

NIVEL SÉRICO DE CITOQUINAS EN PACIENTES ASMÁTICOS CRÓNICOS ESTABLES

Autor Principal : Gayoso Cervantes, Oscar Danilo, Médico Asistente del Servicio de Neumología

Coautores : Dra. Patricia Paola, Jumbo Lucioni, Investigador principal - HNCH.

Dr. José Luis, Aguilar Olano, Jefe de Sección Inmunología. Fac. Ciencias y Filosofía UPCH.

Dr. César, Loza Munárriz, Médico Asistente del Servicio de Nefrología-HNCH

Dr. Eduardo, Gotuzzo Herencia, Director del Instituto de Medicina Tropical «AvH»-UPCH

Dr. Jorge Enrique, Celedonio Colquicocha, Sub-investigador clínico - HNCH

Blgo. Iván Arcadio, Lozada Requena, Investigador asociado-Sección Inmunología. Fac. Ciencias y Filosofía-UPCH.

MSc. Iván, Best Cuba Laboratorio de Inmunología Instituto de Medicina Tropical «AvH»-UPCH

RESUMEN:

Objetivo: Evaluar el perfil inmunológico de pacientes asmáticos crónicos estables mediante el nivel sérico de citoquinas Th1 y Th2

Materiales y métodos: Se midieron los niveles séricos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ por la técnica Cytometric Bead Array (CBA), en 40 asmáticos crónicos estables del «Hospital Nacional Cayetano Heredia» durante Febrero del 2004. Se indagó por factores demográficos, clínicos y funcionales. Se asignó la severidad de acuerdo al GINA del año 2002, incluyendo el régimen terapéutico. La atopía se evaluó en función a la coexistencia o antecedente de cuadros clínicos alérgicos.

Resultados: Encontramos una diferencia significativa entre los asmáticos leves y severos para IL-2 ($r=-6.5$), IL-4 ($r=-5.04$) e IL-10 ($r=1.21$). El uso de corticoides inhalados fue significativamente mayor en los asmáticos severos que en los leves ($P=0.005$). Asimismo, se encontró una relación significativa entre IL-2 ($r=0.36$), IL-4 ($r=0.31$), IL-10 ($r=-0.35$) y el %VEF1 pre-broncodilatador; y una relación positiva significativa entre IL-5 ($r=0.4$) e IL-10 ($r=0.45$) y el porcentaje de variación del VEF1. En cuanto a atopía, IL-4/IFN- γ fue significativamente mayor en los atópicos.

Conclusiones: Nuestros hallazgos sugieren que IL-2 (pese a ser una citoquina Th1), IL-4 e IL-5 son citoquinas importantes en la patogénesis del asma, asociándose IL-4 a atopía más que al asma per se. La expresión de las dos primeras citoquinas está modulada por el uso de esteroides inhalados. Por el contrario, IL-10 denota un rol anti-inflamatorio, aunque los hallazgos respecto al %variación del VEF1 refleja una función aún no bien definida.

INTRODUCCION

Se conocen por lo menos 2 sub-poblaciones de linfocitos T-helper (Th) según el perfil de citoquinas que producen: Th1 y Th2. Linfocitos Th1 secretan interleuquina (IL)-2, IL-12, interferon (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- β ; y los Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13. Ambos subtipos, Th1 y Th2,

secretan factor de necrosis tumoral (TNF)- α (1, 2). Hay un balance por inhibición mutua entre ambos: IFN- γ inhibe la actividad celular Th2, mientras que la IL-4 inhibe la actividad Th1 (3). La población de células Th0 es un tercer grupo de células T CD4+ capaces de producir citoquinas Th1 y Th2, diferenciándose finalmente hacia una de ellas (4); y las células T reguladoras (Tr), como IL-10 y el factor de transformación de crecimiento (TGF)- β , tienen un rol importante en la inmunoregulación con supresión de la respuesta Th1.

