con mucha frecuencia los alérgenos laborales carecen de alternativas comerciales para su diagnóstico, lo que imposibilita la medición de anticuerpos específicos en estos casos.

La citometría de flujo es una potente herramienta en el análisis de poblaciones celulares para analizar parámetros fenotípicos y funcionales a escala unicelular y, ya que permite procesar un gran número de células de forma fácil y rápida, es la técnica ideal en el estudio de poblaciones celulares de baja frecuencia, como es el caso de los basófilos de sangre periférica. Recientemente ha sido descrita la aplicación de la activación de basófilos mediante citometría de flujo para el estudio de numerosos

alérgenos (6-16), por lo que podría resultar una alternativa válida para el diagnóstico de asma ocupacional, pero siempre se ha realizado usando muestras de sangre periférica recién extraídas. El empleo de muestras mantenidas hasta 24 horas posibilitaría el envío de muestras hasta un laboratorio de referencia mediante su envío por correo urgente. El presente trabajo estudia la posibilidad de esta alternativa así como el empleo de IL-3 como agente potenciador de la respuesta de los basófilos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Test de activación de basófilos

Se realizó el test de activación de basófilos con muestras de sangre heparinizada en las tres horas siguientes a la extracción. Se incubaron 100 μ l de las muestras durante 15 minutos a 37 °C con 20 μ l de un tampón de estimulación con/sin IL-3 (60 ng/ml, Pharmingen, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), y se realizó una curva de concentración de anti-IgE (1, 0,1 y 0,01 μ g/ml; Pharmingen). Como control negativo del ensayo, se incubó la muestra de sangre sin anti-IgE. Tras la incubación, la activación de los basófilos se detuvo añadiendo 10 μ l de EDTA 20 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para analizar la activación de los basófilos, las células se tiñeron con 20 μ l de la mezcla de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos CD63-FITC/CD123-PE/HLA-DR-PerCP (BD Biosciences) durante 20 minutos en oscuridad. Después las muestras se incubaron con 2 ml de una solución lisante (FACS Lysing solution, BD) durante 15 minutos en oscuridad. Tras una centrifugación a 300 g durante 5 minutos y lavado de las células con PBS, éstas se resuspendieron con 300 μ l de paraformaldehído 1% y las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences).

Para analizar el porcentaje de las células activadas, la población de los basófilos se seleccionó usando la dispersión lateral (SSC) y el CD123 para eliminar la mayor parte de los restos celulares y seleccionar las células CD123+. Se analizaron al menos 500 células CD123+. Luego, las células seleccionadas de este modo se representaron en un gráfico de puntos de CD123/HLA-DR para eliminar las células HLA-DR+. Posteriormente, se detectó la expresión de CD63 en los basófilos CD123+ HLA-DR. El porcentaje de basófilos activados se calculó restando la expresión espontánea de CD63 (control negativo) de la obtenida con la estimulación con anti-IgE.

Para el estudio de la activación de basófilos al día siguiente (día 1) de la extracción de la muestra, se mantuvo la sangre a 4°C y se siguió el protocolo anteriormente descrito.

Alternativamente, en algunas muestras se estudió la activación de los basófilos utilizando como marcador el CD203c como se ha descrito anteriormente (17).

