



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

TITULO DE TESIS:

PARTICIPACIÓN DEL CD30 EN LOS MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN ALERGIAS

Para optar por el grado de Doctor en Ciencias

(Inmunología)

Presenta:

Diana Ivette Magaña Casas

Directores de Tesis

Dr. Ricardo Lascurain Ledesma Dpto. de Bioquímica Facultad de Medicina CU

Dra. María del Carmen Jiménez Martínez Dpto de Bioquímica Facultad de Medicina CU

Comité Tutorial:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Leopoldo Flores Romo Dpto. Biología Celular CINVESTAV

Cd.Mx., abril 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

TÍTULO DE TESIS:

**PARTICIPACIÓN DEL CD30 EN LOS MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN
ALERGIAS**

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

(Inmunología)

Presenta:

Med. Cir. Diana Ivette Magaña Casas

Directores de Tesis

Dr. Ricardo Lascurain Ledesma Dra. María del Carmen Jiménez Martínez

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

DEL INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA “FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”

Y EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, BAJO LA

DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ Y RICARDO LASCURAIN LEDESMA

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT), PROYECTO 71291

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer ante todo a DIOS quien en todo momento ha sido mi guía espiritual y el que ha dado en todo momento el propósito para que pueda estar en terminando este ciclo de mi vida. Sin ti mi Señor la cosas no se hubieran logrado y yo sé que tú cuando quieres que se logren los objetivos pones todas las circunstancias para que así sean. Así que fueron tus designios los que hicieron que antes no sucediera, pero de igual forma tu planeaste que ahora fuera el tiempo. Gracias mi señor por permitirme estar logrando este sueño y sobre todo porque pusiste en mi camino a muchas personas para que así fuera.

Gracias Dra. María del Carmen Jiménez por haber sido la guía, la mujer que me ayudo a retomar mi tesis la mujer que confió en que podía lograrlo y ante todo por ser una gran amiga y ejemplo para mí.

Gracias Dr. Ricardo Lascurain por haber sido un guía con una actitud siempre positiva, nunca hubo un regaño, ni un reproche, siempre animándome.

Gracias Dr. Yonathan Garfias por ser el hombre que me trajo al mundo de la investigación, porque en todo momento fuiste como el hermano mayor que no tengo dándome consejos y siempre por tu gran insistencia en que concluyera mi doctorado.

A mis amigos Dra. Blanca Ortiz, Dr. Francisco Urrea, Dra. Linda Mejia y Marisela Linares que siempre estuvieron al pendiente de mi doctorado y los cuales les aprendí mucho y me enseñaron muchas técnicas.

A mis amigos la Dra. Melissa Islas, al Dr Romero Huesca, Dr Luis Alberto Salazar por siempre apoyarme en la realización de mi tesis al preocuparse siempre por mis avances.

Agradecer enormemente a mi amado esposo el Dr. Julio César Ayala por ser el hombre que ha estado conmigo en todo momento, en todas las decisiones que he tomado siempre apoyarme y sobre todo porque siempre ha sido la luz que ha iluminado mi camino sin ponerme límites.

A mis padres Roberto y Silvia que en todo momento han estado preocupados por darme lo mejor, por sacrificar su vida por mi hermana y por mí. A mi hermana Lorena por darme siempre su apoyo.

LES DEDICO ESTA TESIS A MI ESPOSO JULIO

Y A MIS AMADOS HIJOS

ABRAHAM, MARIANA Y JULITO

LA RAZON DE MI VIDA.