El asma constituye un desorden atópico visto como una enfermedad del sistema inmune. No todo caso de asma es «alérgico»; sin embargo, la atopía es el mayor factor de riesgo identificable para el desarrollo de asma. Se caracteriza por una respuesta celular de tipo Th2 frente a la inhalación de alérgenos, que comanda la secreción de citoquinas. Las citoquinas juegan un rol integral en la coordinación y persistencia de este proceso inflamatorio crónico en las vías aéreas que caracteriza al asma bronquial (5). No habiendo sido llevados a cabo estudios similares en nuestro medio, el objetivo principal de nuestro estudio es evaluar el perfil inmunológico de pacientes asmáticos crónicos estables mediante el nivel sérico de interleuquinas Th1: IL-2 e IFN- γ ; Th2: IL-4 y 5, citoquinas Tr como la IL-10 y proinflamatorias como TNF- α , en función a la severidad del asma mediante una técnica nueva usada por primera vez en nuestro medio.

MÉTODOS

Pacientes

Se reclutaron 40 pacientes asmáticos crónicos estables (32 mujeres y 8 varones) de acuerdo a los estándares de diagnóstico del American Thoracic Society (ATS) (6), mayores de 14 años, registrados y controlados periódicamente en el Hospital Nacional Cayetano Heredia durante Febrero del 2004. Los criterios de selección fueron: 1) no haber presentado algún episodio de obstrucción bronquial en las

Últimas 4 semanas que haya motivado consulta a algún personal de salud; 2) no tener otra enfermedad respiratoria crónica; 3) no ser fumador; 4) no presentar ninguna condición de inmunodeficiencia primaria o adquirida; 5) no haber presentado alguna infección respiratoria en las últimas 4 semanas; 6) no ser gestantes; 7) sin antecedente de cirugía mayor en los últimos 6 meses; 8) sin antecedente de parasitosis intestinal en los últimos 6 meses; 9) sin corticoterapia sistémica en últimos 2 meses y si son cursos cortos, haber pasado por lo menos 2 semanas de última dosis (7). Se consultó respecto a su historia de asma, medicamentos, comorbilidades, síntomas en las últimas 2 semanas: tos, sibilantes, falta de aire u opresión de pecho y su frecuencia durante el día, noche o con alguna actividad.

Función pulmonar: Se utilizó el espirómetro modelo Vitalograph-ALPHA manufacturado en Inglaterra, según las guías estandarizadas publicadas por la ATS (8). Se consideró el porcentaje de volumen espiratorio forzado al primer segundo respecto al predicho o %VEF1 para fines de clasificación de severidad. En el caso de que los pacientes estuvieran recibiendo o hubieran recibido recientemente un curso corto de corticoides sistémicos, o que hubiesen presentado algún episodio de obstrucción bronquial en las últimas 4 semanas que haya motivado consulta u hospitalización, se tomaban sus datos y eran citados nuevamente transcurrido el tiempo requerido de acuerdo a los criterios de exclusión. En la nueva cita se realizaba una nueva espirometría, previo a la toma de la muestra de sangre.

Clasificación de severidad del asma

Se asignó el grado de severidad de acuerdo a las guías del GINA (9). Dado que los pacientes eran pacientes continuadores, la clasificación de severidad utilizada fue la que incluye el régimen de medicación diaria.

Atopia: Se evaluó en función a la coexistencia o antecedente de cuadros clínicos alérgicos incluyendo: rinitis alérgica, dermatitis atópica, etc.

Medición de los niveles séricos de las citoquinas:

por la técnica de citometría de flujo Cytometric Bead Array (CBA) usando un kit comercial (BD® CBA Th1, Th2), catálogo N°550749. Para calibrar el citómetro y cuantificar los valores de las muestras, se ensayaron nueve muestras estándar y el control negativo del kit. La técnica se fundamenta en el uso de seis poblaciones de perlas con distintas intensidades de fluorescencia, las cuales han sido revestidas con anticuerpos de captura específicos para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Las 6 poblaciones son mezcladas tomando 50ul para cada uno de los tubos de ensayo (10). Luego se agrega a cada uno de los tubos, 50ul de un anticuerpo monoclonal específico para las citoquinas en estudio, unido a una sustancia fluorocroma: ficoeritrina (PE); y se añade 50ul de las diluciones estándar y del control negativo a los tubos control; y 50ul de las muestras a los tubos de prueba. Se incubó por 3 horas a temperatura ambiente

protegidos de la luz; se agregó 1ml de buffer de lavado y se centrifugó por 5 minutos. Se aspiró y descartó el sobrenadante; y se añadió nuevamente 300ul del mismo buffer a cada tubo para resuspender las partículas. Mediante un citómetro de flujo se completó el dosaje de las citoquinas tanto en las muestras estándar como en las muestras problema (10).