Estadística

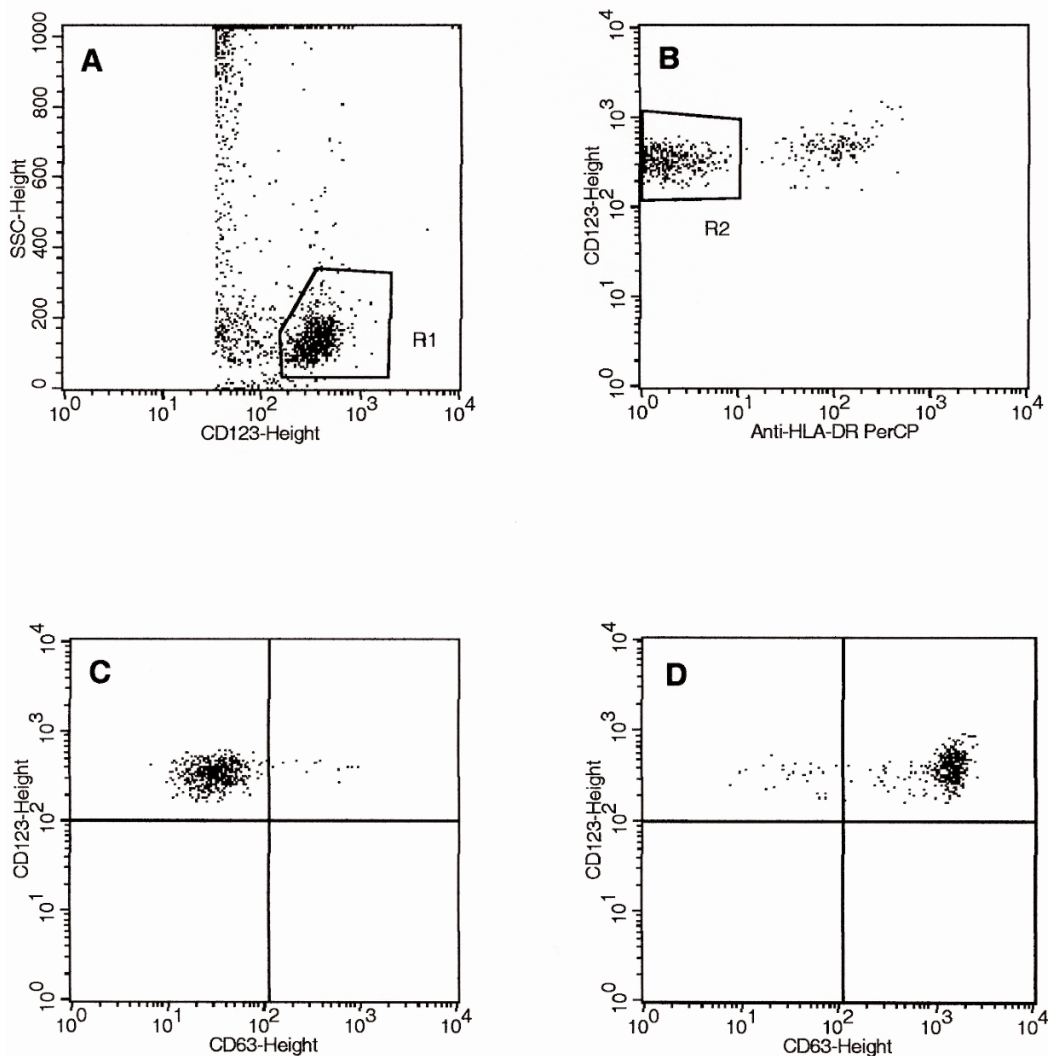
El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 10.0 (Chicago, IL). El tipo de distribución de

la variable porcentaje de basófilos activados se evaluó con el test Shapiro-Wilk y se describe por su mediana y rango intercuartil. Las comparaciones se realizaron con el test U Mann-Whitney y la correlación bivariable con el test de rangos de Spearman.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la estrategia de selección y análisis de los basófilos en sangre periférica total. La población de basófilos se selecciona de acuerdo a su fenotipo CD123+HLA-DR y los basófilos activados se identifican por el incremento en la expresión de CD63.

Figura 1. Análisis de la activación de basófilos por citometría de flujo. A,B muestra la estrategia de selección de la población de basófilos. En primer lugar, los basófilos se seleccionan como una población celular con baja dispersión lateral (SSC) y alta expresión de CD123 (A, R1). Después, los basófilos se seleccionan como células HLA-DR (B, R2). C: caso representativo de un control negativo. D: caso representativo de activación de basófilos con 1 µg/ml de anti-IgE.



El estímulo utilizado en el ensayo es un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana que mimetizaría la activación in vivo del basófilo por un alérgeno, ya que en ambos casos los basófilos se activan por la IgE unida a su receptor de membrana. Se observó una respuesta de activación de los basófilos que es dependiente de la curva de concentración del anticuerpo monoclonal anti-IgE, tanto si se realizaba el ensayo con la sangre procesada en el mismo día de la extracción (día 0) como tras ser almacenada 18 horas a 4°C (día 1; fig. 2). Así mismo, el mismo tipo de curva dosis-respuesta se observó cuando el ensayo se realizó con IL-3 (fig.2 A) o en ausencia de IL-3 (fig. 2 B).

Se observó una excelente correlación al comparar el porcentaje de basófilos activados en presencia de IL-3 y realizado el ensayo el día 0, con el porcentaje obtenido en presencia también de IL-3 pero realizando el test el día 1. Los coeficientes de correlación fueron $r = 0,87$ ($p < 0,001$), $r = 0,89$ ($p < 0,001$) y $r = 0,90$ ($p < 0,001$) utilizando 1, 0,1 y 0,001 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal anti-IgE respectivamente, lo que indica que almacenar las muestras a 4°C no afecta la proporcionalidad de la respuesta ante un estímulo específico. Sin embargo, los porcentajes obtenidos cuando se realizó la prueba el día 0 eran

superiores a los registrados el día 1 en presencia de IL-3 y cuando se activó con 1 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-IgE (fig. 2 A; $p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas al comparar los porcentajes de basófilos activados en ausencia de IL-3 (fig. 2 B).