CONTENIDO

Capítulo 1. Generalidades de la Alergia

Capítulo 2. Papel del *Dermatophagoides pteronnyssinus* en la Alergia

Capítulo 3. CD30 y la Alergia

Capítulo 4. Planteamiento del problema, Hipótesis y Objetivos

Capítulo 5. Pacientes, Material y Métodos

Capítulo 6. Resultados

Capítulo 7. Discusión

Bibliografía

Anexos

Figuras y Tablas

Figura 1.1 Células, citocinas efectoras de la Inmunidad tipo 1

Figura 1.2 Células, citocinas de la respuesta efectora tipo 2

Figura 1.3 Sensibilización y memoria

Figura 1.4 Acción de los mediadores de los mastocitos en la fase efectora

Figura 1.5 Queratoconjuntivitis primaveral

Figura 2.1 Características estructurales de HDM relacionadas con su inmunogenicidad

Figura 2.2 Activación del epitelio pulmonar por *Der p*

Figura 2.3 Los HDM inducen producción de citocinas en el epitelio

Figura 3.1 Estructura y organización de la molécula CD30 murino y humana

Figura 5.1 Diagrama de flujo de la metodología realizada

Figura 5.2 Pruebas cutáneas

Figura 6.1 Perfil electroforético *Der p*

Figura 6.2 Estrategia de análisis y porcentaje de proliferación celular en una cinética de estimulación.

Figura 6.3 Comparativa de la cinética de porcentaje de proliferación con respecto al tiempo.

Figura 6.4 Gráfica de puntos de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD30⁺ y CD8⁺CD30⁺ de controles sanos y pacientes con QCP.

Figura 6.5 Gráficas de puntos de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD30⁺ y CD8⁺CD30⁺ a los 7 días de cultivo con diferentes estímulos.

Figura 6.6 Análisis de la expresión génica de CD30 por RT-PCR.

Figura 6.7 Histogramas sobre la producción de citocinas intracelulares en las células T CD4⁺CD30⁺ y CD30⁻.

Figura 6.8 Efecto del bloqueo de IL-4 en las células T CD4⁺CD30⁺ después del estímulo con *Der p*.

Figura 6.9 Concentración de CD30s en sobrenadante de CMN estimuladas con Concanavalina A

Tabla 2.1 Caracterización molecular y funcional de los distintos alérgenos de *Der p*

Tabla 6.1 Características clínicas de los pacientes incluidos en este estudio

Tabla 6.2 Porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD30⁺ y CD8⁺CD30⁺.

Tabla 6.3 Cambios de la expresión de CD30 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes con QCP.

ABSTRACT

Background: Vernal keratoconjunctivitis is a severe form of allergic conjunctivitis, inflammatory infiltrates of conjunctiva are characterized by CD3+ and CD30+ cells, until today it is unclear the functional involvement of CD30+ T cells in vernal keratoconjunctivitis. Our aim was to evaluate the functional characteristics of CD30+ T cells after allergen in peripheral blood mononuclear cells, obtained from patients with vernal keratoconjunctivitis.

Methods: Seventeen consecutive patients from Institute of Ophthalmology, with active forms of vernal keratoconjunctivitis, were included.

Results: Upon allergen-stimulation we observed an increased frequency of CD30+ T cells, when compared with non-stimulated cells ($p < 0.0001$). CD30+ T cells were able to respond to a specific allergen inducing expression of intracellular IL-4, IL-5, and IFN- γ , when compared with CD30- T cells ($p < 0.0001$). Increased early secretion of soluble CD30 was observed in the supernatant of cultured cells from patients with keratoconjunctivitis, when compared with healthy controls ($p = 0.03$). Blockage with IL4 diminished significantly CD30 frequency in allergen-stimulated cells.

Conclusions: Our results suggest that upon allergenic stimulation, CD4+CD30+ cells are the most important source of IL-4, IL-5, and IFN- γ . Interestingly, IL-4 is acting as an activation loop to increase CD30 expression on T cells after specific stimulation. These findings suggest that CD4+CD30+ T cells are effector cells and play a significant role in the immune pathogenic response in patients with vernal keratoconjunctivitis.