Aspectos Éticos

Se cumplieron los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

Análisis Estadístico: ESTUDIO DE SERIE DE CASOS DE TIPO ANALÍTICO. Las características de variables independientes y dependientes se muestran en tablas. La relación entre las variables categóricas fue analizada con la prueba de Chi2 y el test exacto de Fischer; y las continuas con el T-test para datos no apareados y la suma de rangos de Wilcoxon. Se correlacionó las variables continuas independientes y dependientes mediante el test de Spearman. La relación fue estadísticamente significativa si $P \leq 0.05$. Se usó el software estadístico STATA versión 8.

RESULTADOS

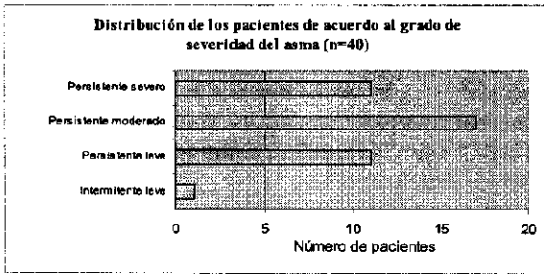
Características demográficas y clínicas de la población:

Las características demográficas se presentan en la Tabla 1. Las características clínicas se muestran en la tabla 1. Once pacientes (28.21%) controlaban su asma con un fármaco; 21 pacientes (53.85%) con dos; y 7 (17.95%) con tres o más fármacos. Un paciente era intermitente leve; 11 eran persistentes leves; 17, persistente moderados; y 11, persistentes severos (Gráfico 1). El único paciente con asma intermitente leve fue reagrupado con los pacientes persistentes leves, siendo calificados como «leves».

Tabla 1.- Características demográficas y clínicas de los pacientes asmáticos

CARACTERÍSTICA	Media	D.S.	n
Edad	35.25	17.52	40
Peso (kg)	64.11	11.07	40
Talla (cm)	158.95	9.61	40
Tiempo de enfermedad (años)	14.55	12	40
%VEF1	97.01	24.44	40
% variación del VEF1	17.57	16.34	30

Gráfico 1. Grado de severidad del asma en la población total de pacientes



Atopia: Once eran atópicos, de los cuales 10 no tenían antecedente de tuberculosis.

Nivel sérico de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ
Los valores séricos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Nivel sérico de interleuquinas en los pacientes asmáticos

Citoquina	Nivel sérico promedio (pg/ml)	D.S.	n
IL-2	6.06	5.56	40
IL-4	6.81	5.08	40
IL-5	2.63	3.53	40
IL-10	2.77	1.23	40
TNF- α	1.78	0.67	40
IFN- γ	150.95	315.82	40

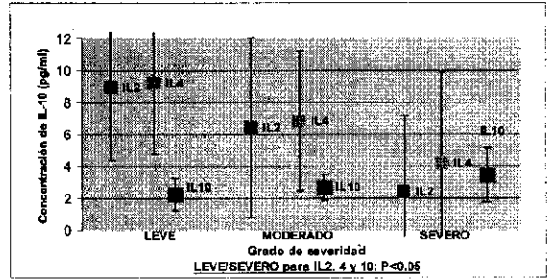
Relación entre el nivel sérico de las citoquinas y el grado de severidad del asma bronquial:

La IL-2 e IL-4 estaban inversamente asociadas con el grado de severidad; la IL-10 aumenta con la severidad. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes leves y severos para estas tres interleuquinas. IL-5 e IFN- γ aumentan con el grado de severidad del asma ($P > 0.05$). No hay resultados contributorios para TNF- α . Ver tabla 3 y Gráfico 2.

Tabla 3.- Nivel sérico de interleuquinas de acuerdo a las características clínicas.