Se observó un mayor porcentaje de basófilos activados en presencia de IL-3 realizando el ensayo el día 1 al compararlo con el obtenido en ausencia de IL-3 el día 0, utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-IgE (fig. 3; $p < 0,05$).

Para estudiar el efecto de la conservación de las muestras a 4°C durante 18h sobre la activación de los basófilos específica de alérgenos, se incubó una muestra de un individuo sensibilizado a dos enzimas de uso industrial, xilanas y glucanas. La incubación se realizó en presencia de IL-3 con tres diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) de los alérgenos. Los basófilos se activaron con las tres diluciones de los dos alérgenos y la activación no era afectada por la conservación de la muestra a 4°C (fig.4).

El ensayo de activación de basófilos utilizando como marcador el CD203c no aportó ventajas en el análisis (resultados no mostrados).

Figura 2. Comparación de los resultados obtenidos de la activación de basófilos en el día 0 y el día 1. Se muestra el efecto dosis-respuesta de anti-IgE en la activación de basófilos el día 0 (caja blanca) y el día 1 (caja gris) en presencia (panel A) y ausencia de IL-3 (panel B). Los gráficos de caja muestran la mediana (línea horizontal) y rango intercuartil. * $p < 0,05$ día 0 versus día 1.

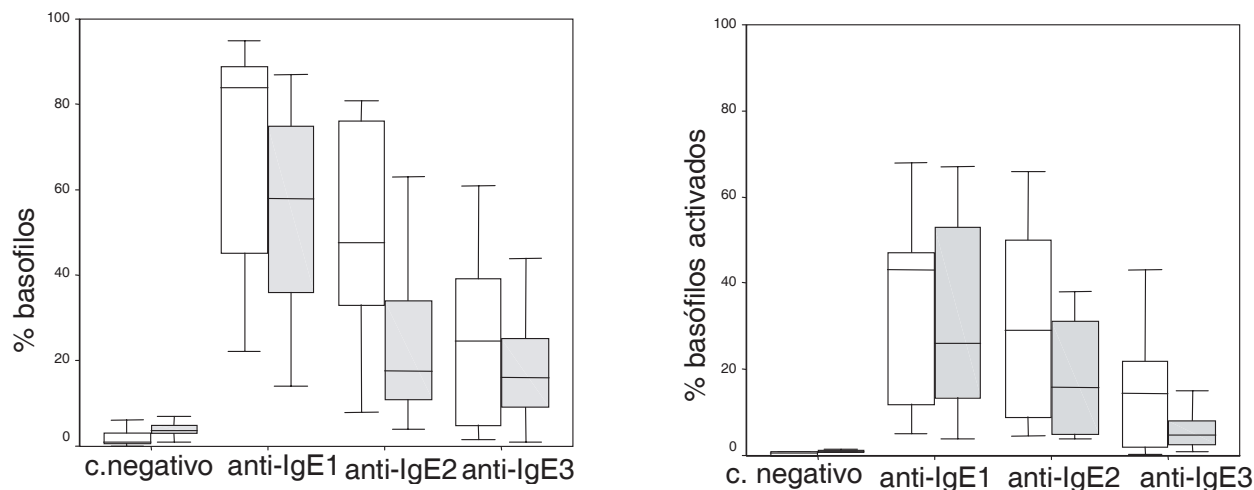
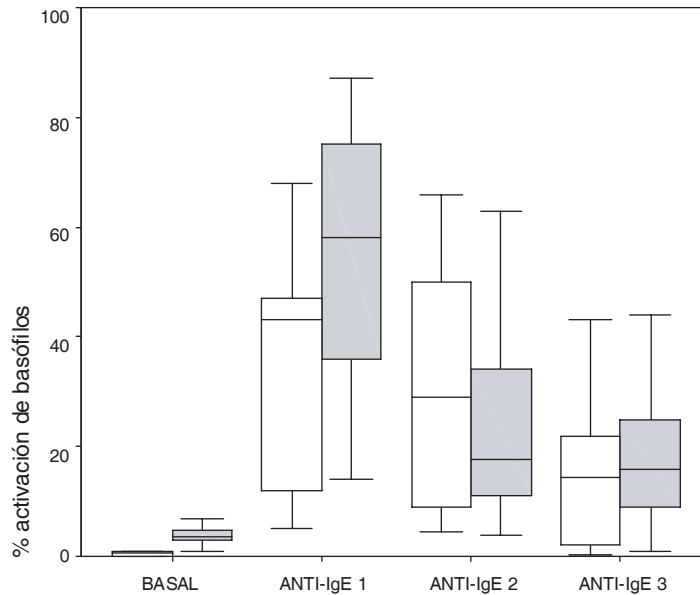


Figura 3. Comparación de los resultados obtenidos de la activación de basófilos el día 0 sin IL-3 (caja blanca) y el día 1 con IL-3 (caja gris). Los gráficos de caja muestran la mediana (línea horizontal) y rango intercuartil. * $p < 0,05$ día 0 versus día 1.



