



11282  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA 4  
DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
Sede C.U.

“CORRELACIÓN DEL PERFIL DE SECRECIÓN  
DE CITOCINAS CON LA EXPRESIÓN DE UNA  
GLICOPROTEÍNA (ALL+) PRESENTE EN  
CÉLULAS Th2 EN PACIENTES CON RINITIS  
ALÉRGICA.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS  
PRESENTA  
ENRIQUE ROJAS RAMOS

DIRECTOR DE TESIS  
DR. EN C. RICARDO LASCURAIN LEDESMA

COMITÉ TUTORIAL  
DR. EN C. RICARDO LASCURAIN LEDESMA  
DR. EN C. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO  
DR. EN C. EDGAR ZENTENO GALINDO

MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Abreviaturas

**Th:** Linfocitos T cooperadores

**CD:** Grupos de diferenciación celular

**CCR:** Receptor de quimiocinas C

**ALL-R:** Oligosacaridos reconocidos por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*

**MCP:** Proteína quimioatrayente de monocitos

**IL:** Interleucina

**INF- $\gamma$ :** Interferon gamma

**IgE:** Inmunoglobulina E

**FC $\epsilon$ R1:** Receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E

**UA:** Unidades Alergia

**UI/L:** Unidades Internacionales/Litro

**Lo1 1:** Determinante principal del polen de pasto lolium perenne

**Der p:** Dermatofagoides pteronisinnus

**Der f:** Dermatofagoides farinae

**PAGE-SDS:** Gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de Sodio

**AAR:** Rinomanometría Activa Anterior

**FEV1 :** Volumen Expiratorio Forzado en el primer segundo

**CMN:** Células Mononucleadas

**PBS:** Solución Amortiguadora de Fosfatos

**FL1:** Canal de fluorescencia 1

**FL2:** Canal de fluorescencia 2

**PE:** Ficoeritrina

**QR:** Quantum Red

**FITC:** Fluoresceina

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ÍNDICE

Resumen	05
Abstract	06
Introducción	08
Antecedentes	11
Justificación	14
Hipótesis, Objetivos y Diseño del estudio	14
Material y métodos	16
Resultados	32
Discusión	68
Conclusiones	78
Referencias	80

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

Uno de los principales problemas para estudiar el papel de los subtipos Th1 y Th2 en diferentes estados del padecimiento alérgico es la falta de marcadores de superficie fenotípicos capaces de identificar a estos subtipos celulares. De los marcadores propuestos (CCR3, CD30, CD62L, CD11a, CD57 y ALL-R) para identificar a los linfocitos Th2, encontramos una correlación de la molécula CCR3 con la producción de IL-4 en linfocitos T CD4+ obtenidos de pacientes con rinitis alérgica 24 horas después del reto nasal con alérgeno y cultivados con PMA-ionomicina. En relación a los oligosacáridos de superficie reconocidos por la lectina *Amaranthus leucocarpus*, hubo una mayor expresión de CD30 en linfocitos T CD4+ de este grupo de pacientes, pero no fue estadísticamente significativo. La determinación de los otros marcadores de superficie para linfocitos Th2, no mostró diferencias estadísticas, ni correlación con IL-4 o IFN- $\gamma$ . En relación a la actividad de la rinitis, tampoco se encontraron diferencias en la expresión de los marcadores de superficie en linfocitos T CD4+ en condiciones basales.

La comparación con asma bronquial alérgica mostró en linfocitos T CD4+ una elevada expresión de CD30, CD57 y ALL-R cuando fueron cultivadas con PMA-ionomicina. El incremento de estos marcadores de las células en cultivo correlacionó con la producción de IL-4, a excepción de las células ALL-R+. Asimismo, hubo una mayor expresión de RANTES, eotaxina-1, eotaxina 2, MCP-3 y MCP-4 (ligandos solubles de CCR3) en el fluido broncoalveolar de estos pacientes. En relación a la actividad de este padecimiento, se encontró una mayor expresión de CD30 en linfocitos T CD4+ de pacientes con asma severa cuando

fueron comparados con las células de pacientes con asma moderada, de acuerdo a los criterios de severidad de la American Thoracic Society.

La comparación de padecimientos alérgicos con manifestaciones dermatológicas, mostró que los linfocitos de pacientes con dermatitis atópica tuvieron una mayor expresión de CD30 y ALL-R estadísticamente significativa en comparación con las células de pacientes con dermatitis de contacto.

Estos resultados sugieren que cada uno de los padecimientos atópicos tiene una fisiopatología particular y que los marcadores propuestos para identificar células Th2, reflejan una dinámica diferente en cada uno de ellos.

## ABSTRACT

One of the main troubles to study the roll of the Th1 and Th2 cells subtypes in different stages of the allergic diseases is the lack of phenotypic surface markers that could be able to identify these cellular subtypes. To identify to the Th2 lymphocytes have been proposed surface markers such: CCR3, CD30, CD62L, CD11a, CD57 and ALL-R, we fond a correlation of CCR3 molecule with the CD4+ T lymphocytes with production of IL-4, obtained from patients with allergic rhinitis 24 hours after nasal challenge with allergen and cultivated with PMA-ionomicin. In relation to surface oligosaccharides *Amaranthus leucocarpus* lectin, had a bigger expression of CD30 in CD4+ T lymphocytes in this group of patient, but it was not statistically significant. Other surface markers expressed in Th2 lymphocytes where determinate and those did not show statistical differences, neither

correlation with IL-4 or IFN  $\gamma$ . Rhinitis activity did not show differences in surface markers expression in CD4+ T lymphocytes in basal conditions.

Comparison with allergic bronchial asthma showed high expression of CD30, CD57 and ALL-R in CD4+ T lymphocytes when they were cultivated with PMA-ionomicina. The increment of these markers in cultivated cells correlated with IL-4 production, to exception to cells expressing ALL-R+. Also, there was a bigger expression of RANTES, eotaxin-1, eotaxin-2, MCP-3 and MCP-4 (soluble ligands of CCR3) in broncoalveolar lavage fluid of these patients. In relation to disease activity, CD30 expressed CD4+ T lymphocytes in patient with severe asthma when they were compared with the cells of patient with moderate asthma, according to the approaches of severity of the American Thoracic Society.

Comparison of allergic diseases with dermatologic manifestations showed that lymphocytes of patient with atopic dermatitis had a bigger expression of CD30 and ALL-R statistically significant in comparison with the cells of patient with contact dermatitis.

These results suggest that each one of the atopic diseases has a particular Physiopathology and the proposed markers to identify Th2cells, reflect a different dynamics in each one of them.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INTRODUCCION

Los padecimientos atópicos como la rinitis alérgica, el asma bronquial y la dermatitis atópica entre otras son un complejo de enfermedades crónicas, que incluyen factores ambientales induciendo una respuesta inmunitaria en individuos genéticamente susceptibles (1). La prevalencia de todos los padecimientos atópicos se ha incrementado enormemente en países industrializados, en los últimos 20 años. La rinitis alérgica es el problema nasal más común y el sexto padecimiento crónico más frecuente en Estados Unidos (2). El asma bronquial es el padecimiento crónico más común en la infancia y afectan a más de 15 millones de individuos en Estados Unidos (3). De los padecimientos atópicos el asma bronquial ocupa el 60%, mientras que la dermatitis atópica ocupa alrededor del 32% (4-6). Los padecimientos alérgicos se caracterizan por un aumento en la capacidad de los linfocitos B para producir inmunoglobulina E (IgE) en respuesta a ciertos grupos de antígenos inocuos del medio ambiente (alergenos), que pueden activar el sistema inmune después de la inhalación, ingestión o penetración a través de la piel. En los últimos años los mecanismos que regulan la síntesis de IgE humana han sido ampliamente estudiados (7). La síntesis de la IgE humana resulta de la colaboración entre el subtipo 2 de las células T cooperadoras (Th2) CD4+ y las células B. Las células Th2 proveen a las células B de IL-4 e IL-13 para inducir la expresión de un RNAm para la síntesis de la IgE. Además de esta señal soluble se requiere de la interacción física de la célula Th2 con la célula B a través de CD154 (ligando de CD40) con el CD40 expresado en la célula B (8-9). En contraste, las células T cooperadoras CD4+ tipo 1 (Th1) que

producen altas concentraciones de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) no producen IL-4, por lo tanto no contribuyen en la síntesis de IgE (10-12). Se han observado que otros factores solubles tales como IL-5, IL-10 IL-12 e IL-13, que al menos *in vitro*, pueden tener algunos efectos reguladores positivos o negativos en la síntesis de IgE humana (13-14).

La IgE producida contra el alérgeno se unen a receptores tipo I de alta afinidad (Fc $\epsilon$ R-I) presentes en la superficie de células cebadas o de basófilos en ausencia del alérgeno. Una vez que el Fc $\epsilon$ R1 fijado en la célula cebada, el contacto con el alérgeno libera mediadores vasoactivos, factores quimiotácticos y citocinas que producen inflamación (cascada alérgica). Los eosinófilos también están involucrados en la patogénesis de los padecimientos alérgicos, ya que estas células se acumulan en los sitios de la inflamación y sus productos tóxicos que se liberan, contribuyen al daño tisular (15-16)

Mosman y cols. (17) encontró que las células T CD4+ podían ser divididas de acuerdo a su perfil de secreción de citocinas, en Th1 y Th2 en un modelo murino. Posteriormente esta descripción fue hecha por Del prete y cols. (18) en humanos. A partir de entonces, los padecimientos alérgicos han sido un modelo de estudio para la polarización Th2. Los primeros reportes que señalaron la presencia de células Th2 y alta producción de IgE fueron observados *in vitro* en células T estimuladas con fitohemaglutinina en pacientes con síndrome hiper IgE, enfermedades atópicas severas (anafilaxia, estatus asmático, dermatitis atópica severa) o en infestaciones por helmintos (10, 19-20). En estos estudios, los autores encontraron un desequilibrio en la producción de citocinas; alta producción de IL-4

con decremento de  $\text{INF-}\gamma$ . Asimismo, en otros padecimientos atópicos, se observó que la presencia de células Th2 e inducción de síntesis de IgE en células B autólogas, en biopsias de bronquio o de mucosa nasal de pacientes con asma bronquial o rinitis, 48 horas posterior al reto bronquial o nasal positivo a polen de pasto (*Lol-1*) respectivamente (21). Subsecuentemente, se ha observado que muchas células T que infiltran la conjuntiva de pacientes con conjuntivitis vernal (alérgica), tienen características similares a las células Th2, ya antes descritas en el ratón por su capacidad para producir grandes cantidades de IL-4 con ausencia de  $\text{INF-}\gamma$  (22). Además, se encontraron proporciones altas de células T con perfil similar de citocinas que detectadas en la piel de pacientes con dermatitis atópica (23). Para usar una aproximación experimental diferente, con hibridación *in situ*, las células exhibieron señales específicas para RNAm de IL-5, pero no para  $\text{INF-}\gamma$ , esto fue encontrado en el sitio de la reacción de fase tardía de 24 horas, en la membrana basal del epitelio de biopsias de mucosa nasal, endobronquial y en el fluido broncoalveolar de pacientes con asma extrínseca (24-25). Estos hallazgos aportan evidencia que las células Th2 específicas para el alérgeno, se infiltran en la mucosa de 24 a 48 horas después de la inhalación del alérgeno.

La razón por la que los alérgenos solubles promueven la diferenciación de células Th2 no ha sido esclarecida. La presencia en el microambiente de IL-4 en ausencia o con bajas concentraciones de  $\text{INF-}\gamma$ , parece que representa una condición favorable para el desarrollo de células Th2. En algunos estudios se ha observado que la presencia de IL-4 en los sitios de presentación de antígeno es el

factor dominante en la determinación de la polarización de las células Th2 en reposo en ratones y humanos (26-27).

## ANTECEDENTES

En los última década, algunas moléculas de superficie han sido asociadas con células Th2 humanas. CD30 es uno de los integrantes de la familia de receptores de TNF inicialmente descrito en linfomas (28,29). Romagnani y cols. (30) en condiciones no neoplásicas encontró un perfil de secreción de citocinas tipo Th2 asociado a la expresión de CD30 en algunas células T CD4+ alérgico-específicas, obtenidas de la circulación sanguínea de pacientes con enfermedad alérgica, posterior a la exposición del alérgeno. Estos mismos autores encontraron que células Th1 mostraban baja o indetectable expresión de la proteína CD30, mientras que las células Th2 expresaban grandes cantidades de CD30 en su superficie y liberaban cantidades de CD30 soluble detectables por ELISA en el suero de pacientes alérgicos (31). Además, en pacientes asmáticos sensibilizados a polen de pasto con exposición estacional o perenne y con aparición de sintomatología alérgica (*Lol 1*), se observó que las células T CD4+CD30+ específicas para este alérgeno tenían una producción de citocinas tipo Th2 (32). En otro estudio en pacientes con asma bronquial alérgica, se encontró mediante análisis de citometría de flujo y ELISA, que células T CD4+ que expresaban CD45RO y CD30, en cultivo estimulando con PHA disminuyó la expresión de CD30, mientras que aumentó el CD30 soluble, lo cual correlacionó con la severidad del padecimiento (33). En otro estudio analizando la expresión de CD30

en células T CD4+ obtenidas de fluido de lavado broncoalveolar de distintos procesos inflamatorios pulmonares no alérgicos (fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica y sarcoidosis), se encontró una correlación entre las células T CD4+ y la expresión de IL-5 en el grupo de pacientes con neumonía eosinofílica, señalando la presencia de células Th2 (35). CD30 parece involucrado en vía de la diferenciación/activación de células Th2 y puede representar un marcador para células T productoras de citocinas tipo Th2 (36,37).

Kanegane y cols. (38), utilizando un modelo murino, han propuesto que la mayor expresión de CD62L (L-selectina) en células T CD4+ se encuentra relacionada con las células Th2. Yamashita y cols. (39) mediante citometría de flujo determina la expresión de CD62L en células T CD4+ de sangre periférica de un grupo de pacientes con distintos procesos atópicos (asma alérgica, rinitis alérgica y dermatitis atópica), los resultados mostraron que los pacientes con asma o con dermatitis expresaron una mayor proporción de CD62L. Mitra y cols (40), en un modelo de lepra, encuentra células T CD4+ CD45RA- y CD11a<sup>dím</sup> asociadas a una mayor expresión de CD62L en el tipo lepromatoso (predominio de células Th2), mientras que en el tipo tuberculoide (predominio de células Th1) las células T CD4+CD45RA- son CD11a<sup>brígh</sup> y CD62L negativas, por lo cual los autores sugieren que la diferencia en la expresión de CD62L en células T CD4+, está relacionada con el fenotipo Th2.

La expresión de CCR3 también ha sido asociada con células Th2. Gerber y cols. (41) analizando la expresión de este receptor en clones de linfocitos T,

encontró que de 13 clonas CCR3+, nueve de ellas secretaron niveles importantes de IL-4 y/o IL-5, indicando que CCR3 predomina en células Th2. En este reporte, las células T CCR3+ fueron detectadas por citometría de flujo e inmunohistoquímica en un grupo de pacientes con dermatitis alérgica, pólipos nasal o con colitis ulcerativa y no fueron detectadas en piel normal o en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide.

Por otra parte, en la superficie de todas las células encontramos glicoconjugados. Las lectinas animales y/o vegetales debido a la gran especificidad por carbohidratos han permitido aislar y caracterizar grupos celulares, así como sus receptores, y ha sido posible identificar lectinas capaces de inducir actividad mitogénica en linfocitos. Algunas lectinas específicas por la estructura Galactosa $\beta$ 1,3 N-acetil-D-galactosamina  $\alpha$ 1,0Ser/Thr, como la lectina de cacahuete (*Arachis hypogaea*) reconoce células CD8 en linfocitos de memoria y/o efectores, así como en timocitos corticales. (*Salvia sclarea*) es una lectina que reconoce a CD43 y la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, que reconoce macrófagos y linfocitos vírgenes con un fenotipo CD45RA+, CD27+ (42-44). En nuestro laboratorio se ha encontrado que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* reconoce N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) en la estructura Gal-GalNAc de una O-glicoproteína de membrana de 70 kDa, estos resultados se han obtenido mediante cromatografía de afinidad en una columna con matriz de agarosa con avidina y el lisado de células T incubado con la lectina acoplada a biotina (45,46). Esta lectina de *Amaranthus leucocarpus* se ha propuesto que es capaz de aglutinar linfocitos T CD4+ humanos con un perfil de citocinas tipo Th2 (47). En

base a estos antecedentes, se sugiere que la utilización de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* puede ser utilizada como una herramienta para el estudio de células tipo Th2.