INTERLEUQUINA (pg/ml*)	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS			P
	Grado de severidad			
	Leve (n=13)	Persistente moderado (n=17)	Persistente severo (n=11)	
IL ^M -2 (media \pm D.S.)	8.91 \pm 4.56	6.42 \pm 5.64	2.41 \pm 4.73	0.012 (r=-4.50)
IL ^M -4 (media \pm D.S.)	9.21 \pm 4.49	6.82 \pm 4.37	4.16 \pm 5.78	0.05 (r=-5.04)
IL ^M -5 (media \pm D.S.)	1.78 \pm 0.50	2.56 \pm 1.46	3.66 \pm 6.55	N.S.
IL ^M -10 (media \pm D.S.)	2.24 \pm 1.03	2.7 \pm 0.81	3.45 \pm 1.67	0.05 (r=1.21)
IFN- γ (media \pm D.S.)	67.01 \pm 72.96	122.52 \pm 251.28	286.47 \pm 502.09	N.S.
TNF- α (media \pm D.S.)	1.73 \pm 0.91	1.96 \pm 0.49	1.54 \pm 0.57	N.S.
Uso de corticoides inhalados	SI			Leve/moderado: P=0.014
	NO			Leve/severo: P=0.005

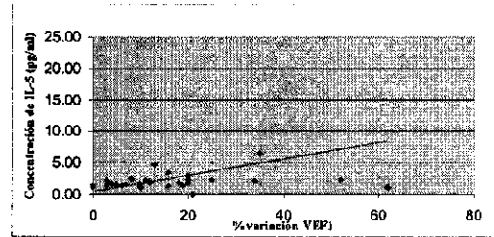
Gráfico 2. Nivel sérico de IL-10 de acuerdo a la severidad del asma



Relación entre el nivel sérico de las citoquinas y la función pulmonar:

Hubo una relación significativa entre el nivel sérico de IL-2 y 4 ($r=0.36$ y 0.31 respectivamente) y el %VEF1 pre-broncodilatador; y se encontró una relación significativa con IL-10 ($r=-0.35$). En los 30 pacientes con espirometría pre- y post-broncodilatador, hubo una relación significativa entre IL-5 y 10 ($r=0.40$ y 0.45 respectivamente) y el porcentaje de variación del VEF1 (Gráfico 3).

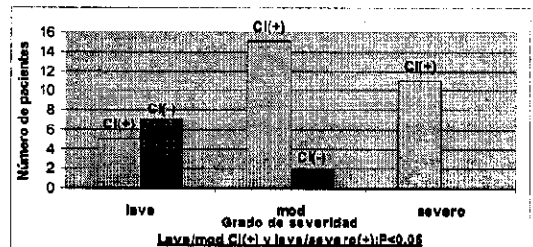
Gráfico 3. Nivel sérico de IL-5 de acuerdo al % de variación del VEF1 post-broncodilatador



Relación entre el uso de corticoides inhalados y el grado de severidad del asma bronquial:

Trenta y uno pacientes usan corticoides inhalados y 9 pacientes no usan. Al comparar el uso del esteroide inhalado, la diferencia es significativa entre asmáticos leves y moderados, como entre el grupo de leves y severos. Ver tabla 3 y Gráfico 4.

Gráfico 4.- Uso de corticoides inhalados (CI) de acuerdo a la severidad del asma

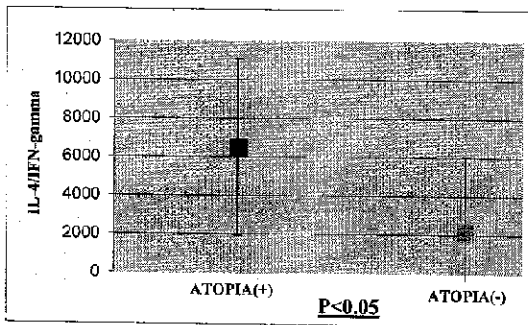


Relación entre el nivel sérico de las citoquinas y atopía: La relación IL-4/IFN- γ fue significativamente mayor en los atópicos ($P= 0.0059$). IL-10 es menor en los atópicos con un P cercano a 0.05. Ver tabla 4 y Gráfico 5.