RESUMEN

La queratoconjuntivitis primaveral (QCP) es una conjuntivitis alérgica severa, que se caracteriza por lesión corneal e infiltrado inflamatorio en la conjuntiva con abundantes células CD3+ y CD30+. A la fecha se desconoce el papel que juegan los linfocitos T CD30+ en la queratoconjuntivitis primaveral. El propósito de este trabajo fue evaluar las características funcionales de los linfocitos T CD30+ después del estímulo alérgeno-específico en pacientes con (QCP).

Método: Se incluyeron 17 pacientes vistos en la consulta de Inmunología de forma consecutiva del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana con QCP activa y pruebas cutáneas positivas a *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*).

Resultados: Se observó un incremento en la frecuencia de Linfocitos T CD30+ ($p < 0.0001$) posterior a la estimulación con *Der p*. Los linfocitos T CD30+ activados por el antígeno fueron capaces de expresar cantidades significativas de IL-4, IL-5 e INF-g, en comparación con los Linfocitos T CD30- ($p < 0.0001$). Adicionalmente en el sobrenadante de cultivo se observó un incremento significativo desde las 72 horas, en la concentración de CD30 soluble en los pacientes con QCP ($p = 0.03$) inclusive, posterior a la estimulación por *Der p*.

Conclusión: En pacientes con QCP la estimulación con *Der p* induce linfocitos T CD4+CD30+ productores de IL-4, IL-5 e INF-g. La IL-4 inducida por la activación específica con el alérgeno funciona como una citocina que regula positivamente la expresión de CD30, ya que su bloqueo inhibe la proliferación de esta subpoblación celular. Estos resultados son relevantes ya que otros autores han demostrado que estas citocinas se encuentran directamente involucradas con el daño corneal en la QCP. Es posible que la sensibilización local a través de alérgenos juegue un papel relevante en el daño ocular, dado que es conocido que existe migración de Linfocitos T CD30+ a conjuntiva en pacientes con QCP.

Capítulo 1. Generalidades de la Alergia Ocular

Los padecimientos alérgicos se han incrementado en los últimos años. El estudio internacional de asma y alergia pediátrico en México (ISAAC) en su fase III reporta una prevalencia estimada de 4.6% en el 2014.¹ Este grupo de patologías lo integran el asma atópica, la rinitis alérgica, la conjuntivitis alérgica y la dermatitis atópica. Todas estas enfermedades tienen en común el hecho de ser consideradas crónicas, es decir, que se desarrollan lentamente y persisten durante un largo periodo de tiempo y con frecuencia durante toda la vida del enfermo. Una característica en estas enfermedades es la hiperproducción de IgE ante la exposición a un alérgeno inhalado (polvo, ácaros, pólenes y hongos) o ingerido (alimentos, conservadores), lo que posteriormente desencadena en una respuesta específica, pero fisiológicamente anormal.²

Las alergias respiratorias son enfermedades que a nivel mundial han causado mayor impacto, pues su prevalencia se ha incrementado considerablemente durante los últimos 20 años y especialmente en la población infantil. En México según el estudio ISSAC, se encontró una prevalencia de asma del 6% en la población infantil de entre 13 y 14 años de edad, y un 30% de estos casos estuvo asociado con rinitis alérgica.

Las enfermedades alérgicas en el ojo también han ido incrementando gradualmente en los últimos años; en México no existen reportes claros sobre su incidencia o prevalencia, pero López-López J¹ reporta que la conjuntivitis alérgica tiene una frecuencia de 4% de entre todas las enfermedades alérgicas,¹ mientras que Toribio E³ reporta que la alergia ocular se encuentra asociada hasta en un 80% con otras enfermedades alérgicas.³ En nuestra institución, la conjuntivitis alérgica se encuentra dentro de las primeras 10 causas de consulta, impartándose casi 8000 consultas al año por esta entidad.⁴ En sus formas más leves, produce síntomas molestos pero que no amenazan a la visión; las formas más graves, como la queratoconjuntivitis primaveral y atópica, pueden complicarse y provocar, inclusive, ceguera si afectan la córnea.