## JUSTIFICACION

En los últimos años el incremento en los padecimientos alérgicos, constituye un problema de salud a nivel mundial (48). Sin embargo, no ha sido esclarecida totalmente la inmunopatología de estos padecimientos, y tampoco se tienen marcadores celulares que involucren la actividad del padecimiento o que permitan desde este punto de vista evaluar o intervenir sobre el el tratamiento. Las moléculas como CD30, CD62L, CCR3 y ALL-R entre otras pueden ser marcadores característicos de células productoras de citocinas tipo Th2.

## HIPOTESIS

Las moléculas de superficie (CD30, CCR3, ALL-R, CD62-L y CD11a) celular correlacionan con fenotipos celulares característicos de linfocitos Th2.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Correlacionar moléculas de superficie celular de linfocitos Th2 (CD30, CCR3, ALL-R, CD62-L y CD11a), con su perfil de secreción, en pacientes con rinitis alérgica comparando con otros padecimientos alérgicos en distintos estados de gravedad.

## Objetivos específicos

1.1 Conocer la correlación que existe entre los marcadores de superficie y la producción de IL-4 en células Th2 en sangre periférica de pacientes con rinitis alérgica y compararlos con diversos padecimientos alérgicos.

1.2 Determinar si el reto nasal con alérgeno, modifica la expresión de los marcadores de superficie y la producción de IL-4.

1.3 Conocer si la gravedad del padecimiento modifica el tipo la expresión de moléculas de superficie celular relacionadas a células Th2 de pacientes con rinitis atópica y otros padecimientos.

## DISEÑO DEL ESTUDIO

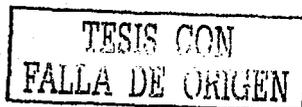
### TIPO DE ESTUDIO

Para los estudios 1 y 2; Clínico controlado de mediciones repetidas

Para los estudios 3, 4 y 5; Transversal comparativo

### MUESTRA

Células T CD4+, producción de IL-4 e INF- $\gamma$ , pacientes con enfermedad alérgica y sujetos sanos.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## Extractos alérgicos.

Los extractos alérgicos utilizados fueron *Dermatophagoides pteronissinus* y *farinae* (*Der p* y *Der f*), fueron procesados en base a los criterios propios de cada laboratorio, con distintos tipos de presentación; Unidades Alergia, Unidades Biológicas y Peso/Volumen (Labs: Greer, Alk-Bello y Allergomex respectivamente). El control negativo fue glicerina/solución salina en diluciones seriadas con solución de fosfatos y el control positivo fue histamina en solución fosfatos (histamina base 1.0 mg/ml).

## Potencia biológica de los extractos alérgicos.

Durante los últimos años se han desarrollado algunos métodos para minimizar la variación en el contenido y potencia de los extractos alérgicos siendo los más utilizados la preparación peso/volumen. Esto ha resultado en la propuesta de la Unidad Alérgica (por definición; la concentración proteica del extracto de referencia, que produce en una población alérgica una media geométrica de roncha de 75 mm<sup>2</sup>, equivale a la actividad de 100 unidades biológicas). Para determinar la potencia biológica del alérgeno, fueron seleccionaron 15 sujetos sanos, 15 pacientes con rinitis alérgica a *Der p* y *Der f* y 15 pacientes con rinitis alérgica a mezcla de pólenes (*Lolium perenne*, *Ambrosia*, *Taraxacum officinale*, *Cabriola* y *Plheum pratensis*) A los pacientes se les realizó pruebas cutáneas para cada tipo de alérgeno (sin diluir y a diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000) y 15 minutos después se midió en mm el tamaño de la roncha y el

tamaño de eritema. Para comprobar la especificidad del alérgeno, a los pacientes se les realizó reto nasal con intervalos de 7 días para cada tipo de extracto; inicialmente con solución salina y 24 horas después con el extracto de acaro valorandose la escala de síntomas antes y después de cada reto. Adicionalmente se determinó la concentración de proteínas por la técnica de M. Bradford (49) y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio (PAGE-SDS) por la técnica de Laemli (50) de cada extracto alérgico.

### **Electroforesis en Geles de Poliacrilamida**

Se realizaron varios análisis electroforéticos de los distintos extractos de ácaro de los laboratorios Greer (USA), Alk-Bello (USA) y Allergomex (México). Cada análisis se realizó en una cámara 2050 de electroforesis vertical (Hofer Scientific Ins, Suiza) con 10 carriles de corrimiento. En un análisis inicial se comparó solamente los extractos de los Laboratorios Allergomex y Greer ya que en la preparación del Laboratorio Alk-Bello no se detectó proteína. El análisis se realizó en un gel de poliacrilamida al 10% y se aplicó 30µl de proteína de cada extracto; en el carril del 1 se aplicó 5µl de una mezcla de marcadores de peso molecular de Sigma Chem. (St Louis MO, USA), la cual se utilizó como referencia, en el carril 2; *Der p*, en el carril 3; *Der f*, de Greer y en los carriles 4 y 7 *Der p* y *Der f* de Allergomex por duplicado respectivamente. En un segundo gel al 12.5% se analizó solamente los extractos de ácaros preparados por el Laboratorio Greer; en el carril 1; se colocó los marcadores de peso molecular de Sigma Chem.; en el carril 2 *Der p*, y en el carril 3 *Der f*. En un tercer análisis, se compararon los

alergenos de los tres laboratorios (cabe mencionar que para el Laboratorio Alk-Bello, los extractos de ácaros se concentraron hasta 30  $\mu$ l y para el Laboratorio Allergomex se solicitó desalbuminar los extractos, los cuales se concentraron hasta 30  $\mu$ l). El análisis se realizó en un gel de poliacrilamida al 12.5%; se colocó en el carril 1; los marcadores de peso molecular de Sigma Chem., en el carril 2 *Der p*, en el carril 3 *Der f* (de los Laboratorio Greer); en el carril 4 *Der p*, en el carril 5 *Der f* (de los Laboratorios Alk-Bello); en el carril 6 *Der p*, y en el carril 7 *Der f* (Laboratorios Allergomex). Todos los extractos de ácaro fueron preparados como sigue: se les adicionó 30 $\mu$ l de amortiguador de muestra (0.1 $\mu$ g de azul de bromofenol, glicerol al 20%, 0.4% de SDS en Trizma base 0.1M pH 6.8), 1 $\mu$ l de 2-mercaptoetanol y fue calentado en baño de agua hirviendo durante 5 minutos previo al corrimiento electroforético. El tiempo de duración del corrimiento electroforético fue de 2 horas a 100 v. Al finalizar la electroforesis, los geles fueron tratados para su tinción con nitrato de plata según el método descrito (51).

### Pacientes

A todos pacientes y sujetos sanos se les invito a participar en el estudio y a firmar carta de consentimiento informado siguiendo la normatividad de los comités científico y ético de la Institución. Los pacientes con enfermedad alérgica fueron definidos por: a) criterios internacionales (descritos posteriormente) para cada padecimiento, b) pruebas cutáneas positivas (método de Prick con una roncha >3 mm de diámetro en presencia de positividad a histamina y negatividad a la solución diluyente) a uno o más extractos de los alergenos más comunes

(*Dermatofagoides pteronissinus*, *farinae*, alérgeno de cucaracha, alérgenos de polen de pastos, arbustos, árboles y/o alérgenos de epitelios de animales), y c) niveles elevados de IgE sérica total para el rango de edad (mayor de 160 UI/L en promedio).

**Sujeto Sano.** Los sujetos sanos fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios: a) asintomáticos, b) sin familiares atópicos, c) con IgE menor de 160UI/L, c) pruebas cutáneas negativas y d) reto nasal negativo a antígeno de ácaro de polvo casero. e) además de responder negativamente al un cuestionario de historia personal de Lavins y cols (52) como se muestra en el siguiente cuadro:

Historia Personal: ¿Alguna vez ha tenido?

- Catarros o estornudos frecuentes
- Asma
- Eczema
- Rash cutáneo o disnea relacionada con alimentos
- Constante fluido nasal u obstrucción nasal
- Frecuente comezón o estornudos nasales
- Intolerancia a mascotas por alergia
- Comezón en ojos o nariz, estornudos o fluido nasal estacional.

Historia Familiar: ¿Su madre, padre, hermano, hermana o hijos, tienen algún síntoma relacionado?

**Medicamentos:** Usted toma regularmente

- Antihistamínicos
- Descongestionantes
- Terbutalina
- Teofilina

Es importante considerar estos datos en la selección de los pacientes, ya que como han demostrado algunos autores Lavine BJ. y Kelso JM., el estar relacionado con algún familiar atópico en primer grado favorece la positividad a pruebas cutáneas aún sin presentar el cuadro clínico de atopia (52,53).

#### **Pacientes con Rinitis Alérgica**

Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios: un mínimo de dos años de cuadro clínico perenne y síntomas tales como prurito nasal, estornudos, rinorrea hialina y obstrucción nasal. Cabe mencionar que para el diagnóstico del padecimiento, las pruebas cutáneas positivas por Prick y los niveles de IgE total sérica mayor a 160 UI/L tienen una sensibilidad del 86 al 90 % y una especificidad aproximada del 90%. Las pruebas intradérmicas y niveles IgE total específica tienen una sensibilidad del 90 al 95 %, pero puede representar riesgo de anafilaxia para el paciente (54). Por esta razón, se decidió emplear pruebas cutáneas por Prick y niveles de IgE sérica total.

**Síntomas nasales.** Antes y después de cada reto nasal se valoró una escala análoga visual, diseñada por nosotros para evaluar la severidad de los síntomas relacionados con cada reto nasal (rinorrea, prurito, estornudos, tamaño de

cornetes, color de cornetes, color conjuntival, color facial y obstrucción nasal). Cada síntoma y signo fue evaluado de 0-4 puntos, la escala de síntomas va de un mínimo de 2-3 puntos por ciclo nasal (basado en la obstrucción nasal fisiológica en balanza), hasta un máximo de 30 puntos que denotaría anafilaxia. Todos los pacientes fueron asintomáticos al inicio del estudio, y tuvieron un mes previo de "periodo de lavado" (privación de medicamentos tópicos y sistémicos como vasoconstrictores tópicos nasales, cromoglicato o esteroides tópicos y 6 semanas para el astemizol). Ninguno de los pacientes tuvo anomalías anatómicas relevantes a la exploración de nariz, oído y garganta.

### Escala Análisis Visual

SIGNO O SINTOMA	PUNTOS	SIGNO O SINTOMA	PUNTOS
<b>RINORREA</b> 0. Ausente 1. Mínima: Mucosa húmeda 2. Moderada: Visible en el piso 3. Severa: Profusa, llenando la cavidad o derramando <b>OBSTRUCCION NASAL</b> 0. Ausente 1. Mínima: Ligeramente molesta 2. Moderada: Molesta 3. Severa: Angustioso		<b>ESTORNUDOS</b> 0. Ausentes 1. Mínima: 1-5 2. Moderada: 6-10 3. Severa: 11 o más  <b>PRURITO</b> 0. Ausente 1. Mínimo: Perceptible 2. Moderado: Molesto 3. Severo: Angustioso	
<b>TAMANO DE LA MUCOSA DEL CORNETE INFERIOR DERECHO</b> 0. No visible 1. Mínimo: Tumefacción o prominencia visible en 1/3 de la luz. 2. Moderado: Tumefacción o prominencia visible en 2/3 de la luz. 3. Severo: Tumefacción o prominencia visible en 3/3 de la luz (oclusivo)		<b>TAMANO DE LA MUCOSA DEL CORNETE INFERIOR IZQUIERDO</b> 0. No visible 1. Mínimo: Tumefacción o prominencia visible en 1/3 de la luz. 2. Moderado: Tumefacción o prominencia visible en 2/3 de la luz. 3. Severo: Tumefacción o prominencia visible en 3/3 de la luz (oclusivo)	
<b>COLOR DE LA MUCOSA DEL CORNETE INFERIOR DERECHO</b> 0. Normal: Rosada 1. Mínima: Ligeramente pálida/roja 2. Moderada: Moderadamente pálida/roja 3. Severa: Muy blanca, roja o azul		<b>COLOR DE LA MUCOSA DEL CORNETE INFERIOR IZQUIERDO</b> 0. Normal: Rosada 1. Mínima: Ligeramente pálida/roja 2. Moderada: Moderadamente pálida/roja 3. Severa: Muy blanca, roja o azul	
<b>COLOR DE LAS CONJUNTIVAS</b> 0. Normal: Rosadas 1. Mínima: Ligeramente rojas 2. Moderada: Moderadamente rojas 3. Severa: Muy rojas		<b>COLOR FACIAL</b> 0. Normal 1. Mínimo: Ligeramente eritematoso 2. Moderado: Moderadamente eritematoso 3. Severo: Muy eritematoso	
<b>TOTAL</b>			

Escala Análisis Visual de Rojas-Ramos E. Y Cole.



**Reto nasal.** Los pacientes fueron retados primero con solución salina (NaCl 0.9%) estéril y 24 horas después fueron retados con una solución de *Der p*. El estímulo fue aplicado en ambas narinas en la cara anterior de la cabeza del cornete inferior por aerosol con una bombilla conteniendo  $200 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$  (equivalente a 200 UA) por cada aplicación. Previamente, se inspeccionaron ambas cavidades nasales por rinoscopia anterior, para confirmar la ausencia de anomalías nasales. Los pacientes fueron aclimatados a temperatura ambiente por lo menos 15 minutos antes de cada reto.

**Rinomanometría.** La rinomanometría activa anterior (AAR) fue realizada con un rinomanómetro Jaeger<sup>TM</sup>, usando el software Rhinoscreen (Hoechberg, Germany). La AAR fue realizada antes y después del reto nasal con solución salina o bien con solución conteniendo *Der p*. El volumen de flujo aéreo y la resistencia nasal al flujo aéreo fue valorado directamente obteniendo una curva nasal determinada vía AAR como se describe (55,56).

### **Pacientes con Asma Bronquial**

El asma bronquial fue definida de acuerdo a la Sociedad Americana de Tórax (57). Los pacientes (adultos y niños) con crisis recurrentes de disnea, sibilancias y reversibilidad en el FEV<sub>1</sub> del 20% espontáneamente o posterior al uso de  $\beta_2$ -agonistas inhalados y de acuerdo al valor predeterminado para cada paciente.

**Espirometría.** La espirometría se realizó para apoyo diagnóstico y para clasificar la severidad del padecimiento, con un espirómetro vitalograph (modelo ALPHA). A

cada paciente se le realizó una medición basal espirométrica y otra 20 minutos después de la administración de 180 µg de salbutamol por "Inhalador de Dosis Medida" para determinar el porcentaje de reversibilidad de FEV1.

**Fluido del Lavado Broncoalveolar.** El procedimiento de broncoscopia para obtener fluido de lavado broncoalveolar (BAL) fue realizado en este grupo de niños después de una premedicación de 2.5 mg de salbutamol por nebulizador y administración por vía intravenosa de 0.2 mg/kg de peso de atropina con 0.2 mg/kg de peso de midazolam. Posteriormente se aplica lidocaina al 1% en aerosol en región nasal y faríngea introduciendo el broncoscopio modelo Olympus IT30 (Olympus, Tokyo Japon) para la inspección del árbol bronquial y una vez localizada la lingula el lavado broncoalveolar fue realizado con solución salina estéril con un volumen de 3 ml por Kg de peso como se describe (58,59). A los niños con asma bronquial y niños sujetos sanos sometidos al estudio, que así lo requirieron se les dio una dosis adicional de 2.5 mg de salbutamol nebulizado inmediatamente después del procedimiento. El aspirado del fluido fue colectado en tubos cónicos de 50 ml estériles y refrigerados a 4°C. La primera alícuota fue considerada como material confiable de acuerdo a lo descrito (60,61). Durante el procedimiento de broncoscopia, los pacientes fueron monitoreados en signos vitales como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, saturación O<sub>2</sub> por oximetría de pulso, EKG (DII) y posterior al procedimiento se vigiló la escala de Glasgow, saturación de O<sub>2</sub>, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria por personal de enfermería en intervalos no mayores de una hora durante 4 hrs. Al finalizar el procedimiento, se tomó una radiografía postero-anterior de tórax para

evaluar posibles complicaciones como enfisema, neumotórax, neumomediastino, edema subglótico o hemorragia. En todos los casos el procedimiento no originó complicaciones.

### **Pacientes con Dermatitis Atópica**

Los pacientes con dermatitis atópica incluidos en el estudio fueron seleccionados por presentar un eczema pruriginoso, eritematoso y edematoso, con topología en pliegues (62), pruebas cutáneas positivas a *Der p* y niveles de IgE sérica mayor a 160 UI/L. No se incluyeron pacientes con fase de inactividad o liquenificación de lesiones, o en tratamiento o uso previo en los últimos 15 días de esteroides tópicos o sistémicos.