Tabla 4.- Nivel sérico de citoquinas y atopía

CARACTERÍSTICA CLÍNICA	INTERLEUQUINAS (pg/ml*)								
	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IFN- γ	TNP- α	IL4/IFN- γ		
	media \pm D.S.	media \pm D.S.	media \pm D.S.	media \pm D.S.	P	media \pm D.S.	media \pm D.S.	P	
Atópicos (n=11)	7.18 \pm 4.89	7.29 \pm 3.59	1.85 \pm 1.03	2.17 \pm 0.47	0.057	47.05 \pm 113.36	1.45 \pm 0.81	6481.91 \pm 4596.22	
No atópicos (n=29)	5.64 \pm 5.82	6.62 \pm 5.59	2.92 \pm 4.08	3 \pm 1.32		199.36 \pm 358.45	1.90 \pm 0.57	2227.75 \pm 3931.79	0.0059

Gráfico 5.- Relación IL-4/IFN-gamma según atopía



DISCUSIÓN:

La base fisiopatológica de la obstrucción reversible de las vías aéreas característica del asma bronquial es la inflamación caracterizándose por un reclutamiento selectivo de células T de tipo Th2. Muchos estudios han sugerido que la severidad del asma está relacionada con el grado de inflamación (11, 12). Nuestro estudio sugiere resultados similares. IL-2 e IL-4 fueron significativamente mayores en los asmáticos leves que en los severos; y esto asimismo va acorde con la relación positiva significativa encontrada entre el nivel sérico de estas dos citoquinas y el %VEF1 en el grupo de pacientes reclutados.

Pese a ser reconocida como citoquina Th1, se ha visto que la administración de IL-2 en modelos animales produce un incremento en el número de células inflamatorias presentes en fluido proveniente de lavado broncoalveolar, asociándose a hipersensibilidad de las vías aéreas (13); y estos hallazgos se han repetido en el lavado broncoalveolar de pacientes con asma sintomático (14). La

importancia de la IL-4 es aún mayor al controlar los principales eventos celulares que se presentan en el asma, registrándose niveles elevados en sangre periférica y lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos (15). Su expresión puede ser considerada como el mecanismo subyacente en los diferentes procesos alérgicos y no exclusivo del estado asmático per se (16).

Aunque sería más lógico pensar que a mayor severidad de asma o a menor %VEF1, los niveles séricos de IL-2 y/o IL-4 deberían ser mayores, hay un aspecto que tenemos que tomar en cuenta en nuestros pacientes: el uso de corticoides inhalados. Este es significativamente mayor en el grupo de pacientes asmáticos severos comparados con los pacientes asmáticos leves, estableciéndose entre ambos una diferencia estadísticamente significativa para esta variable ($P=0.005$), lo cual explicaría la relación hallada entre los niveles séricos de IL2 y/o IL-4 y la severidad del asma y/o %VEF1.

La evidencia muestra que los corticoides inhalados mediante su acción anti-inflamatoria, inhiben la transcripción de varias interleuquinas entre ellas, IL-2 e IL-4; en especial, son inhibidores potentes de la transcripción del gen de la IL-2 (17). Ello podría explicar los menores niveles séricos registrados para IL-2 e IL-4 en los pacientes asmáticos severos. Se ha reportado que los corticoides inhalados incrementan los niveles de IL-12 en las vías aéreas, la cual incrementa la proliferación de células Th1 y la secreción de IFN- α (18). Asimismo, Shahid y colaboradores mostraron que el nivel de IL-4 exhalado fue significativamente menor en niños con asma que recibían más de 600ug de esteroide inhalado por día (19). De la misma manera, este efecto anti-inflamatorio parece extenderse al uso de beta-agonistas de acción prolongada al asociarse con un descenso en los marcadores inflamatorios séricos, entre ellos IL-4 (20).