Las enfermedades alérgicas del ojo son un conjunto de alteraciones inflamatorias de la superficie ocular que en nuestro país constituyen un problema de salud importante, ya que generan una morbilidad significativa en todas sus formas clínicas.

La inflamación de la superficie ocular durante la conjuntivitis alérgica genera una serie de signos y síntomas característicos, siendo el prurito el más importante; además, pueden aparecer eritema conjuntival y ardor ocular, los cuales frecuentemente se acompañan de lagrimeo y fotofobia. En un principio estos síntomas tienden a ser ocasionales y reversibles, pero a medida que se presentan cambios anatómicos en la superficie ocular por respuestas de reparación agresiva aparece fibrosis y vascularización, con lo que los síntomas tienden a incrementarse en frecuencia e intensidad, para finalmente hacerse irreversibles.

El eritema, el edema palpebral y/o conjuntival, el enrojecimiento y la fotofobia son más frecuentes en la fase aguda, mientras que en la fase tardía se observa que la hiperemia conjuntival se torna más aparente y aparece pseudoptosis; en algunos casos acúmulos celulares en la región límbica (eosinófilos) y en casos extremos ulceraciones corneales.

La alergia es una reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos específicos, dando como resultado una reacción inflamatoria sistémica de hipersensibilidad inmediata contra un antígeno (Ag) normalmente inocuo. Esta reacción puede producir daño y lesiones en los tejidos.⁵ **Un** requisito esencial en este tipo de respuesta es la producción de anticuerpos IgE que al unirse a sus receptores específicos sobre células cebadas inducen la activación de las mismas, con liberación y producción de mediadores que ocasionan las manifestaciones clínicas⁶. Actualmente está muy claro que las características que distinguen a los individuos atópicos de los que no son, es la capacidad de desarrollar una respuesta de IgE a los alérgenos del medio ambiente.

Mecanismos celulares y moleculares en la Alergia

Las células dendríticas (DC) se encuentran en las áreas cercanas al sitio de entrada donde los agentes infecciosos pueden entrar al organismo, como son las mucosas y la epidermis. El reconocimiento del antígeno por parte de las células de la respuesta inmune innata es el primer paso en el proceso para inducir la respuesta adaptativa. Para ello, es necesaria la presencia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como son los receptores tipo Toll (TLRs) y/o los receptores de lectina tipo C. Además de estos receptores, las DC pueden tener una función determinante en el proceso de desarrollo de la alergia, y de esta forma favorecer la polarización hacia una respuesta tipo Th2.⁷⁻⁹

Recientemente se ha descrito la participación de las células epiteliales para cooperar con las funciones de las DC y sintetizar citocinas y quimiocinas para activar y reclutar otras células del sistema inmune en el proceso de desarrollo de la inflamación.^{10,11}

La activación de las DC induce el aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y el incremento en la síntesis de citocinas proinflamatorias; gracias a esto, las DC migran por la vía linfática aferente hasta los ganglios linfáticos para llevar a cabo la presentación del antígeno y la activación de las células T.¹² Durante la migración las DC maduran, al hacerlo, expresan moléculas de co-estimulación (CD80, CD86), llevan a cabo el procesamiento de las moléculas capturadas y sus epítopos son presentados en moléculas de histocompatibilidad clase II y secretan citocinas indispensables para modular la respuesta inmune adaptativa.