### **Pacientes con Dermatitis de Contacto**

Los pacientes con dermatitis de contacto incluidos en el estudio fueron seleccionados por presentar eczema pruriginoso, eritematoso y edematoso o vesiculoso, con topología relacionada a manos o cuello y relacionada con uso de accesorios fabricados con níquel (63), con pruebas cutáneas negativas a *Der p* y pruebas de parche positivas a níquel, con IgE dentro de límites normales (menor a 160 UI/L). No se incluyeron pacientes con fase de inactividad o lesiones en fase de descamación, así mismo los pacientes en tratamiento de esteroides tópicos o sistémicos o uso en un periodo previo de 15 días.

**Pruebas al parche.** Las pruebas al parche se realizaron con el método TRUE TEST de Glaxo Wellcome (USA). Los parches fueron aplicados en la espalda, después de retirar los ácidos grasos de la piel con una solución de alcohol al 80%

y acetona al 20%. La reacción fue valorada 48 y 72 hrs después de la aplicación, midiendo en mm la roncha y el eritema.

### **Muestras Biológica**

**Sangre.** Se obtuvieron 15 ml de sangre heparizada de pacientes o de sujetos sanos mediante venopunción. A los pacientes con rinitis alérgica se les realizó una segunda toma de muestra después del reto nasal. La sangre fue procesada en un lapso no mayor a 2 horas manteniéndola a 4°C.

**Fluido de lavado broncoalveolar.** 10-30 ml de fluido broncoalveolar fueron obtenidos de pacientes con asma bronquial y de sujetos sanos. La muestra fue filtrada en un sedal estéril para la eliminación de moco, después las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 400g por 15 minutos a 4°C 3000 rpm para separar las células del fluido. El botón celular fue suspendido en solución de buffer de fosfatos, las células fueron contadas por hemocitómetro la cuenta diferencial por realizada por el kit Diff-Quick Stain (Dade Behring USA), el fluido del lavado broncoalveolar fue almacenado a -70°C, para posteriormente medir la concentración de quimiocinas por ELISA.

### **Separación de células mononucleadas**

Las células mononucleadas fueron separadas de la sangre heparinizada por centrifugación a 1750 rpm en Ficoll Hypaque (densidad de 1.077) durante 30 minutos a 16°C. Las células mononucleadas (CMN) totales se recolectaron de la interfase de Ficoll y suero sanguíneo. Las células recuperadas se lavaron dos

veces mediante la adición de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS) y centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C decantando el sobrenadante y resuspendiendo cada vez el botón celular en PBS. La viabilidad celular fue valorada por microscopia de luz utilizando un hemocitómetro y el método de exclusión del colorante azul tripano. Las células se concentraron a una relación de  $10^7$  células/ml de PBS y en los ensayos se utilizaron las células que presentaron una viabilidad superior al 95%.

#### **Separación de células T CD4+**

Las células T CD4+ fueron obtenidas mediante anticuerpos acoplados a perlas magnéticas utilizando un kit de separación negativa e indirecta (Miltenyi Biotec, Alemania).  $10^7$  células mononucleadas resuspendidas en 80µl de solución de BSA-EDTA-PBS (albúmina sérica bovina al 0.5% y 2 mM de EDTA en PBS) fueron incubadas en 20µl de una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón contra los marcadores fenotípicos CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56, durante 15 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células fueron lavadas 2 veces y resuspendidas en 80 µl de BSA-EDTA-PBS e incubadas con 20µl de un segundo anticuerpo conjugado a perlas magnéticas. Al término de la segunda incubación, las células se lavaron 2 veces, se resuspendieron en 500µl de BSA-EDTA-PBS y se aplicaron a una columna MS de separación (Miltenyi Biotec, Alemania) previamente lavada con 500µl de solución de BSA-EDTA-PBS y colocada en un campo magnético. Enseguida, a la columna se adicionaron 2 ml de solución de BSA-EDTA-PBS repartida en intervalos continuos de 500 µl cada uno

y por último la columna se retiró del imán y se aplicó 1 ml de BSA-EDTA-PBS recuperando la fracción celular retenida. Las fracciones celulares obtenidas de la columna fueron valoradas en su viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul tripano, cuantificadas en un hemocitómetro y analizadas mediante incubación con anticuerpos monoclonales de ratón conjugados a ficoeritrina (PE) contra CD4 de leucocitos humanos (Dako, Carpintería USA).

#### **Cultivo de Células T CD4+**

Los cultivos celulares fueron realizados con  $10^6$  células T CD4+ con un estímulo de 2.5 ng/ml de acetato de forbol miristato (PMA) de Sigma Chem. (St Louis MO, USA) y 1 µg/ml de ionomicina (Sigma Chem.) en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chem.) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco BRL, Rokville MD, USA) en cada pozo de placas de cultivo de 24 pozos de fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante 4 hrs a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células se recuperaron, se lavaron 2 veces con PBA (albúmina sérica bovina al 0.2% y azida de Sodio al 0.2% en PBS) y se cuantificaron en un hemocitómetro para su análisis en citometría de flujo. Para la determinación de citocinas intracelulares, las células se cultivaron en presencia de 10 µg/ml de Brefeldina-A/pozo y se sometieron al procedimiento antes descrito.

#### **Lectina de *Amaranthus leucocarpus*.**

La lectina fue obtenida de las semillas de *Amaranthus leucocarpus* (colectadas en Tulyehualco, México) mediante cromatografía de afinidad en una

columna de estroma de eritrocitos humanos según el método descrito (64). La actividad hemaglutinante de la lectina se determinó por la técnica de doble dilución seriada, utilizando placas para hemaglutinación de 96 pozos de fondo en "U" y eritrocitos humanos tipo A2 al 2% en PBS. La actividad hemaglutinante se reportó como la mayor dilución en la que aún se observó hemaglutinación. La lectina se ajustó a 6400 U de actividad específica (AE) donde la AE de la lectina es el cociente del inverso de la actividad hemaglutinante referido en un ml de solución entre la concentración de proteína expresada en miligramos. Posteriormente, la lectina se conjugó a FITC según el método descrito (65).

#### **Citometría de flujo.**

Se analizaron 500,000 células T CD4+ en un FACScalibur™ (Becton and Dickinson, USA) usando el software Cell Quest (Becton and Dickinson). Las células se obtuvieron del cultivo celular o de las células mononucleadas aisladas de sangre del paciente. Con la finalidad de localizar a la población linfocitaria se realizó un análisis mediante gráficas de tamaño celular (por sus siglas en inglés, Forward Scatter, FSC) contra granularidad o complejidad celular (por sus siglas en inglés Side Scatter, SSC). Para el análisis de células con fluorescencia reconocidas por los anticuerpos monoclonales, se realizaron gráficas de puntos e histogramas usando los canales de fluorescencia 1 (FL-1) para el fluorocromo FITC y fluorescencia 2 (FL-2) para los fluorocromos PE y Quantum-Red (QR) en la región linfocitaria de la gráfica FSC vs SSC. Los resultados fueron expresados en porcentaje celular para cada marca fenotípica.

**Doble Inmunofluorescencia.** Los ensayos se realizaron mediante inmunofluorescencia directa e indirecta. Para la inmunofluorescencia directa, las células T CD4+ fueron incubadas individualmente con la lectina-FITC y con los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón contra moléculas de linfocitos humanos: anti-CD11a-PE (PharMingen, USA), anti-CD28-PE (PharMingen, San Diego, USA), anti-CD30-FITC (Dako, Carpintería, USA), anti-CD62L-FITC (PharMingen), anti-CD124-PE (R&D, Minneapolis MN, USA), anti-CD154-PE (Dako), y se utilizaron testigos de isotipo conjugados a los fluorocromos correspondientes (PharMingen). En el ensayo, las células se incubaron con 10 $\mu$ l de los anticuerpos (previamente titulados) durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBA y resuspendidas en 500 $\mu$ l de solución amortiguadora de FACS para su análisis.

**Inmunofluorescencia indirecta:** Las células T CD4+ fueron incubadas individualmente con los anticuerpos anti-CD57 (Zymed, San Francisco, CA, USA), anti-CD25, anti-CD152 (Serotec, Inc, Raleigh, NC, USA) y CCR-3 (R&D, Minneapolis MN, USA) por 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBA y se incubaron 30 minutos a 4°C en oscuridad con el segundo anticuerpo anti-ratón unido al fluorocromo. Las células fueron nuevamente lavadas con PBA y resuspendidas en la solución de FACS para ser analizadas mediante citometría de flujo.

**Citocinas Intracelulares.** Se cosecharon del cultivo  $10^6$  células T CD4+, las cuales se lavaron con PBS, se fijaron con *p*-formaldehído al 4% en PBS a 0°C por 10 min. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1 ml de solución de permeabilización (saponina al 0.1%, BSA al 10%, HEPES 0.01 M y 100 µg/ml de IgG de cerdo en PBS) por 10 minutos a temperatura ambiente (22 +/- 3°C) con agitación ligera. Las células fueron centrifugadas, decantadas e incubadas con los anticuerpos anti-IL-4-PE y anti-IFN-γ-FITC (Becton & Dickinson, San José, CA, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas con solución de lavado (saponina al 0.1%, HEPES 0.1M en PBS) y resuspendidas en solución de FACS para ser analizadas por citometría de flujo. Este método fue modificado parcialmente del método descrito por Waldrop y cols. (66).

**ELISA:** Las concentraciones de quimiocinas (RANTES, Eotaxina-1, Eotaxina-2, MCP-3 y MCP-4) fueron determinadas en el fluido de BAL, por el método de ELISA siguiendo las especificaciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis MN, USA). En cada pozo de la placa, se colocaron por duplicado 100µl del diluyente y con 50 µl de la muestra biológica (concentrada dos veces) mezclando suavemente; se colocaron también blancos de reactivo y concentraciones conocidas en dilución creciente de cada quimiocina. La placa fue sellada e incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con 400 µl de la solución amortiguadora del kit, aspirando y removiendo el total del remanente de la solución amortiguadora. A cada pozo, se agregó 200 µl del

anticuerpo conjugado a una enzima, sellando la placa y dejando incubar por 2 horas. La placa se lavó 3 veces y a cada pozo se agregó 200  $\mu$ l del sustrato de la enzima, la cual fue sellada e incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 50  $\mu$ l de la solución del kit para detener la reacción realizando una agitación ligera. En un lapso no mayor a 30 minutos la placa fue leída en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan MS, Finlandia) a 450 nm. El límite de detección para RNANTES, eotaxina-1, eotaxina-2 y MCP-3 fue de 15 pg/ml, y para MCP-4 fue de 7.8 pg/ml.

### **Análisis Estadístico**

Los datos fueron analizados con el programa SPSS versión 10.0, se valoró inicialmente la distribución de los datos mediante sesgo, curtosis, y las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk (como pruebas de normalidad). En todos los casos los datos no presentaron una distribución normal, las medidas de resumen utilizadas fueron; tendencia central (mediana) y de dispersión (percentiles y rango). Para la comparación de resultados y búsqueda de diferencias entre los dos grupos independientes o dependientes se utilizó U de Mann Whitney o Wilcoxon respectivamente; las diferencias entre más de dos grupos fueron realizadas por las pruebas de Friedman y Kruskal-Wallis. El nivel de significancia estadística fue en todos los casos de 0.05 bimariginal para una hipótesis nula. Se utilizó la Rho de Spearman para identificar la correlación de las variables bajo estudio. En todos los casos se seguieron las recomendaciones de Finstein para el manejo de datos estadísticos (67).

# RESULTADOS

## Extractos alergénicos

La concentración de proteínas para los extractos de alérgenos (10,000 UA) del Laboratorio Greer, fue de 954  $\mu\text{g/ml}$  para *Der p* y 798  $\mu\text{g/ml}$  para *Der f*. La concentración de proteínas para los extractos de alérgenos (1:10 P/V) del Laboratorio Allergomex, fue de 950  $\mu\text{g/ml}$  para *Der p* y 706  $\mu\text{g/ml}$  para *Der f*. La concentración de proteínas para los extractos de los alérgenos del Laboratorio Alk-Bello, tuvo concentraciones tan bajas que no alcanzaron a ser detectadas.

## Potencia biológica de los extractos alergénicos.

Con los alérgenos del Laboratorio Greer, los pacientes con rinitis alérgica a ácaros de polvo casero (*Der p* y *Der f*), tuvieron una roncha con media significativamente mayor (58.6 mm para *Der p* y 46.9 mm para *Der f* respectivamente) que con los alérgenos de los laboratorios Allergomex o Alk-Bello (23.2 mm para *Der p* y 19.8 mm para *Der f*, mientras que para Alk-Bello fue de 36.3 mm y 33 mm respectivamente). La mayor puntuación es la escala de síntomas se obtuvo con los extractos del Laboratorio Greer (estadísticamente significativa con una media de 14.0 puntos). Los pacientes con rinitis alérgica a pólenes de pastos así como los sujetos sanos no presentaron cutirreacción, ni positividad al reto nasal con *Der p* y *Der f*.

## Electroforesis de los Extractos Alergénicos.

Los resultados de la separación electroforética de los extractos de los diferentes alérgenos se muestra a continuación: En la figura 1, en los carriles 2 y 3 (Lab. Greer) se observan las bandas características de *Der p 1* y *Der f 1* que corresponden a 25 kDa, mientras que en el resto de los carriles se observa una banda prominente que al parecer corresponde a la albúmina agregada al diluyente según el procedimiento del laboratorio y no se observan las bandas características de los alérgenos de los ácaros. En la figura 2 se observan en los carriles 2 y 3 las bandas características del *Der p 1* y *Der f 1*. Cabe señalar que se analizó solamente los extractos de ácaros preparados por el Laboratorio Greer para evidenciar mejor separación de bandas. En la figura 3, se muestra los resultados de la comparación de los alérgenos de los tres laboratorios (cabe mencionar que para el Laboratorio Alk-Bello, los extractos de ácaros se concentraron dos veces hasta 30  $\mu$ l y para el Laboratorio Allergomex se solicitó des-albuminar los extractos, los cuales se concentraron cuatro o cinco veces hasta 30  $\mu$ l). Se observa que los alérgenos del Laboratorio Alk-Bello muestran que las bandas características de los alérgenos están muy tenues, mientras que en los alérgenos del Laboratorio Allergomex no se evidencia ninguna banda.

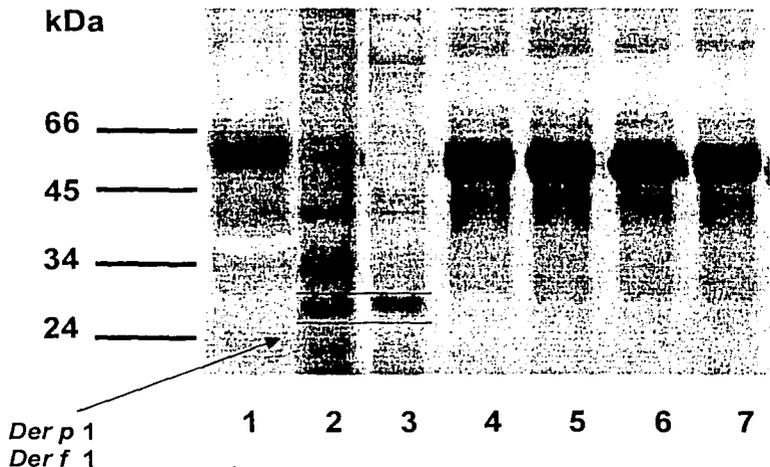


Figura 1; PAGE-SDS al 10%: En el carril 1, una mezcla de proteínas con peso molecular conocido ( $\beta$ -lactoglobulina 18,400 tripsinógeno tratado con PMSF 24,000 pepsina 34,700 ovalbumina 45,000 y albúmina sérica bovina 66,000), la cual se utilizó como referencia; en el carril 2, *Der p*, en el carril 3 *Der f* de laboratorios Greer, en los carriles del 4 al 7; *Der p* y *Der f* por duplicado de Allergomex.