DISCUSION

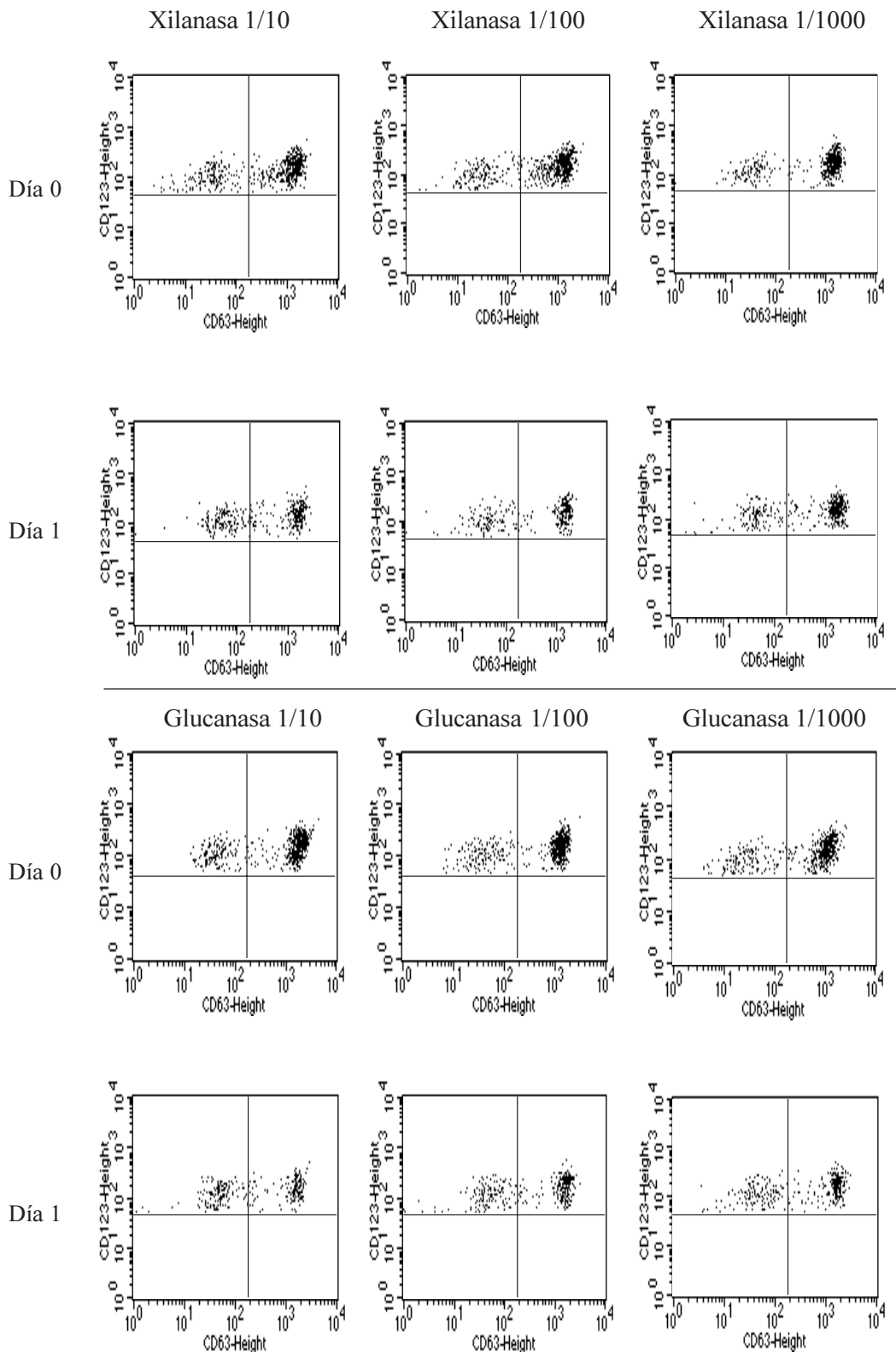
El presente trabajo pretendía comprobar la aplicabilidad del método de la activación de basófilos en el estudio de la patología ocupacional por hipersensibilidad. Una de las primeras interrogantes era el porcentaje de sujetos en los que la técnica puede ser aplicada. En efecto, al tratarse de un test que utiliza células vivas, su uso puede quedar restringido por diferentes medicaciones, muchas de ellas como antihistamínicos o sedantes tomadas inadvertidamente por los pacientes. Resultados previos de nuestro laboratorio, muestran que, en población de pacientes no seleccionados, el método es aplicable en el 91% de los individuos estudiados ($n = 113$).