Sin embargo, los corticoides afectan sólo algunos de los mediadores inflamatorios involucrados en el asma bronquial. Pizzichini y colaboradores demostraron que aunque disminuían el número de eosinófilos y los niveles de la proteína catiónica eosinofílica en las vías aéreas de pacientes asmáticos severos, no tenían efecto sobre los niveles de IL-5 (21). De allí que en nuestro estudio, la IL-5 muestra una tendencia a incrementar con la severidad del asma independiente del uso de corticoides inhalados. Asimismo, algunas citoquinas tienen efecto anti-inflamatorio en el asma como sucede con la IL-10. La evidencia muestra que el uso de corticoides incrementa su expresión en su afán de controlar la inflamación de las vías aéreas (22); lo cual explica nuestros resultados: niveles significativamente mayores de IL-10 en los asmáticos severos y una relación inversa significativa entre el nivel sérico de IL-10 y el %VEF1.

El IFN- α asimismo, muestra una tendencia a incrementar a medida que aumenta la severidad del asma. Llama la atención estos resultados con respecto al IFN- α pues parece contradecir la hipótesis que hemos planteado, al ser ésta una citoquina de tipo Th1. Sin embargo, el Normative Aging Study demuestra que los niveles séricos de IFN- α se asocian a una declinación de la función pulmonar en pacientes asmáticos; pues habría que considerar la identidad de las células que producen IFN- α en los pacientes asmáticos (23). Magan y colaboradores sugirieron la existencia de una proporción incrementada de células T CD8+ productoras de IFN- α en la sangre de pacientes asmáticos. Esta capacidad productora de esta citoquina estaría asociada con el grado de severidad del asma, la hiperreactividad bronquial y eosinofilia. Esta es la tendencia que se observa en nuestro estudio.

Sin embargo, la IL-5 sí muestra una relación estadísticamente significativa con el porcentaje de variación del VEF1 post-broncodilatador. Ésta citoquina está asociada con inflamación de tipo eosinofílica y se ha mostrado evidencia directa que la IL-5 incrementa de manera importante la hiperreactividad de las vías aéreas al producir un influjo progresivo marcado de eosinófilos a las vías aéreas (24). Resultados similares se han visto en modelos animales tratados con anticuerpo monoclonales contra IL-5, que mostraba abolición de la respuesta de hiperreactividad bronquial a la histamina y arecolina (25). La mejoría de ésta respuesta incrementada de la vía aérea estaría asociada con una disminución de los niveles de IL-5. La IL-10 tuvo un comportamiento similar. Estos hallazgos llaman la atención dado que la IL-10 al parecer inhibiría la respuesta inflamatoria de los eosinófilos activados (26). Existe cada vez mayor evidencia de que la secreción de esta citoquina es defectuosa en los pacientes asmáticos; y su expresión reducida resultaría en una respuesta inflamatoria exagerada y más prolongada en las vías aéreas e los asmáticos. Sin embargo, su rol en las enfermedades alérgicas no está aún bien definido (27).

Nuestra población es básicamente adulta y mayormente no atópica, lo cual correlaciona con lo que se describe en la literatura (28). La evidencia indica que la expresión de asma está estrechamente asociada a IL-5, mientras que la IL-4 estaría más relacionada con la sensibilización alérgica y producción de IgE pero no directamente vinculada con el síndrome clínico de asma; asimismo, varios estudios muestran que los niveles séricos de IFN- γ correlacionan de manera negativa con atopía (29). Además, los niveles de IL-10 son menores en los atópicos. Nuestros resultados confirman lo que describe la literatura tanto para la IL-10 (30), y especialmente en la relación IL-4/IFN- γ con valores