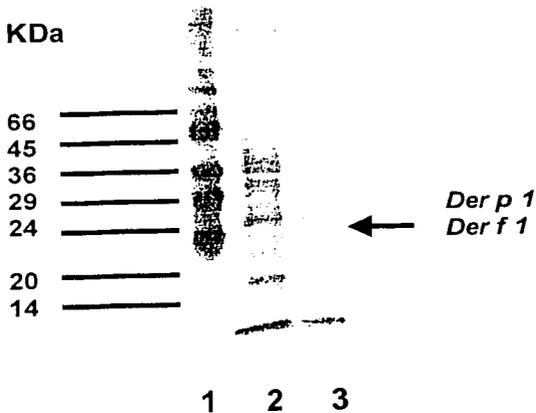


Figura 2; PAGE-SDS al 12.5%: En el carril 1, los marcadores de peso molecular ( $\alpha$ -lactoalbúmina 14,200 inhibidor de tripsina 20,000 tripsinógeno tratado con PMSF 24,000 anhidrasa carbónica 29,000 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 36,000 ovalbúmina 45,000 y albúmina sérica bovina 66,000), en el carril 2 *Der p* y en el carril 3 *Der f*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

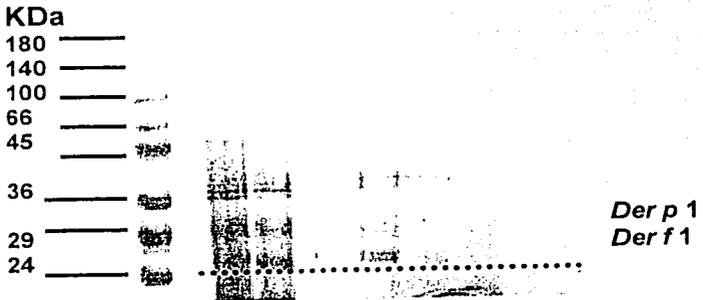


Figura 3; PAGE-SDS al 12.5%: En el carril 1, los marcadores de peso molecular, en el carril 2, *Der p*, en el carril 3, *Der f* (de los Laboratorio Greer); en el carril 4 *Der p*, en el carril 5 *Der f* (de los Laboratorios Alk-Bello); en el carril 6 *Der p*, y en el el carril 7 *Der f* (Laboratorios Allergomex).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Separación de Células T CD4+

Durante la separación de células T CD4+, se obtuvo una pureza del 95 al 98% mediante inmunomagneto-selección evaluada mediante citometría de flujo como muestran las siguientes figuras

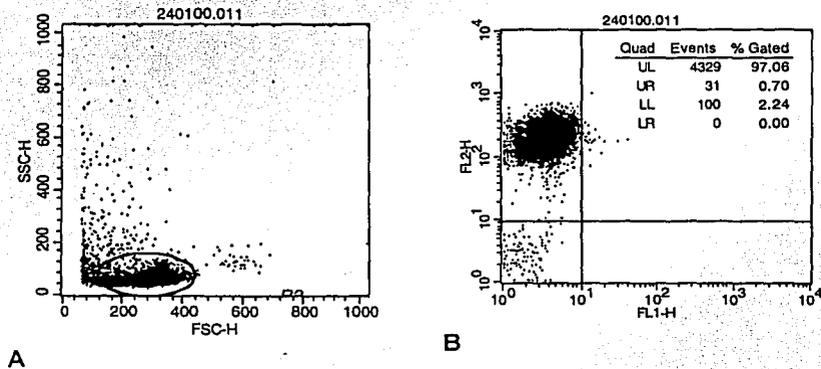
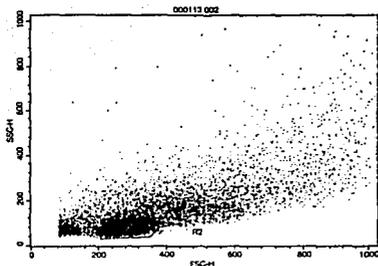


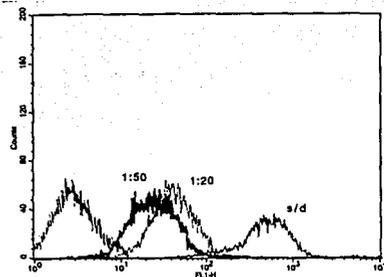
Figura 4: (A) Se observa una gráfica de tamaño contra granularidad, ubicando una región para el análisis para linfocitos. (B) Se observa una gráfica de FL1 contra FL2 dividida en cuadrantes para identificar los células positivas que en este caso están marcadas con PE, que es registrado en FL2.

### Titulación de Anticuerpos.

La mayoría de los anticuerpos utilizados fueron titulados mediante diluciones de 1:5, 1:10, 1:20 y 1:50 para determinar la concentración mas baja (óptima) que muestre una clara separación de las células negativas como se ejemplifica en la figura 5.



A



B

Figura 5: (A) Se observa una gráfica de tamaño contra granularidad, ubicando una región para el análisis de linfocitos. (B) Se observa un histograma de fluorescencia con distintas diluciones, en donde la positividad ideal en la mayoría de los anticuerpos unidos a fluorocromos es considerada entre  $10^1$  y  $10^2$ .

#### Análisis de los marcadores fenotípicos celulares.

En un grupo de 4 pacientes con rinitis alérgica y 4 sujetos sanos, cuyas características clínicas se muestran en el cuadro 1, se analizó la expresión de CD30, CD62L, ALL-R, CD11a, CD28, CD124 y CD152 en células T CD4+, antes y después del reto nasal. Los resultados se resumen en el cuadro 2 y muestran que el reto nasal con el alérgeno en los pacientes con rinitis alérgica no tuvo diferencias en la expresión de dichos marcadores de superficie con respecto al reto con solución salina o sin reto nasal. Con el propósito de analizar la expresión

de citocinas intracelulares y correlacionar con la expresión de CCR3 y CD57 además de los marcadores antes mencionados, se cultivaron las células T CD4+ en presencia de PMA-ionomicina. Para ello se incluyó un grupo de 10 pacientes con rinitis alérgica y 10 sujetos sanos cuyas características clínicas se muestran en el cuadro 3, los cuales fueron retados con solución salina y 24 horas después con el antígeno de ácaro in vivo. Los resultados muestran que las células de los pacientes con rinitis alérgica retados con *Der p* y en cultivo de 24 horas, incrementaron la producción de IL-4 (figura 6) y la expresión de CCR3 (figura 7). Este incremento mostró una correlación con la producción de IL-4, el análisis estadístico mostró una rho de 0.73 con un valor de  $p < 0.01$  (figura 8). La expresión de INF- $\gamma$  en las células de cultivo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con rinitis y sujetos sanos, posterior al reto nasal (figura 9). El resto de marcadores expresados en estas células no mostraron una diferencia estadísticamente significativa y así mismo no tuvieron correlación con IL-4 o con INF- $\gamma$  (figuras 10-13). Aunque, los oligosacáridos de superficie reconocidos por la lectina *Amaranthus leucocarpus* tuvieron mayor expresión en células T CD4+ de cultivo en el grupo de rinitis retados con *Der p*, esta expresión no fue estadísticamente significativa pero mostró una tendencia (figura 14).

Cuadro 1: Características clínicas de pacientes con rinitis y sujetos sanos

	Sanos	Rinitis alérgica
Edad	26.2	21.7
Relación Hombre/Mujer	3:1	2:2
Eosnófilos en sangre periférica (%)	2.1	5.2
Eosnófilos en moco nasal (%)	0	18.7
IgE (UI/L)	10.04	553.2
PC, Der p (mm)	0	19.5
PC, Der f (mm)	0	16.5
ES antes del reto con Salina	2.5	3
ES después del reto con Salina	2.25	2.75
ES antes del reto con ácaros	2.25	3
ES después del reto con ácaros	2.5	12.25

Valores expresados en medias

PC (Pruebas Cutáneas)

ES (Escala de Síntomas)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2: Porcentaje de expresión de las moléculas de superficie en pacientes con rinitis y sujetos sanos, antes y después del reto nasal.

	Antes del Reto Nasal		Después del Reto con salina		Después del Reto con ácido		Valor de P	
	Sanos	Rinitis	Sanos	Rinitis	Sanos	Rinitis	Sanos	Rinitis
CD4								
CD30	*	*	2.2	2.6	1.6	3.4	.405	.098
CD62L	65.8	58.6	70.6	58.9	72.7	57.8	.879	.996
ALL-R	*	*	1.3	*	1.7	*	.427	.744
CD11a	99.5	99.1	97.5	97.9	96.9	96.1	.480	.400
CD28	78.3	86.1	87.1	92.4	95.5	95.2	.119	.366
CD124	*	*	*	*	*	*	.251	.051
CD152	*	*	*	*	*	*	.402	.883

Datos expresados en media, \* porcentaje menor o igual al 1%

Cuadro 3. Características clínicas de los pacientes y sujetos sanos

	Sujetos sanos	Pacientes con rinitis
Edad en años	25.5 +/- 7.15	23.9 +/- 6.11
Sexo (M-F)	4:6	3:7
Eosinófilos SP (%)	1.7 +/- .87	6.2 +/- 1.6
Eosinófilos en moco nasal (%)	0	18.7 +/- 3.8
IgE sérica total (UI/ml)	9.0 +/- 4.3	553.2 +/- 271
ES antes de reto con salina	2.5 +/- .25	3 +/- .5
ES después de reto con Der p	2.25 +/- .5	2.75 +/- .25
ES antes de reto con Der p	2.25 +/- .5	3 +/- .5
ES después de reto con Der p	2.5 +/- .25	14.25
Rinomanometria		
VF antes del reto salina	481.2 +/- 89.7	371 +/- 84.5
RFA después del reto c/salina	.31 +/- .018	.42 +/- 0.29
VF antes del reto c/Der p	480 +/- 74.3	111.6 +/- 47.6
RFA después del reto c/Der p	.31 +/- .016	1.6 +/- .08

Los resultados se expresan en media +/- DS. SP (sangre periférica), ES (escala de síntomas), VF (volumen flujo), RFA (resistencia al flujo aéreo)

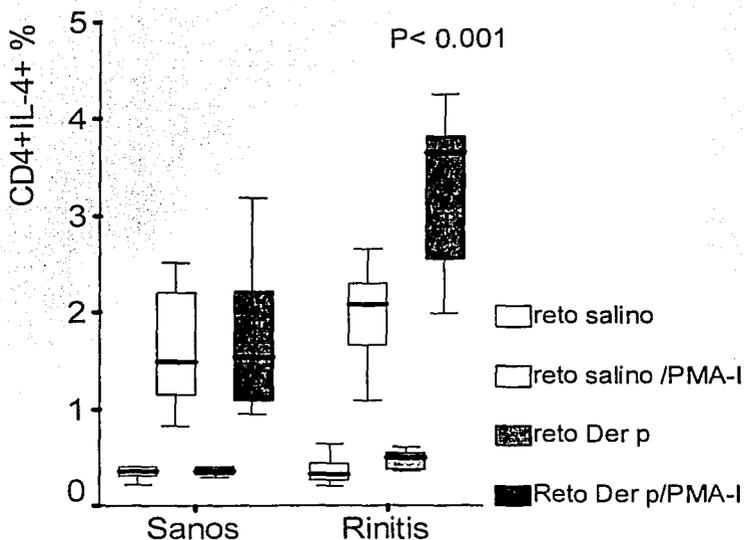


Figura 6: Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. La mayor expresión IL-4 en células T CD4+ se encontró en el grupo de rinitis alérgica posterior al reto nasal con Der p y cultivo con PMA-I, 1.8 veces más que en el grupo rinitis sin cultivo y 2.4 veces más que el grupo de sanos retados con Der p y cultivo con PMA-I.

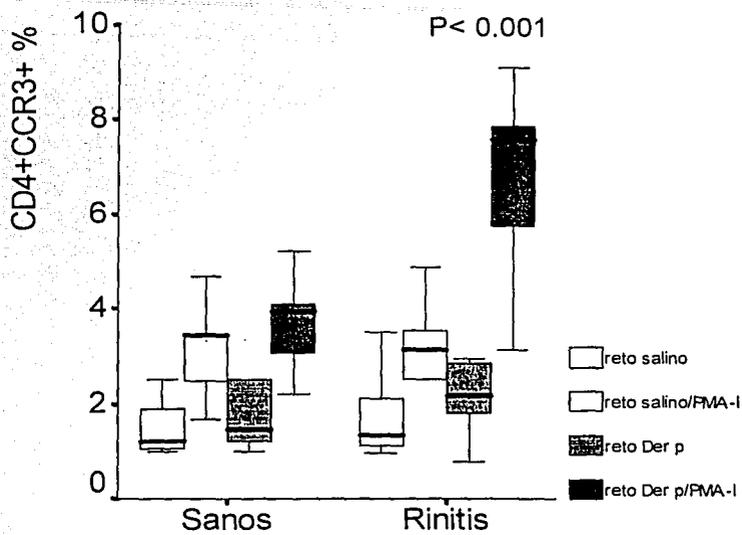


Figura 7: Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. La mayor expresión CCR3 en células T CD4+ se presentó en el grupo de rinitis alérgica posterior al reto nasal con *Der p* y cultivo con PMA-I, 2.4 veces más que en el grupo rinitis sin cultivo y 1.9 veces más que el grupo de sanos retados con *Der p* y cultivo con PMA-I.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CD4+IL4+

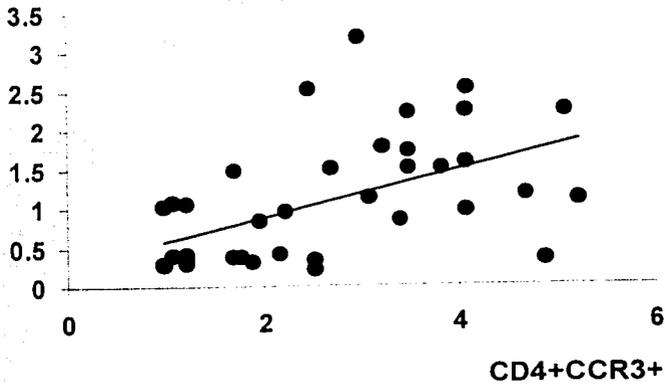


Figura 8: Se observa una gráfica de puntos que muestra una correlación entre las células T CD4+ que expresaron CCR3 y células las T CD4+ que expresaron IL-4 (rho = 0.73, p<0.01)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

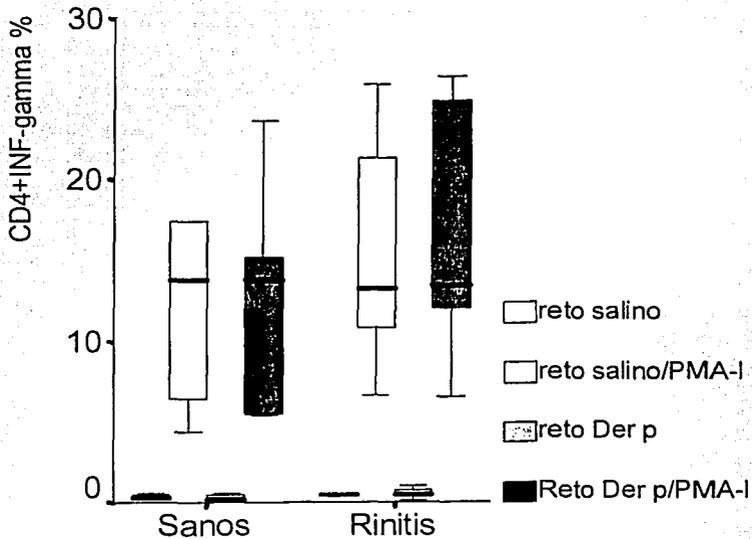


Figura 9. Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. Las células T CD4+ productoras de INF- $\gamma$  no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre sanos y pacientes con rinitis posterior al reto con *Der p* y cultivo con PMA-I.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

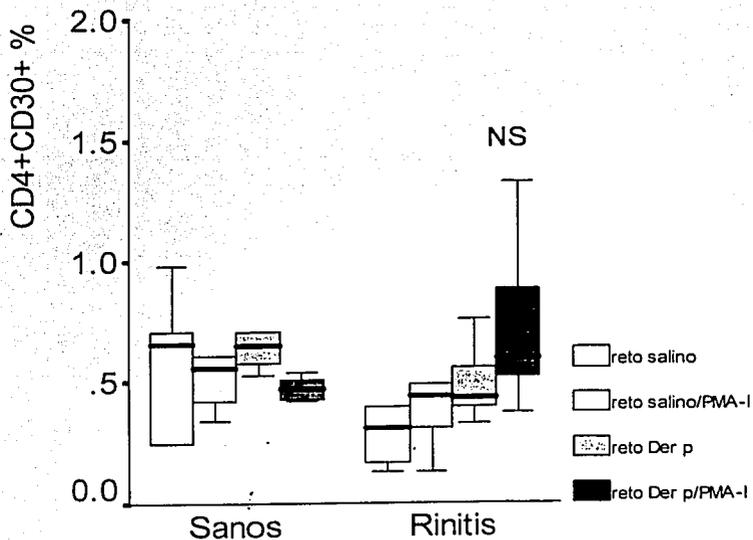


Figura 10. Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. Las células T CD4+ que expresaron CD30+ no mostraron una diferencia estadísticamente significativa (NS) entre sanos y rinitis, el reto con *Der p* y cultivo con PMA-I, sin embargo mostró una tendencia a su incremento en este grupo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