Otro aspecto de gran importancia era el estudio del tiempo máximo en el que las muestras de sangre son analizables tras la extracción. Dado que la citometría de flujo es una técnica que requiere aparataje sofisticado, es obligado que las muestras sean enviadas a un laboratorio de referencia. Hasta el momento los estudios de activación de basófilos se han realizado en las primeras cuatro horas tras la extrac-

ción con el fin de analizar la respuesta de las células recién extraídas. En patología laboral, por el contrario, sería muy útil que el estudio de estas muestras fuera posible realizarlo por lo menos en las primeras 24 horas, lo que permitiría enviar las muestras por mensajería y haría posible el estudio de colectivos situados a distancia del centro receptor. El presente estudio ha demostrado que el uso de IL-3 como agente estimulador permite el empleo de sangre conservada por lo menos 24 horas. Otro aspecto a tener en cuenta es que, al ser una técnica cuya duración es menor a 2h 30 minutos, los resultados pueden estar disponibles en el centro remitente el mismo día de la realización de la técnica.

Estos dos aspectos permiten concluir que la medida de la activación de basófilos mediante citometría de flujo es utilizable como medio diagnóstico de aplicación real en el ambiente laboral, por lo que los estudios actuales de nuestro grupo se dirigen a analizar las prestaciones de este método en el diagnóstico de la patología ocupacional frente a diversos alérgenos laborales.

Figura 4. Efecto de la conservación a 4°C en la activación de basófilos específica de alérgenos. Se muestran los resultados de la activación de basófilos con tres diluciones de xilanasa y glucanasa obtenidos el día 0 y día 1. El número del interior del gráfico representa el porcentaje de basófilos activados con cada dilución.



BIBLIOGRAFÍA

1. Park HK, Jeon SG, Kim TB, Kang HR, Chang YS, Kim YK, Cho SH, Min KU, Kim YY. Occupational Asthma and Rhinitis Induced by a Herbal Medicine, Wonji (*Polygala tenuifolia*). *J Korean Med Sci*. 2005; 20:46-49
2. Merget R, Korn M. Metabisulphite-induced occupational asthma in a radiographer. *Eur Respir J*. 2005; 25:386-388
3. Schuller A, Morisset M, Maadi F, Kolopp Sarda MN, Fremont S, Parisot L, Kanny G, Moneret-Vautrin DA. Occupational asthma due to allergy to spinach powder in a pasta factory. *Allergy*. 2005;60:408-409
4. Malo JL. Occupational rhinitis and asthma due to metal salts. *Allergy*. 2005;60:138-139
5. Campo P, Lummus ZL, Bernstein DI. Advances in methods used in evaluation of occupational asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2004;10:142-146.
6. Torres MJ, Padial A, Mayorga C, Fernandez T, Sanchez-Sabate E, Cornejo-Garcia JA, Antunez C, Blanca M. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34:1768-1775.
7. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy*. 2004; 59:1102-1109.
8. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy*. 2004; 34:332-339
9. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Slodowy S, Merk HF, Sachs B. CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33:607-614.
10. Lambert C, Guilloux L, Dzvinga C, Gourgaud-Massias C, Genin C. Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to Hymenoptera venom. *Cytometry*. 2003; 52B:13-19.
11. Sanz ML, Gamboa PM, Garcia-Aviles C, Vila L, Dieguez I, Antepara I, de Weck AL. Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003; 130:33-39.
12. Sanz ML, Maselli JP, Gamboa PM, Oehling A, Dieguez I, de Weck AL. Flow cytometric basophil activation test: a review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2002; 12:143-154.
13. Ebo DG, Lechkar B, Schuerwegh AJ, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. *Allergy*. 2002; 57:706-712.
14. Aly Hassan IM, Crockard AD, Asghar MS, Edgar JD, Atkinson S. Basotest and suxamethonium allergy. *Allergy*. 2001; 56:1016-1017.
15. Sanz ML, Sanchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, Dieguez I, De Weck AL. Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31:1007-1013.
16. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30:1166-1171.
17. Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, Bienvenu J. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33:259-265.