significativamente mayores entre los atópicos comparado con los no atópicos, lo cual demuestra una vez más la tendencia de estos pacientes hacia una perfil inmune de tipo Th2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- (1) Mazarella G, Bianco A, Catena E, De Palma R, Abate G. F. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy* 2000; Suppl 61: 6-9.
- (2) Barnes P.J. Pathophysiology of Asthma en EUROPEAN RESPIRATORY MONOGRAPH Volumen 8, Monografía 23. European Respiratory Society Journal Ltd. Sheffield, UK 2003; 84-113.
- (3) Koh Y I, Choi I S y Lee H C. Relationship between changes in interferon- γ production by peripheral blood T-cells and changes in peak expiratory flow rate in patients with chronic stable asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1734-1738.
- (4) Howard A, Zwilling B. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 428-434.
- (5) Chung K.F, Barnes P.J. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54:825-857.
- (6) American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 225-44.
- (7) Streck WF, Lockwood DH. Pituitary Adrenal Recovery Following Short-Term Suppression with Corticosteroids. *The American Journal of Medicine* 1979; 66:910-4.
- (8) American Thoracic Society. Standardization of Spirometry: 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107-36.
- (9) Global Initiative for Asthma. Chapter 5: Diagnosis and Classification en GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. NIH Publication Nº 02-3659, Febrero 2002; 67-80.
- (10) BD Biosciences. BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine CBA en Clontech. Discovery Labware. Immunocytometry Systems-Pharmigen. New Jersey (USA) Becton Dickinson and Company, 2002.
- (11) Louis R, Lau L, Bron A, Roldaan A, Radermecker M, Djukanovic R. The Relationship between Airways Inflammation and Asthma Severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:9-16.
- (12) Vignola A, Chanez P, Campbell A, Souques F, Lebel B, Enander I, Bousquet J. Airway Inflammation in Mild Intermittent and in Persistent Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157: 403-409.
- (13) Renzi PM, Sapienza S, Waserman S, Du T, Olivenstein R, Wang NS. Effect of interleukin-2 on

- the airway response to antigen in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:163-169.
- (14) Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ, Coburn DA, Federman EC, Wasserman SI. Cytokines in symptomatic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 958-67.
- (15) Borger P, Ten Hacken NHT, Vellenga E, Kauffman HF, Postma DS. Peripheral blood T lymphocytes from asthmatic patients are primed for enhanced expression of interleukin (IL)-4 and IL-5 mRNA: association with lung function and serum IgE. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:772-9.
- (16) Koning H, Neijens J, Baert M, Oranje A, Savelkoul H. T cell subsets and Cytokines in Allergic and Non-allergic children. I.-Analysis of IL-4, IFN-g and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997; 9(6): 416-426.
- (17) Paliogianni F, Raptis A, Ahuja S S, Najjar S M y Boumpas D T. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:1481-1489.
- (18) Barnes P, Pedersen S, Busse W. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids - New Developments. *Am J Resp Crit Care Med* 1998; 157: S1-S53.
- (19) Shahid S; Kharitonov S; Wilson N; Bush A; Barnes P. Increased Interleukin-4 and Decreased Interferon- α in Exhaled Breath Condensate of Children with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1290-1293.
- (20) Stelmach I; Gorski P; Jerzynska J; Stelmach W; Majak P, Kuna P. A randomized, double blind trial of the effect of treatment with formoterol on clinical and inflammatory parameters of asthma in children. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2002; 89: 67-73.
- (21) Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Pavord I, Dolovich J, Hargreave FE. Prednisone dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. *Eur Respir J* 1999; 13:15-21
- (22) Mozo L, Suárez A y Gutiérrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes *Clin Exp Allergy* 2003; 34:406-412
- (23) Litonjua A; Sparrow D; Guevarra L; O'Connor G; Weiss S; Tollerud D. Serum interferon- α is associated with longitudinal decline in lung function among asthmatic patients: the Normative Aging Study. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2003; 90: 422-428.
- (24) Shi H; Xiao C; Zhong D; Qin S et al. Effect of Inhaled Interleukin-5 on Airway Hyperreactivity and Eosinophilia in Asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 204-209.
- (25) van Oosterhout A; Ladenius A; Savelkoul H; van Ark L; Deleman K; Nikamp F. Effect of anti-IL5 and IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1993;147: 548-552.
- (26) Lalani I, Bhol K, Ahmed R. Interleukin 10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 1997; 79: 469-483.
- (27) Barnes PJ. IL-10: A key regulator of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 667-9.
- (28) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77-79.
- (29) Tang M, Varigos Kemp A. Reduced interferon-gamma secretion with increased interferon-gamma mRNA expression in atopic dermatitis: evidence for a post-transcriptional defect. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 483-490.
- (30) Gentile DA, Schreiber R, Howe-Adams J, Trecki J, Patel A, Angelini B, Skoner DP. Diminished dendritic cell interleukin 10 production in atopic children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;92(5):538-44.