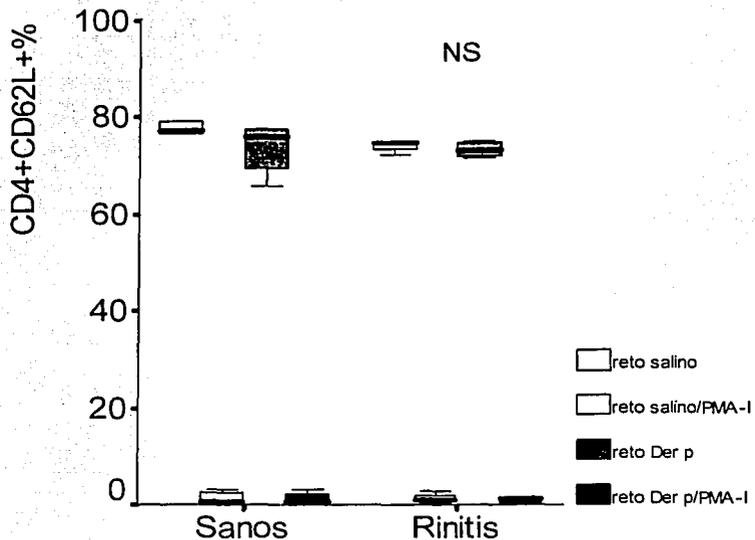


Figura 11. Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. Las células T CD4+ que expresan CD62L+ no mostraron una diferencia estadísticamente significativa (NS) entre sanos y pacientes rinitis, el reto con *Der p* y el cultivo con PMA-I no marcó una diferencia. El principal hallazgo fue que el cultivo con PMA-I, reduce casi totalmente la expresión de este marcador

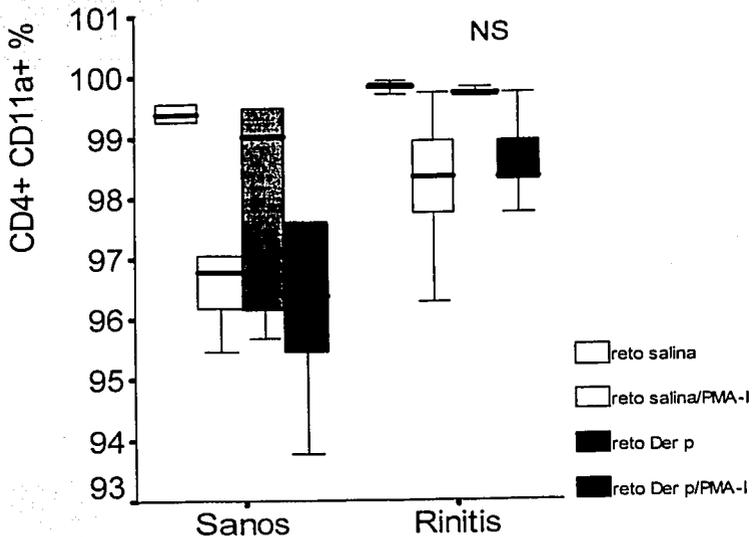


Figura 12. Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. Las células T CD4+ que expresaron CD11a+ no mostraron una diferencia estadísticamente significativa (NS) entre sanos y rinitis, el reto con Der p y el cultivo con PMA-I no marco una diferencia.

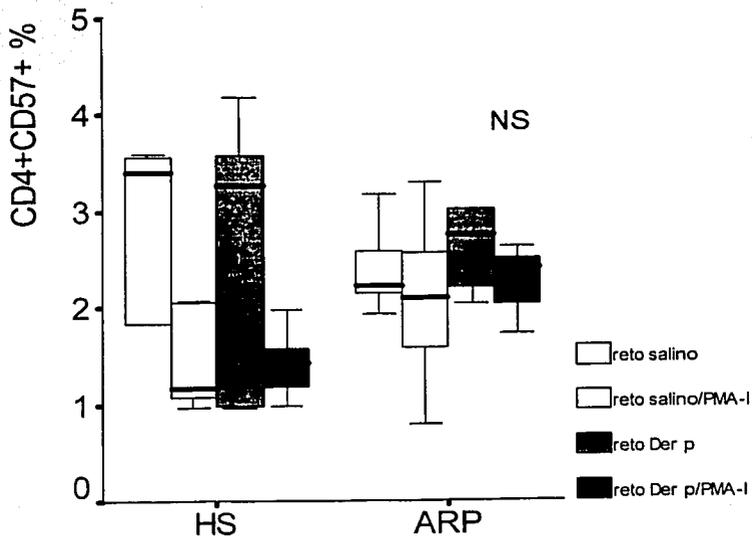


Figura 13: Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. Las células T CD4+ que expresan CD57+ no mostraron una diferencia estadísticamente significativa (NS) entre sanos y rinitis, el reto con Der p y el cultivo con PMA-I no marco una diferencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

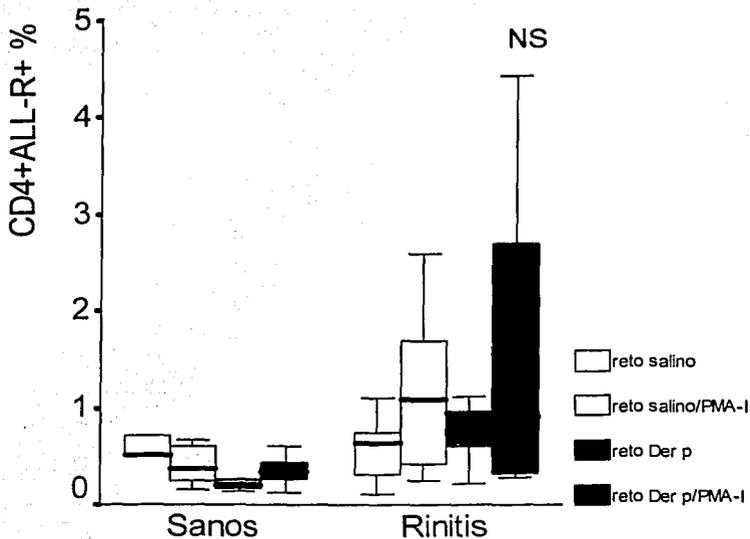


Figura 14. Gráfica que muestra la comparación de células en sanos y pacientes. Las células T CD4+ que expresaron ALL-R no mostraron una diferencia estadísticamente significativa (NS) entre los grupos de sanos y pacientes con rinitis alérgica, la mayor expresión se obtiene en el grupo de rinitis alérgica retados con alérgeno y posterior al cultivo con PMA-Ionicina, mostrando una tendencia.

## Comparación con otras Enfermedades Atópicas

Con la finalidad de comparar la expresión de marcadores fenotípicos en células de pacientes con otras enfermedades atópicas, tanto en condiciones basales como en cultivo de 24 horas. Se incluyó un grupo de 17 pacientes con asma bronquial alérgica y 12 sujetos sanos cuyas características clínicas se muestran en el cuadro 4. Las células T CD4+ de pacientes con asma bronquial mostraron que la expresión de marcadores en condiciones basales no tuvieron diferencias estadísticamente significativas, mientras que en cultivo se incrementó la expresión de IL-4 (figura 15) así como la molécula CD30 (figura 16), CD57 (figura 17) y el oligosacárido reconocido por la lectina de ALL (figura 18). Cabe señalar que CD30 y CD57 mostraron una correlación con la expresión de IL-4 (figuras 19 y 20); el análisis estadístico de la correlación mostró una rho de 0.50 con un valor de  $p < 0.05$  y una rho de 0.70 con un valor de  $p < 0.01$  respectivamente. El resto de marcadores expresados en estas células no mostraron diferencia estadística, asimismo no tuvieron correlación con IL-4 o con INF- $\gamma$  (figuras 21-23).

Cuadro 4: Muestra las características clínicas de los pacientes con asma bronquial y sujetos sanos.

	Sujetos sanos	asmáticos
Número de sujetos	12	17
Edad	9.2 +/- 1.7	8.3 +/- 2.1
Sexo (M/F)	11/6	7/5
IgE total sérica (IU/L)	459.8 $\pm$ 357.3	10.8 $\pm$ 5.9
Eosinófilos en sangre (%)	9 $\pm$ 4.1	2.8 $\pm$ .9
FEV1 (%)	77.4 $\pm$ 7	107 $\pm$ 5.5

Datos expresados en media +/- DS

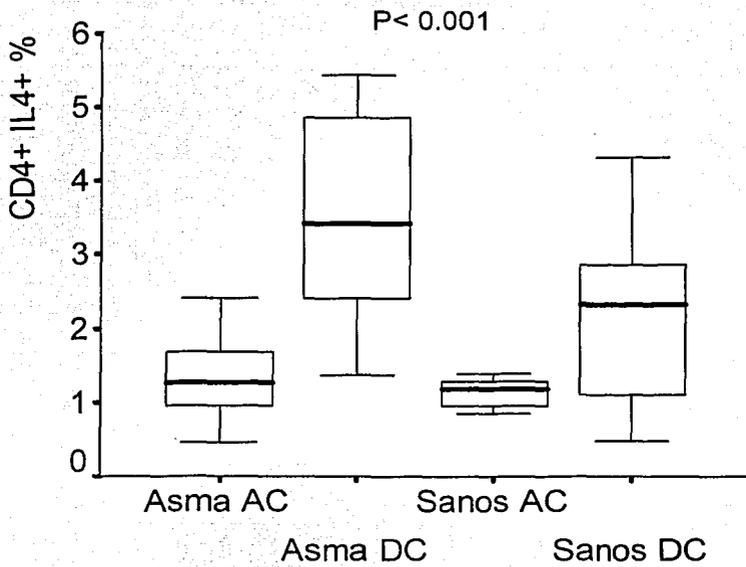


Figura 15. Comparación de la expresión de IL-4 en las células T CD4+ de pacientes con asma bronquial y sujetos sanos antes del cultivo (AC) y después de cultivo (DC) de 24 horas con PMA-I. La mayor expresión se presentó en el grupo de asma, posterior al cultivo; fue 2.8 veces mas que en el grupo de asma antes del cultivo y 1.4 veces mas que el grupo de sujetos sanos después del cultivo.

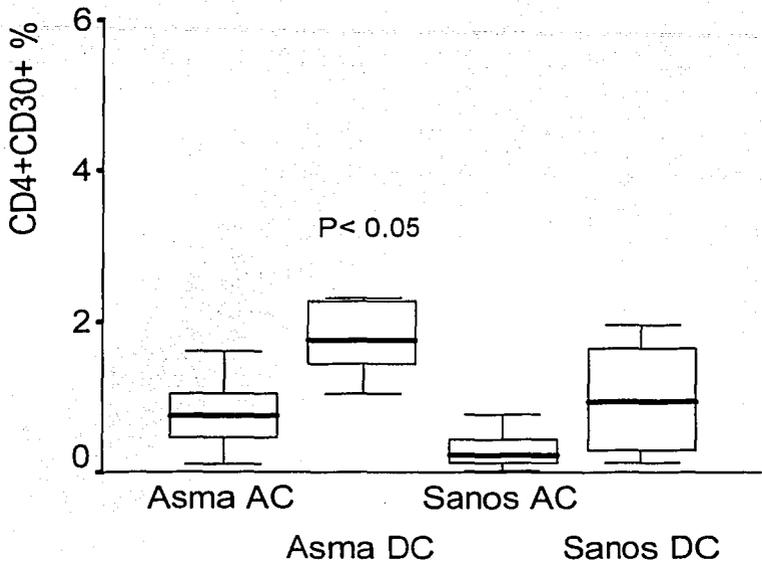


Figura 16. Comparación de la expresión de CD30 en células T CD4+ de pacientes con asma y de sujetos sanos, antes del cultivo (AC) y después del cultivo (DC) de 24 horas con PMA-I. La mayor expresión se presentó en el grupo de asma posterior al cultivo, fue 2.4 veces más que en el grupo asma antes del cultivo y 1.9 veces más que el grupo de sujetos sanos después del cultivo.

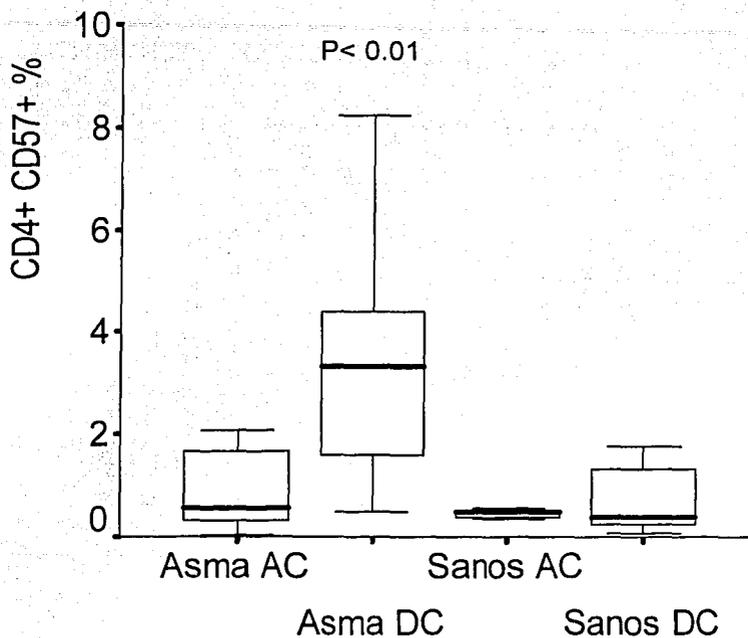


Figura 17. Comparación de la expresión de CD57 en células T CD4+ de pacientes con asma y de sujetos sanos, antes del cultivo (AC) y después del cultivo (DC) de 24 horas con PMA-I. La mayor expresión se presentó en el grupo de asma posterior al cultivo, 6.0 veces mas que en el grupo asma sin cultivo y 4.9 veces mas que el grupo de sujetos sanos con cultivo con PMA-I.

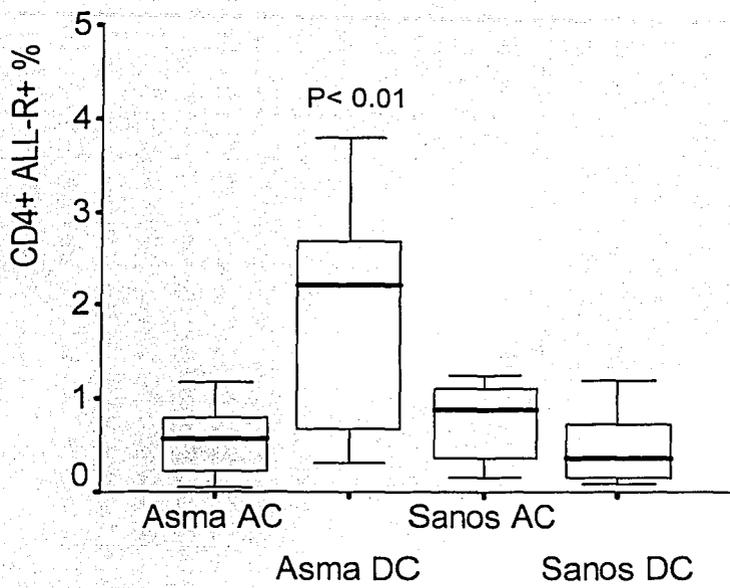


Figura 18. Comparación de la expresión de ALL-R en células T CD4+ de pacientes con asma y de sujetos sanos, antes del cultivo (AC) y después del cultivo (DC) de 24 horas con PMA-I. La mayor expresión se presentó en el grupo de asma posterior al cultivo con PMA-I, 3.8 veces más que en el grupo asma sin cultivo y 4.2 veces mas que el grupo de sanos en cultivo con PMA-I.

CD4+IL-4+

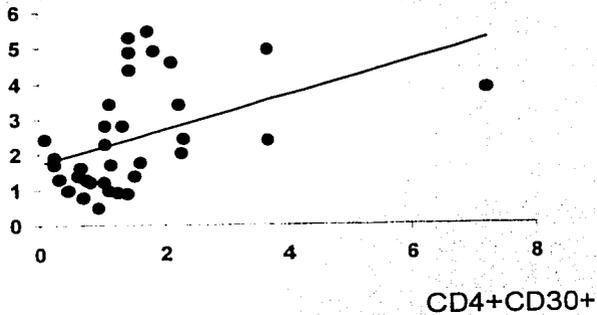


Figura 19. Las células T CD4+ que expresaron CD30, pacientes con asma presentaron una correlación con IL-4 ( $r=0.70$ ,  $p<0.01$ ).

CD4+IL-4+

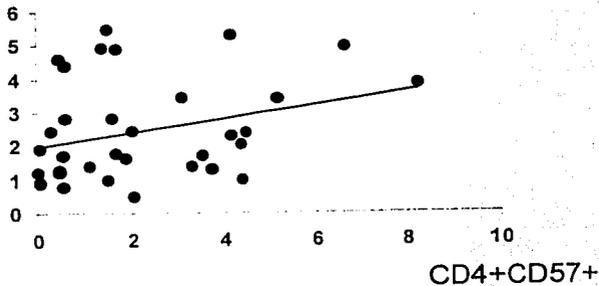


Figura 20. Las células T CD4+ que expresaron CD57, pacientes con asma presentaron una correlación con IL-4 ( $r=0.50$ ,  $p<0.05$ ).

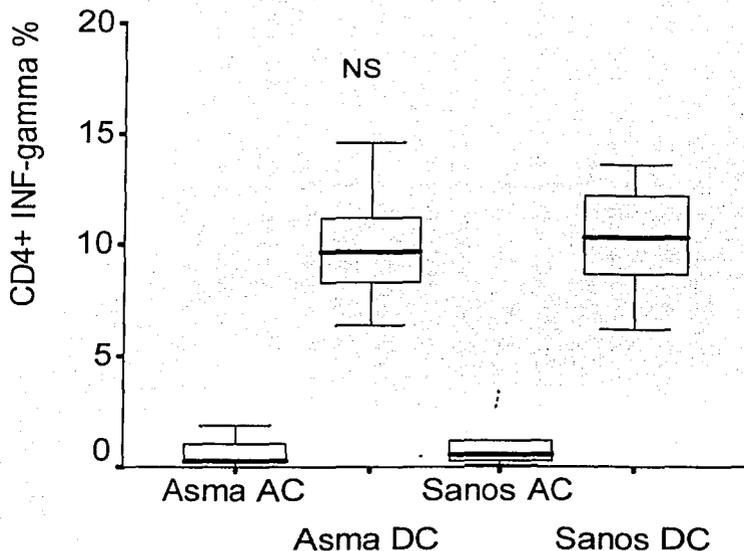


Figura 21. Comparación de la expresión de INF- $\gamma$  en las células T CD4+ de pacientes con asma bronquial y sujetos sanos antes del cultivo (AC) y después de cultivo (DC) de 24 horas con PMA-I, no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre sanos y pacientes con asma en la medición basal y posterior al cultivo con PMA-I.

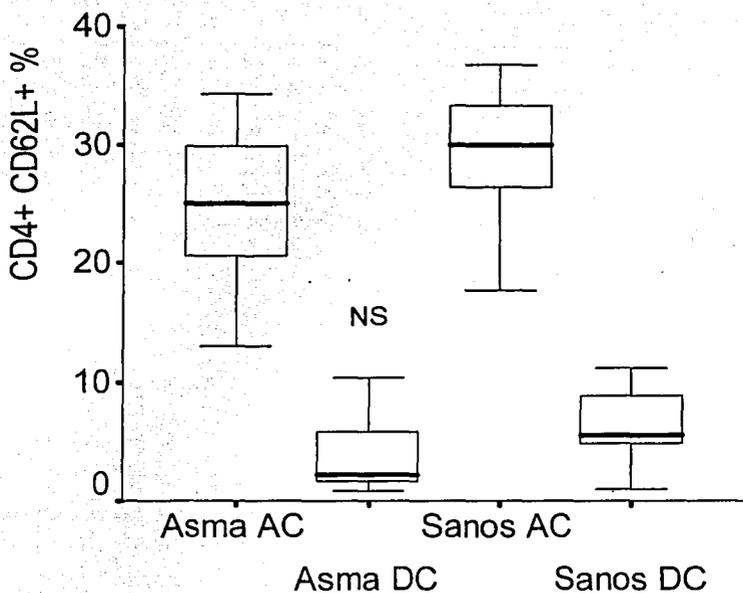


Figura 22. Comparación de la expresión de CD62L en las células T CD4+ de pacientes con asma bronquial y sujetos sanos antes del cultivo (AC) y después de cultivo (DC) de 24 horas con PMA-I, no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre sanos y pacientes con asma en la medición basal y posterior al cultivo con PMA-I.

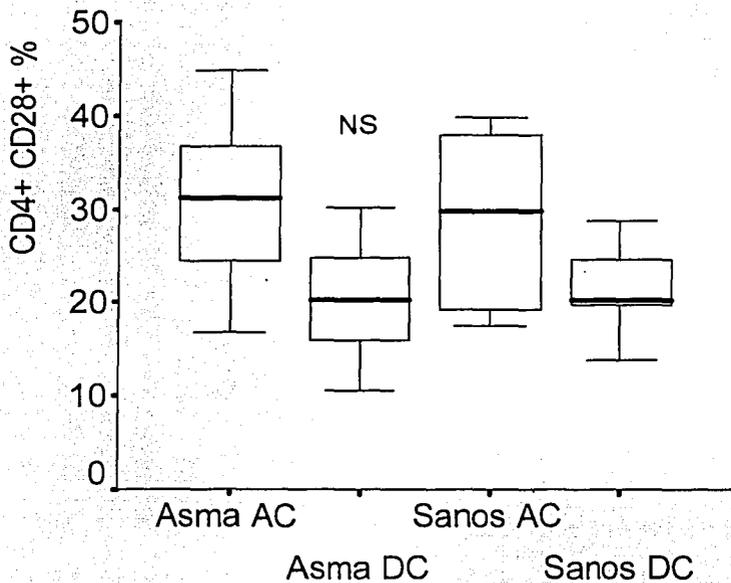


Figura 23. Comparación de la expresión de CD28 en las células T CD4+ de pacientes con asma bronquial y sujetos sanos antes del cultivo (AC) y después de cultivo (DC) de 24 horas con PMA-I, no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre sanos y pacientes con asma en la medición basal y posterior al cultivo con PMA-I.

La correlación de CCR3 y la producción de IL-4 en el cultivo de células T CD4+ de pacientes con rinitis atópica después del reto nasal, nos sugirió determinarlo en pacientes con asma bronquial. El reto bronquial en este grupo de pacientes es cuestionado éticamente, por lo que la alternativa fue el fluido de lavado broncoalveolar. Se realizó determinación de moléculas solubles y principales ligandos de CCR3 ya que la recuperación de células T CD4+ en BAL no son suficientes. Para este análisis, se incluyó un grupo de 10 niños asmáticos y 10 niños sanos cuyas características clínicas se señalan en el cuadro 5. Los resultados mostraron que en el BAL de los pacientes asmáticos tenían mayores concentraciones de RANTES comparados con sujetos sanos (medianas, 1464 vs 108.5 pg/ml) con un valor de  $p < 0.001$ . Las concentraciones de esta citocina fueron 4.2 y 7.7 veces más altas que la concentración de eotaxina-1 o de MCP-4. Las concentraciones de eotaxina-1 y eotaxina-2 fueron más altas en fluido de BAL de los pacientes asmáticos (medianas 347.5 y 432.5 pg/ml, respectivamente) que en los sujetos sanos (medianas 153.0 y 148.5 pg/ml respectivamente) con un valor de  $p < 0.05$ . Las concentraciones de MCP-3 y MCP-4 fueron más altas en fluido de BAL de los pacientes asmáticos (medianas, 224.5 y 188.5, pg/ml, respectivamente) que en aquéllos obtenidos de los sujetos sanos (medianas 168.0 y 135.0 pg/ml respectivamente)  $p < 0.05$  (figura 24).

Cuadro 5. Características clínicas de los pacientes con asma bronquial y sujetos sanos, y características del fluid del BAL y celularidad del mismo.

	<b>Asmáticos</b>	<b>Sujetos sanos</b>
<b>Edad</b>	7.5 (6-10)	7 (6-10)
<b>Sexo H/M</b>	6/4	7/3
<b>Pruebas cutáneas</b>	Positivas	Negativas
<b>IgE (UI/L)</b>	512 (93-1125)	Rango normal
<b>FEV1 (%)</b>	78.5 (65-94)	114 (95-119)
<b>Volumen del BAL (ml)</b>	21.5 (12-30)	28 (16-15)
<b>Cuenta diferencial de células (x 10<sup>3</sup>) en fluido de BAL.</b>		
<b>Células Totales</b>	77 (36-467)	61 (12-112)
<b>Macrófagos</b>	19.5 (5-53)	13 (6-66)
<b>Linfocitos</b>	8.0 (1.5-26)	9 (0-28)
<b>Neutrófilos</b>	2.5 (0-15.9)	5 (0-11)
<b>Eosinófilos</b>	1.5 (1-3.5)	0 (0-2)
<b>Células Epiteliales</b>	32 (8-1439)	27 (7.5-1089)

Datos en mediana y rango.

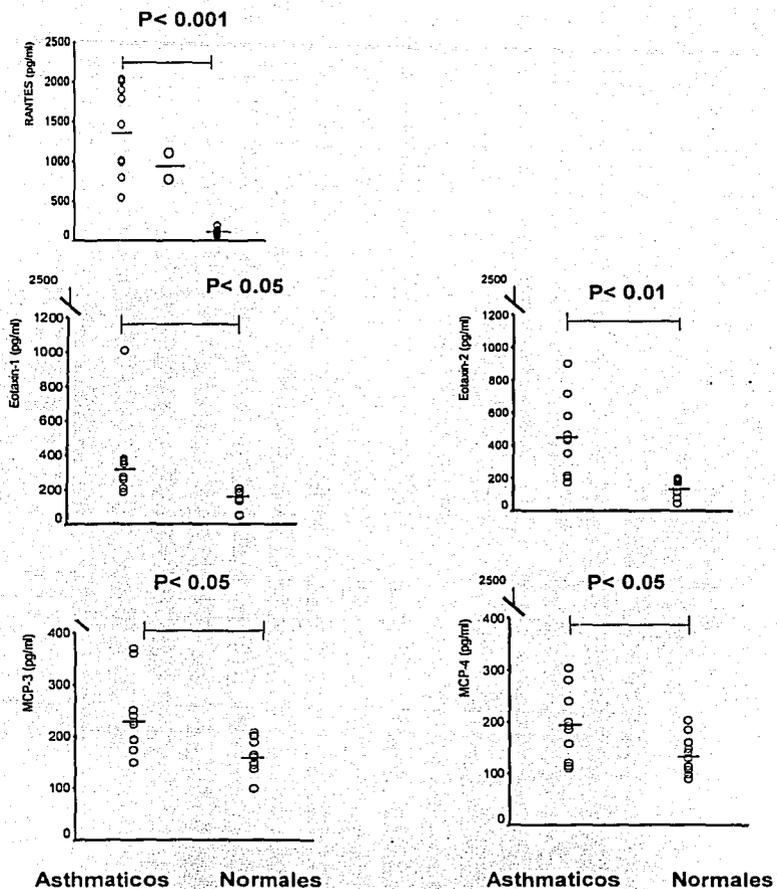


Figura 24. Las gráficas expresan las concentraciones de quimocinas (ng/ml) en fluido de BAL de pacientes asmáticos y sujetos sanos, la barra horizontal representa la mediana, la acotación entre la columna de puntos representa el valor de P. A) RANTES, B) Eotaxina-1, C) Eotaxina-2, D) MCP-3, E) MCP-4

La comparación en la expresión de los marcadores de superficie de células T CD4+ de pacientes con los diversos padecimientos atópicos más frecuentes, cuyas características clínicas se describen en el cuadro 6, mostraron que CD30 y ALL-R tuvieron mayor expresión en pacientes con dermatitis atópica, siendo ésta la más alta con respecto a los otros grupos (figuras 25 y 26). Los resultados de las moléculas expresadas en células T CD4+ procedentes de pacientes con diversos padecimientos atópicos, se resumen en el cuadro 7.

Cuadro 6. Se muestran las características clínicas entre los grupos de pacientes con diferentes padecimientos atópicos y distintos estados de severidad.

	N	Pruebas cutáneas	IgE >300UI/ml	Prueba al parche	Síntomas activos	FEV1*	Edad
Dermatitis Atópica	5	Positivas	Positiva	ND	Positivos	ND	38±12
Dermatitis Contacto	3	Negativas	Negativa	Positiva Niquel	Positivos	ND	40±7
Asma Moderada	5	Positivas	Positiva	ND	Positivos moderados	80-100%	35±10
Asma Severa	5	Positivas	Positiva	ND	Positivos	<60%	34±15
Rinitis no sintomática	4	Positivas	Positiva	ND	Negativos	ND	25±5
Rinitis Sintomática	4	Positivas	Positiva	ND	Positivos	ND	30±3
Sujetos sanos no atópicos	4	Negativas	Negativa	Negativos	Negativos	ND	32±9

ND: No Determinada

Cuadro 7. Porcentaje de moléculas expresadas en células T CD4+ de pacientes con diversos padecimientos atópicos y distintos estados de severidad y sujetos sanos.

	CD30	ALL-R	CD62L
<b>Dermatitis Atópica</b>	22.7±7.8	17.2±8.7	29±6.5
<b>Dermatitis de Contacto</b>	3.0±1.7	4.9±2.2	56±15.5
<b>Asma Moderada</b>	0.9±0.4	0.8±0.2	76±13.3
<b>Asma Severa</b>	3.3±2.3	2.9±1.8	11±7.9
<b>Rinitis no sintomática</b>	0.3±0.3	1.6±1.0	68±8.5
<b>Rinitis asintomática</b>	3.3±2.3	2.2±1.6	30±8.0
<b>No Atópicos</b>	0.2±0.02	1.4±0.7	50±11.5

Datos expresados en media y DS

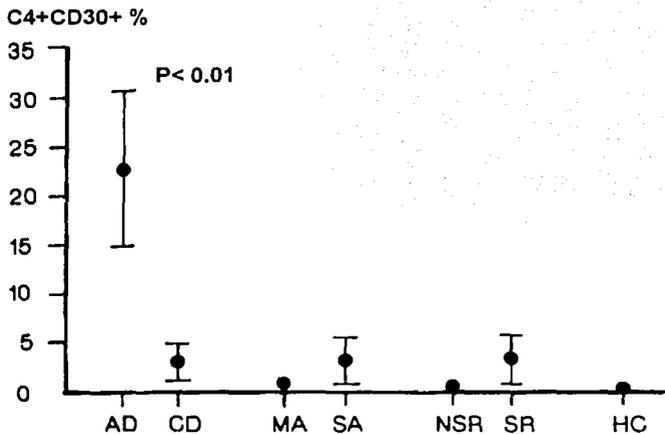


Figura 25. La Comparación de células T CD4+CD30+ entre todos los procesos atópicos; Dermatitis atópica (AD), Dermatitis de contacto (CD), Asma moderada (MA), Asma severa (SA), Rinitis asintomática (NSR), Rinitis sintomática, Sanos (HC), presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ), la mayor expresión se obtuvo en el grupo de pacientes con Dermatitis atópica.

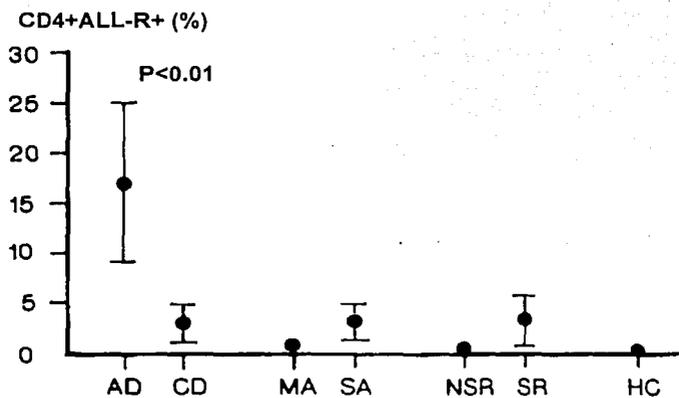


Figura 26. La Comparación de células T CD4+ALL-R+ entre todos los procesos atópicos; Dermatitis atópica (AD), Dermatitis de contacto (CD), Asma moderada (MA), Asma severa (SA), Rinitis asintomática (NSR), Rinitis sintomática, Sanos (HC), presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ), la mayor expresión se obtuvo en el grupo de pacientes con Dermatitis atópica.

## Discusión

Los problemas para el estudio de la atopía, inicialmente se definen por una variabilidad importante en la estandarización de alérgenos tanto para diagnóstico como para cultivo celular, y en el caso de la rinitis alérgica la falta de una clasificación de la severidad de la enfermedad. Algunos autores han sugerido índices o escalas para la evaluación del grado de inflamación nasal, tal es el caso de McHug y cols. (68), quienes propusieron un índice clínico (CI, Clinical Index) que resultó en baja reproducibilidad. Reviki DA y cols (69), propusieron otro índice clínico denominado RSUI (Rhinitis Symptom Utility Index), el cual consiste de 10 preguntas que infieren la severidad y frecuencia de los síntomas, además de utilizar otro parámetro denominado RQLQ (Rhinitis of Quality of Life Questionnaire), los cuales son poco reproducibles (ICC de 0.40). Por otra parte, De Graaf y cols (70) proponen el uso del QOL (Health-related quality of life) obteniendo una correlación de baja a moderada con síntomas nasales ( $r = 0.51$ ). Hasta el momento no existe una escala que cumpla con los requisitos de validación, en el presente estudio desarrollamos nuestra escala y utilizamos la escala de obstrucción nasal por rinomanometría, ya que es la medición más aceptada mundialmente para evaluar inflamación nasal (55,56).

Con respecto a los marcadores de superficie celular relacionados con el fenotipo funcional, en los últimos 2 años han propuesto, por diversos autores, otras moléculas de superficie pueden estar asociadas con células Th1 o Th2 humanas. En estos estudios las moléculas relacionadas con Th1 incluyen al

CD26, LAG-3, CCR5 y al CXCR3, mientras que CD62L, CD30, CCR3, CCR4, CCR8, CXCR4 y otra molécula denominada TRH2, se han relacionado preferentemente con células Th2 humanas. Hasta la fecha no se ha encontrado un marcador específico para las células Th2, en la mayoría de los casos, se han encontrado moléculas más bien asociadas a células Th2 humanas durante ciertas fases en su proceso de diferenciación/activación y en ciertos padecimientos atópicos (71-74). Es importante enfatizar que la distinción entre los subtipos de células Th1 y Th2, ha sido derivada de muchos estudios *in vitro* y/o estudios con clonas predefinidas (19-21,75-77).

Estudios recientes sugieren que los receptores de quimiocinas son los marcadores más relacionados con células Th2. Cosmi y cols. (74) señalan que la combinación de varios de los receptores de quimiocinas puede ser marcadores de células Th2, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos mismos autores (78) en una revisión refieren que CXCR3 no es capaz de discriminar entre células Th1 y Th2; y que CXCR4 no solamente está limitado a células Th2 sino también se expresa en células Th1; y que CCR3 solo fue encontrado ocasionalmente en una pequeña proporción de células Th2 que tuvieron contacto con el alérgeno, sugiriendo una participación efectora, mas que un marcador fenotípico. Con respecto al receptor CCR3, no es exclusivo de células Th ya que también se encuentra en eosinófilos, basófilos y células cebadas (81). Sin embargo, algunos reportes sobre alergia (80) han señalado que este receptor de quimiocinas CCR3 inicia la respuesta aguda eosinofílica y la expresión de un gene denominado "Th2". Estos datos sugieren que las quimiocinas relacionadas con el tipo Th2, directa o indirectamente pueden

contribuir a infiltración celular con cambios tisulares irreversibles (remodelación) de la vía aérea en el asma bronquial (79-81). Además, la quimiocina derivada del macrófago (MCD) producida por células Th2 y por células dendríticas interactúa con sus mismos receptores CCR4 de manera dependiente de IL-4 e IL-13, lo cual puede resultar en otro mecanismo de amplificación para la inflamación alérgica (78,82). Esto también ha sido encontrado por otros autores, con las quimiocinas MCD y TARC al sobreexpresarse su receptor CCR4 en células Th2 (83-85). Los reportes anteriores contribuyen a la idea de que el reclutamiento de subtipos celulares Th2 por las quimiocinas mencionadas, es un mecanismo dinámico y regulado temporalmente en los procesos que involucran la producción de citocinas tipo Th2. El mecanismo concuerda con la trans migración endotelial donde la eotaxina tiene un potente efecto como quimioatrayente de células Th2 mostrando así un papel fundamental en el proceso inflamatorio alérgico (86,87). Berin y cols (88), encontraron un incremento significativo de los niveles de la quimiocina TARC en lavado broncoalveolar de pacientes con asma bronquial alérgica, cuyo ligando es CCR4 el cual fue detectado mediante el RNAm en células Th2 del mismo fluido del BAL. Por otra parte, en una comparación de las células que expresaban receptores de quimiocinas; las células Th2 que expresaban CCR4 fueron consistentemente detectadas en circulación sanguínea de sujetos sanos, mientras que las células que expresaban CCR3 fueron detectadas en menor proporción y la molécula "CRTH2" expresada en células T correspondió a células Th2 o Tc2, pero no a células Th0 o Tc0 (74). Finalmente, los autores propusieron tras incluir padecimientos como dermatitis atópica y pacientes infectados con VIH, que el "CRTH2" es el marcador más confiable para la detección de células Th2 (74).

Cabe señalar que el mecanismo de reclutamiento de células T en el tejido inflamado es comprendido vagamente, se ha sugerido que la quimiotaxis de subtipos celulares Th se genera por las quimiocinas y éstas a su vez por el tipo de alérgeno (89). Sin embargo, en esta compleja regulación de la quimiotaxis preferencial de células Th1 o Th2 depende de una extravasación potencial que a su vez constituye un aspecto crítico de estos subtipos celulares para el "homing", a través de señales desconocidas de tráfico celular (90). Con respecto a los factores responsables de la polarización de la respuesta inmunitaria hacia la respuesta Th1 o la Th2 se sugiere, en primer término que las células Th1 y Th2 no son derivadas de distintos linajes celulares sino que pueden derivarse del mismo precursor Th, bajo la influencia de factores genéticos y de factores medioambientales (91-92). En relación a los factores genéticos, recientemente se ha mapeado la localización cromosómica de genes involucrados en la susceptibilidad del asma: McIntire y cols (93), comparando la homología entre el genoma humano y el murino, encontraron en el cromosoma humano 5, un locus de susceptibilidad para el asma bronquial y dentro de la región denominada Tarp, encontraron la susceptibilidad a la producción de citocinas Th2. En la clonación de esta región los autores encontraron una familia de genes denominada TIM, que son glicoproteínas de superficie celular que pueden conferir susceptibilidad a desarrollar hiperreactividad bronquial mediada por células Th2, desconociéndose las vías de regulación (94). Nuestros datos son el primer reporte de una correlación entre la expresión de CCR3 y la producción de IL-4 en células T CD4+ estimuladas provenientes de pacientes con rinitis alérgica después del reto nasal con el alérgeno específico. En este trabajo, confirmamos que el reto con el antígeno de ácaro tiene una

repercusión en sangre periférica, ya que las células T cooperadoras en cultivo incrementaron la expresión del marcador CCR3, sugiriendo que esta proporción de células es la que reconoce al antígeno de *Der p*, lo cual implica una participación importante en el proceso inflamatorio alérgico. Asimismo, el hallazgo de elevada concentración de los principales ligandos de CCR3 en el lavado broncoalveolar de los pacientes con asma bronquial sugiere fuertemente que un porcentaje importante de las células T CD4+ de estos pacientes también expresen CCR3. Aunque en este caso, se tendrá que estimular *in vitro* con el antígeno *Der p* a las células T CD4+ de circulación sanguínea para que expresen CCR3 sin tener que realizar un reto bronquial. Refiriéndonos a los reportes que se han mencionado, es posible que la expresión de CCR3 que observamos en las células T CD4+ en estos procesos atópicos esté señalando una participación celular efectora, lo cual nos puede servir como un marcador del proceso atópico de activación celular tanto en la rinitis atópica como en el asma bronquial.

Por otro lado, a pesar de que CD30 fue la primera molécula que se reportó que estaba asociada con células Th2, su función aún no ha sido dilucidada, se sabe que es un antígeno de superficie de 120 kDa que pertenece al receptor de la familia de los TNF y que participa regulando la diferenciación y sobrevivencia del linfocito T (95). La relación de CD30 con células Th2 ha surgido de estudios realizados en padecimientos atópicos (96-99) en donde se demostró un incremento de la molécula pero en forma soluble, lo cual correlacionó con la actividad del padecimiento atópico. Esto se ha asociado más a padecimientos alérgicos con manifestación dermatológica que a padecimientos alérgicos con

manifestación respiratoria. Sin embargo, Yamamoto y cols. (100) demuestran un incremento en la expresión de esta molécula en la superficie de células T CD4+ de pacientes con dermatitis atópica. Otros estudios son contradictorios, por ejemplo, Petkova y cols. (101) comparando la expresión de CD30 en células recuperadas del lavado broncoalveolar de un grupo de pacientes con diversos padecimientos pulmonares (no incluyeron el asma bronquial), no encuentran la expresión de CD30 en células Th productoras de IL-4 en el padecimiento pulmonar intersticial, representativo según los autores, de una respuesta inmunitaria Th2, y Biswas y cols. (102) en un estudio parecido encuentran que las células T CD4+ que producen IL-4 son células T $\gamma\delta$  antígeno específicas. Diversos autores (103-105) sugieren que la expresión de CD30 se encuentra en células T y B activadas, aunque su función no es esclarecida, sugieren también que las señales celulares que involucran al CD30 pueden incrementar la susceptibilidad a sufrir apoptosis en las células efectoras. Entre estas señales celulares se encuentran las moléculas como el ligando de Fas (FasL), la caspasa 8, las perforinas, la granzima B y los dominios de muerte asociado a TNF (TRAD) y asociado a Fas (FADD). Otras señales celulares relacionadas con CD30 incluyen a la molécula c-myc, la cual regula la proliferación celular y la expresión de FasL y de CCR7, sugiriendo un papel importante del CD30 en el proceso de "homing" y apoptosis de linfocitos a los ganglios linfáticos (103-105). Nuestros resultados muestran que las células T CD4+ de pacientes con asma bronquial alérgica, tienen un incremento significativo en la expresión de CD30 después de estimular durante 24 horas con PMA-I, y en esas condiciones correlacionó con la producción de IL-4. Además un dato

interesante surgió cuando se comparó la expresión de CD30 en células Th (sin estimular) de circulación sanguínea de un grupo de pacientes con diversos padecimientos atópicos (sin reto antigénico), solamente las células de los pacientes con dermatitis atópica mostraron un porcentaje muy importante en la expresión de CD30. El hecho de que la expresión de CD30 esté relacionada con la apoptosis y con la migración selectiva hacia los ganglios linfáticos sugiere que en los procesos alérgicos locales como la dermatitis atópica, las células T CD4+ productoras de IL-4 se encuentran activadas y posiblemente en proceso de apoptosis, lo cual sería un mecanismo de eliminación de células Th2 para compensar la polarización funcional de la respuesta inmunitaria.

Otro de los hallazgos de nuestro estudio fue la expresión de la molécula CD57 en células T CD4+ de pacientes con asma bronquial. Se ha sugerido que las células T CD4+CD57+ son equivalentes a las células NK 1.1 murinas, se sabe que estas células producen grandes cantidades de IL-4 y que la expresión de CD57 parece estar asociada con procesos de donde hay exposición prolongada de antígenos (106). Nuestros resultados en los pacientes con asma bronquial muestran que el porcentaje de los linfocitos T CD4+CD57+ y la producción de IL-4 aumentó significativamente después de estimular en cultivo. El asma bronquial es un proceso atópico de tipo sistémico y los pacientes no fueron retados antigénicamente, lo cual sugiere que la molécula CD57 está relacionada con la activación de células productoras de IL-4 en esta atopía. Es posible que esta molécula sea un marcador para evaluar la cronicidad del asma bronquial.

Con respecto al oligosacárido reconocido por la lectina ALL, se encontró una mayor expresión en el análisis de células T CD4+ de pacientes con atopía dermatológica y en las células de pacientes con asma bronquial después del cultivo con PMA-Ionomicina. Estos hallazgos sugieren que la expresión de la O-glicoproteína de células T CD4+ reconocida por la lectina *Amaranthus leucocarpus* depende del tipo de enfermedad alérgica, de la activación y diferenciación celular.

El o los marcadores fenotípicos de las células Th2, parecen estar influenciados por factores complejos que involucran el tipo de padecimiento alérgico y su estado de severidad, el grupo de familias se ha reducido y parece orientarse a la familia de los receptores de quimiocinas fundamentalmente y a la superfamilia de TNF. CCR3 y CD30 resultaron en adecuado reconocimiento de subpoblaciones de células T cooperadoras. El porcentaje de células T CD4+ con producción de IL-4 tienen una expresión baja menor al 2% (en promedio), lo que dificulta el estudio in vivo, de subtipos celulares, sin embargo, esta pequeña proporción de células son capaces de desencadenar procesos alérgicos importantes.

La lectina de *Amaranthus leucocarpus*, reconoce a la molécula N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) en la estructura Gal beta1,3GalNAc, se encuentra en una glicoproteína de 70 kDa linfocitos T humanos como, si bien no resulto ser específica de células tipo Th2, encontramos que los oligosacáridos reconocidos por lectinas ofrecen nuevas herramientas de estudio para clasificación fenotípica,

funcional y de activación celular. Así mismo, pone a consideración nuevas propuestas en la fisiopatología de la enfermedad alérgica.

Los datos de este trabajo sugieren que los posibles marcadores fenotípicos de las células Th2, se encuentran influenciados por factores complejos que involucran el tipo de padecimiento alérgico y su estado de severidad, y que estos marcadores están relacionados fundamentalmente con la familia de los receptores de quimiocinas y con la familia de receptores para TNF. Por ejemplo, CCR3 y CD30 se expresaron en subpoblaciones de células T cooperadoras durante la activación *in vitro*, aunque también CD30 se expresó en un mayor porcentaje celular en el estado basal de la dermatitis atópica. Por lo tanto, es importante re-plantear la fisiopatología de las enfermedades alérgicas, si bien la participación de células tipo Th2 es común a ellas, se evidencian distintos mecanismos celulares en número o en función celular, según las manifestaciones dermatológicas, respiratorias o tal vez digestivas. Asimismo, el concepto del paradigma Th1- Th2, en humanos debe ser discutido nuevamente en términos de estudios *in vivo* mediante el reto antigénico ya que los padecimientos atópicos no pueden ser todos encasillados como una exageración de la respuesta inmunitaria Th2 y se debe de particularizar cada padecimiento alérgico para un mejor entendimiento de su fisiopatología. En resumen, los padecimientos atópicos están sujetos a la variabilidad genética de los individuos la cual confiere la susceptibilidad a desarrollar un estado alérgico mediado por células Th2, por otra parte, en estos individuos los mecanismos de regulación inmunitaria pueden aumentar la susceptibilidad de las células T a las señales apoptóticas mediadas

por factores relacionados con TNF, mientras que simultáneamente el reclutamiento de las diferentes subpoblaciones celulares en el tejido afectado estaría temporalmente regulado por la producción dinámica de algunas quimiocinas y sus receptores. Nuestros datos sugieren, al igual que los estudios que ya comentamos, que no hay un marcador universal para las células Th2 sino que los marcadores relacionados con estas células dependen del tipo de padecimiento atópico y severidad del mismo. Podemos concluir que la expresión de CCR3 en rinitis atópica; CD30 y CD57 en asma bronquial; así como CD30 y ALL-R en dermatitis atópica podrían tener importancia como marcadores particulares de estas enfermedades atópicas y podrían utilizarse como parámetros moleculares en el diagnóstico, pronóstico y sobretodo en la terapéutica, puesto que sabiendo el *status* de la enfermedad podemos hacer un uso racional del arsenal terapéutico para una población alérgica cada vez mas creciente.

## Conclusiones

1. Existió una correlación en el aumento de células que expresan CCR3 con la producción de IL-4 en células T CD4+, estimuladas *in vitro* provenientes de circulación sanguínea de pacientes con rinitis alérgica y con reto nasal alérgico específico.
2. Existió alta producción de las principales quimiocinas para CCR3 en el fluido del lavado broncoalveolar de pacientes con asma bronquial.
3. Se identificó una correlación en el aumento de células que expresan CD30 o CD57 con la producción de IL-4 en células T CD4+ estimuladas *in vitro* provenientes de circulación sanguínea de pacientes con asma bronquial pero sin reto con el alérgico específico.
4. Se observó un aumento en el porcentaje de células que expresan ALL-R después de estimular *in vitro* a las células T CD4+ provenientes de circulación sanguínea de pacientes con asma bronquial pero sin reto con el alérgico específico.
5. Se observó un alto porcentaje de células que expresan CD30 o ALL-R en la población de células T CD4+, sin estimular provenientes de circulación sanguínea de pacientes con dermatitis atópica sin haber sido retados con el alérgico específico.

## Agradecimientos:

### Profesores:

Dr. Julio E. Sotelo, Dr. Julio Granados, Dr. Rogelio Hernández, Dr. A. Edgar Zenteno, Dr. Ricardo Lascurain, Luis M. Terán.

### Colaboradores:

Dra. Norma Martínez, Dr. Alfredo Reyes, Dr. Yonathan Garfias, Dra. Maricarmen Jiménez y Dr. Francisco Cuevas.

### Instituciones:

UNAM, INNN, INER, ISSSTE e INP.

Esta tesis fue financiada con el proyecto de CONACYT 34814-M

## REFERENCIAS

1. Hjern A, Haglund B, Hedlin G. Ethnicity, childhood environment and atopic disorder. *Clin Exp Allergy* 2000;30:521-528.
2. Virant SF. Allergic Rhinitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2000;2:265-282.
3. Woolcock AJ, Peat JK. Evidence for the increase in asthma world wide. *Ciba Found Symp* 1997;206:122-134.
4. Shamissain MH, Shamsian N. Prevalence and severity of asthma, rhinitis, and atopic eczema in 13 to 14 year old schoolchildren from the northeast of England. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:428-432.
5. Hessel PA, Klaver J, Michaelchuck D, McGhan S, Carson MM, Melvin D. The epidemiology in childhood asthma in red deer and medicine hat, Alberta. *Can Respir J* 2001;8:139-146.
6. McNally N, Phillips DR, Williams HC. The problem of atopic eczema: aetiological clues from the environmental and lifestyles. *Soc Eci Med* 1998;46:729-741.
7. Romagnani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 1990;11:316-319
8. Vercelli D, Geha RS. Regulation of IgE synthesis in humans: a tale of Two signals. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:285-291.
9. del Prete GF, Maggi E, Parrochi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, de Vries J, Romagnani S. IL-4 is an essential factor for the

- IgE synthesis induced *in vitro* by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988;140:4193-4197.
10. Pene JF, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai KI, Banchereau J, de Vries J. IgE Production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferon- $\gamma$  and a prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6880-6886.
  11. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: synergism between anti CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J Exp Med* 1990; 172:1861-1866.
  12. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, de Vries JE. Structure and expression of germline transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J Exp Med* 1990;172:463-466.
  13. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie ANJ, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3730-3735.
  14. Parronchi P, Tiri A, Macchia D, De Carli M, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Del Prete GF, Ricci M, Romagnani S. Noncognate contact-dependent B cells activation can promote IL-4 dependent *in vitro* human IgE synthesis. *J Immunol* 1990;144:2102-2109.

15. Vercelli D, Jabara HH, Arai K, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC Class II antigens. *J Exp Med* 1989;169:1295-1299.
16. Kay AB, Yin S, Varney V, Gaga M, Durham SR, Moqbel R, Wardlaw AJ, Hamid Q. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3, IL-4, IL-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 1991;173:775-779.
17. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definitions according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2352.
18. del Prete GF, Tiri A, De Carli M, Macchia D, Parronchi P, Rossi ME, Pietrogrande MC, Ricci M, Romagnani S. Defective *in vitro* production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha by circulating T cells from patients with hyper-IgE syndrome. *J Clin Invest* 1989;84:1830-1834.
19. Romagnani S, del Prete GF, Maggi E, Parronchi P, Tiri A, Macchia D, Giudizi MG, Almerigogna F, Ricci M. Role of interleukins in induction and regulation of human IgE synthesis. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;50:13-19.
20. del Prete GF, De Carli M, D'Elia MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabri L, Romagnani S. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergy respiratory disorders. *Eur J Immunol* 1993;23:1445-1449.

21. Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Waedlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffrey PK, Quint DJ, Kay AB. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1991;87:1541-1546.
22. Maggi E, Biswas P, Del Prete GF, Parronchi P, Macchia D, Simonelli C, Emmi L, De Carli M, Tiri A, Ricci M, Romagnani S. Accumulation of Th2 like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J Immunol* 1991;146:1169-1172.
23. van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4 producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991;97:389-394.
24. Kleijjan A, Dijkstra M, Boks S, Severijnen L, Mulder P, Fokkens W. Increased IL-8, IL-10, IL-13 and RANTES mRNA levels (in Situ hybridization in the nasal mucosa after allergen provocation) *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:441-450.
25. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tscipulus A, Barkan J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-302.
26. Romagnani S. Human Th1 and Th2: Doubt no more. *Immunol Today* 1991;12:256-259.
27. Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete GF, Ricci M, Romagnani S. Aberrant interleukin (IL-4) and IL-5 production in vitro by CD4+ helper T cells from atopic subjects. *Eur J Immunol* 1992;22:1615-1619.

28. Seder R, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St. Grouth B. The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential CD4+ T cells from T-cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176:1091.
29. Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family which is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 1992;68:1128-1132.
30. Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Calgariis-Cappio F, Pizzolo G. CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol* 1995;57:726-730.
31. Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Piccini MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete GF, Ricci M, Romagnani S. Aberrant interleukin (IL)-4 and IL-5 production *in vitro* by Cd4+ helper T cells from atopic subjects. *Eur J Immunol* 1993;22:1615-1619.
32. Del prete GF, De carli M, Almerigogna F, Daniel CK, D'Ellos MM, Zancuoghi G, Vinante F, Pizzolo G, Romagnani S. Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2 type cytokines. *FASEB J* 1995;9:81-86.
33. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccini MP, Santoni-Rugiu F, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory role of INF- $\gamma$  and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1992;148:2142-2146.

34. Leonard C, Tormey V, Faul J, Burke CM, Poulter LW. Allergen-induced CD30 expression on T cells of atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:780-786.
35. Pretkova D, Xaubet A, Picado C, Fillela X, Agusti C, Luburich P, Rodriguez-Roisin R. Evaluation of CD30 as a marker for Th2 lymphocytes in bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Respir Med* 2000;94:345-349.
36. Dummer W, Rose C, Brocker EB. Expression of CD30 on T helper cells in the inflammatory infiltrate of acute atopic dermatitis but not of allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1998;290:598-602.
37. Nakamura T, Lee RK, Nam SY, Al-Ramadi BK, Bottomly K, Podak ER, Flavell RA. Reciprocal regulation of CD30 expression on CD4+ T cells by IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol* 1997;158:2090-2098.
38. Kanegane HY, Kasahara Y, Niida Y, Yachie A, Suggi S, Takatsu K, Taniguchi N, Miyawaki T. Expression of L-selectin (CD62L) discriminates Th1- and Th2-like cytokine-producing memory CD4+ T cells. *Immunology* 1996;87:186-190.
39. Yammashita H, Tanno Y. Expression of L-selectin on peripheral memory CD4+ T cells in atopic diseases. *Arerugi* 1998;47:1168-1175.
40. Mitra DK, De Rosa SC, Luke A, Balamurugan A, Khaitan BK, Tung J, Mehra NK, Terr AI, O'Garra A, Herzenberg LA, Roederer M. Differential representations of memory T cell subsets are characteristic of polarized immunity in leprosy and atopic diseases. *Int Immunol* 1999;11:1801-1810.

41. Gerber GO, Zanni M, Uguccioni M, Mackay CR, Pichler WJ, Yawalkar N, Baggiolini M, Moser B. Functional expression of eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Current Biology* 1997;7:836-843.
42. Alencar NM, Teixeira EH, Assreyu AM, Cavada BS, Flores CA, Ribeiro RA. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators Inflamm* 1999;8:107-113.
43. Wrigth CS. Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1987;194:501-529
44. Ortiz B, Bacilio M, Gorocica M, Montaña LF, Garfias Y, Zenteno E. The hydrophobic character of peanut (*Arachis Hypogaea*) isoagglutinins. *J Agric Food Chem* 1999;29:219-234.
45. Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vázquez L, Debray H & Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J* 1992;9:204.
46. Hernández P, Bacilio M, Porras F, Juárez S, Debray H, Zenteno E, Ortiz B. A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus syn hypocondriacus lectin*. *Prep Biochem Biotech* 1999;29:219-234
47. Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. Aislamiento de una población tipo Th2 aglutinados en la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. Manuscrito en preparación.
48. WHO Facts sheet 206. Revised January 2001. <http://www.who.int/inf-fs/fact206.html>
49. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.

50. Laemli. Clearance of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 1970;227:688-693.
51. Switzer RC, Cerril CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Annals Biochem* 1979;98:231-237.
52. Lavins GJ, Dolen KW, Nelson SN. Use of standardized and conventional allergen extracts in prick skin testing *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:658-664.
53. Kelso JM. Skin test results in related and unrelated persons with allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:43-46.
54. de Weck AL, Derer T. Critical evaluation of the use of skin test and cellular test in standardization of allergens. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 1994;87:89-114.
55. Bachart C, Mannheim C. The determination of the nasal resistance via active anterior rhinomanometry. *Allergology* 1990;2:56-59.
56. Bachart C, Mannheim C. Guidelines for carrying out nasal provocation test with allergens for diseases of upper respiratory tract. *Allergology* 1990;2:53-55.
57. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by ATS board of directors, November 1986. *Am Rev respire Dis* 1987;136:225-244.
58. Grimfeld A. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in childhood asthma. When and what for?. *Pediatric Pulmolol* 1997;16:s92-s93.

59. Shields DM, Riedler J. Bronchoalveolar lavage and tracheal Aspirate for Assessing inflammation in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:s15-s17.
60. Labenne M, Poyart C, Rambaud C, Goldfarb B, Pron B, Jouvet P, Delamare C, Sebag G, Hubert P. Blind protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in ventilated children. *Crit Care Med* 1999;27:2537-2543.
61. Ratjen F. Reference values for bronchoalveolar lavage in children. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000;55:247-250.
62. Charman C. Atopic eczema. *BMJ* 1999;318:1600-1604
63. Friedmann PS. Allergy and the skin. II-Contact and atopic eczema. *BMJ* 1998;316:1226-1231.
64. Zenteno E, Ochoa JL. Isolation and purification of amaranthus leucocarpus lectin on stroma colum. *Phytochemistry* 1988;27:313-317.
65. The TH. Conjugation of fluorescein Isothiocyanate to antibodies. *Immunology* 1970;18:865-871.
66. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 1997;99:1739-1750.
67. Feinstein AR. Clinical Biostatistics. L. On choosing a mean and other quantitative indexes to describe the localization and dispersion of univariate data. *Clin Pharmacol Ther* 27:120-130, 1980.

68. McHugh SM, Ewan PW. A clinical index: a new method to assess efficacy of allergen immunotherapy. *Allergy* 1992;47:115-120
69. Revicki DA, Leidy NK, Brennan-Diemer F, Thompson C, Togias A. Development and preliminary validation of the multiattribute rhinitis symptom utility index. *Qual Life Res* 1998;7:693-702
70. de Graafint-Veld T, Koenders, Garrelds IM, Gerth van Wiljk R. The relationship between nasal hypereactivity, quality of life and nasal symptoms in patients with perennial allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:508-513
71. Campbell JD, Hay Glass KT. T cell chemokine receptor expression in human Th1 and Th2 associated diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 2000;48:451-456
72. Annunziato F, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Mannetti R, Maggi E, Romagnani S. Molecules Associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:12-16
73. Annunziato F, Cosmi L, Galli G, Beltrame C, Romagnani P, Manetti R, Romagnani S, Maggi E. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 1999;65:691-699
74. Cosmi L, Annunziato F, Galli MIG, Maggi RME, Nagata K, Romagnani S. CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol* 2000;30:2972-2972
75. Romagnani S. The Th1/Th2 Paradigm. *Immunol Today* 1997;18: 263-266.

76. Moverare R, Elfman L, Stalenheim G, Björnsson E. Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients. *Allergy* 2000;55:171-175.
77. Romagnani S. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol* 1994;6:838.
78. Cosmi L, Annunziato F, Maggi E, Romagnani S, Manetti R. Chemoattractant receptors expressed on type 2 T cells and their role in disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:273-279.
79. Moffat M, Cookson W. Genetics of asthma and inflammation: the status. *Curr. Op. Immunol.* 1999;11:606-609.
80. Lensmar C, Prieto J, Dahlén B, Eklund A, Grunewald J, Roquet A. Airway inflammation and altered alveolar macrophage phenotype pattern after repeated low-dose allergen exposure of atopic asthmatic subjects. *Clin. Exp. Allergy* 1998 ; 29 : 1632-1640.
81. Shelburne CP, Ryan JJ. The role of Th2 cytokines in mast cell homeostasis. *Immunol Rev* 2001;179:82-93.
82. Aarvak T, Strand E, Teigland J, Miossec P, Natving JB. Switch in chemokine receptor phenotype on memory on memory T cells without a change in cytokine phenotype. *Scand J Immunol* 2001;54:100-108.
83. Abi-Younes S, Si-Tahar M, Luster AD. The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4. *Thromb Res* 2001;101:279-289.
84. Bayscal C, Atilgan AR. Elucidating the structural mechanisms for biological activity of the chemokine family. *Proteins* 2001;43:150-160.

85. Iellem A, Colantonio L, Bhakta S, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Inhibition by IL-12 and INF-alpha and macrophage derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1030-1039.
86. D'Ambrosio D, Iellem A, Colantonio L, Clissi B, Pardi R, Sinigaglia F. Localization of Th cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunol Today* 2000;105:399-408.
87. Prescott S, Macaubas C, Smallacombe T, Holt B, Sly P, Holt P. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*. 1999;353:196-200.
88. Berin CM, Eckman L, Broide DH, Kagnoff MF. Regulated production of the T helper 2-type T-cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells *in vitro* and in human lung xenografts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:382-389.
89. Terada N, Hamano N, Kim WJ, Hirai K, Kakajima T, Yamada H, Kawasaki H, Yamashita T, Kishi H, Nomura T, Numata T, Yoshie O, Konno A. The kinetics of allergen-induced eotaxin level in nasal lavage fluid its key role in eosinophil recruitment in nasalmucosa. *Am J Crit Care Med* 2001;164:575-579.
90. Fernandez EJ, Wilken J, Thompson DA, Peiper SC, Lolis E. Comparison of the structure of vMIP-II with eotaxin-1 RANTES, and MCP-3 suggest a unique mechanism for CCR3 activation. *Biochemistry* 2000;34:12837-12844.

91. Palmer L, Cookson WO. Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res* 2000;10:1280-1287.
92. Bellinghausen I, Brand U, Enk A, Knop J, Saloga J. Signals involved in the early Th1/Th2 polarization of an immune response depending on the type of antigen. *J allergy Clin Immunol* 1999;103:298-306.
93. McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuckroo VK, Barsh GS, Freeman JG, Umetsu DT, DeKruyff RH. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature Immunology* 2001;2:1109-1116.
94. Kearn MW. Asthma genetics: not for the Timid?. *Nature Immunology* 2001;2:1095-1096.
95. Josimovic-Alsevic O, Durkop H, Schwarting REB, et al. KI-1 (CD30) antigen is released by KI-1-positive tumor cells in vitro and in vivo. I. Partial characterization of soluble KI-1 and detection of the antigen in cell culture supernatants and in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Immunol* 1998;19:157-162.
96. Dummer W, Rose C, Brocker EB. Expression of CD30 on T helper cells in the inflammatory infiltrate of acute atopic dermatitis but not of allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1998;290:598-602.
97. Dummer W, Brocker EB, Bastian BC. Elevated serum levels of soluble CD30 are associated with atopic dermatitis, but not with respiratory atopic disorders and allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 1997;137:185-187.

98. Dummer W, Rose C, Brocker EB. Expression of CD30 on T helper cells in the inflammatory infiltrate of acute atopic dermatitis but not of allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1998;290:598-602.
99. Begtsson A, Holm L, Back O, et al Elevated serum levels of soluble CD30 in patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1997;109:533-537.
100. Yamamoto JY, Onoue YA, Kanegane H, et al. CD30 expression on circulating memory CD4+ T cells as a Th2-dominated situation in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2000;55:1011-1018.
101. Petkova D, Xaubet A, Picado C, Filella X, Agusti C, Luburich P, Rodriguez-Roisin R. Evaluation of CD30 as a marker for Th2 lymphocytes in bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases. *Respir Med* 2000;94:345-349
102. Blswas P, Rovere P, Filippi C, Heltai S, Smith C, Dagna L, Poli G, Manfredi A, Ferrarini M. Engagement of CD30 shapes the secretion of cytokines by human  $\gamma\delta$  T cells. *Eur J Immunol* 2000;30:2172-2180
103. Muta H, Boise LH, Fang L, Podack ER. CD30 signals integrate expression of cytotoxic effector molecules, lymphocytes trafficking, and signals for proliferation and apoptosis. *J Immunol* 2000;165:5105-5111
104. Gerli R, Lunardi C, Vinante F, Bistoni O, Pizzolo G, Pitzalis C. Role of CD30+ T cells in rheumatoid arthritis: a counter regulatory paradigm for Th1 driven diseases. *Trends Immunol* 2001;22:72-77

105. Li XD, Essayan DM, Liu MC, Beaty TH, Huang SK. Profiling of differential gene expression in activated, allergen specific Th2 cells. *Genes Immun* 2001;2:88-98.
106. Brinckman V, Kristofic C. Massive production of Th2 cytokines by human CD4+ effector T cells transiently expressing the natural killer cell marker CD57/HNK1. *Immunology* 1997;91:541-547.