La actividad de las células dendríticas plasmocitoides (pDC) es de vital importancia en la tolerancia inmunológica y polarización de la respuesta Th2. Las pDC son de las principales células productoras de IFN tipo I implicadas en la respuesta inmune viral y en la tolerancia. En procesos inflamatorios se observa que la activación de estas células es por medio del reconocimiento de antígenos a través de TLR-7 y TLR-9, lo que induce la síntesis de grandes concentraciones de IFN tipo I. Lo anterior se ha demostrado en los modelos murinos donde al inocular con un alérgeno se observa cómo las DC inducen la activación de células T CD4⁺ que polarizan la respuesta hacia Th2; aunado a lo

anterior, el efecto de las DC persiste aún después de terminada la fase de sensibilización, lo que se ha demostrado en asma y eccema.¹³

Otras células importantes en la participación de la respuesta alérgica son las células cebadas o mastocitos, que expresan receptores de alta afinidad para el reconocimiento de la IgE, el factor de células madre (SCF) y el receptor c-Kit. Los mastocitos se encuentran en sangre en escasas cantidades y predominantemente en los tejidos tras la migración endotelial. Los mastocitos maduros son ricos en gránulos tales como proteasas, aminas y proteoglicanos, además de mediadores lipídicos como prostaglandinas y leucotrienos, así como ser capaces de sintetizar quimiocinas y citocinas.¹⁴

Durante las reacciones alérgicas liberan mediadores que tienen efecto en los vasos sanguíneos, en músculo liso, tejido conectivo, en las glándulas mucosas y en las células inflamatorias.¹⁵ En el modelo de asma, la activación de las células cebadas se observa por el aumento de triptasa y PGD₂ en el lavado bronquioalveolar (BAL), además por la cuantificación de los niveles de histaminas en los pacientes asmáticos a diferencia de individuos sanos. Las células cebadas contribuyen en la respuesta inflamatoria crónica alérgica, en el remodelado de las vías aéreas, en la sintomatología y en la iniciación de la respuesta alérgica, liberando citocinas para la inducción de IgE por parte de las células B y la diferenciación de los linfocitos T en Th2.¹⁶

Otro tipo celular implicado en la respuesta alérgica son los eosinófilos, que se originan en médula ósea por actividad de la IL-5, aumentan en la helmintiasis y los estados alérgicos y son activados tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. Además de producir moléculas proinflamatorias (leucotrienos, citocinas y quimiocinas), los eosinófilos son células citotóxicas por la actividad de la proteína básica principal (ECP), la peroxidasa eosinofílica (EPO) y la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN).¹⁷

Los basófilos son otro tipo celular implicado en el proceso alérgico; estas células contienen gránulos como la histamina, que interviene en la contracción del músculo liso, la secreción ácida del estómago, el crecimiento celular, la neurotransmisión y la inflamación.

La diferencia principal entre las células cebadas y los basófilos además de su morfología, es que el basófilo presenta en la membrana la proteína básica mayor y proteína cristalizada de Charcot-Leyden. Estudios recientes en modelos murino y en humanos demuestran que los basófilos contribuyen importantemente en la producción de citocinas Th2, favoreciendo la inflamación alérgica. Los basófilos pueden migrar a los ganglios linfáticos y en algunas circunstancias cooperar con otras células.¹⁹

Linfocitos T y alergia

Como se ha mencionado anteriormente, los linfocitos T juegan un papel muy importante en los procesos de hipersensibilidad involucrados en la alergia. Las células efectoras tipo 1 (Th1) son las responsables de la defensa contra microorganismos intracelulares como bacterias, protozoarios y algunos virus mediante la expresión del factor de transcripción T-bet, que favorece la síntesis de IFN- γ , necesario para el control de la infección de estos patógenos. Además, las células Th1 son capaces de ayudar a la producción de anticuerpos por los linfocitos B dando un isotipo IgG2 en ratón y de IgM, IgG, en el humano.²⁰

La respuesta efectora Th1 es inducida por IL-12, producida a su vez por las células dendríticas en respuesta a la interacción de receptores de reconocimiento de patógenos con bacterias o virus de estructuras conservadas. El IFN- γ puede contribuir a la diferenciación de la respuesta Th1,²¹ junto con IL-23 e IL-27,²² tal como se observa en la figura 1.1. Fenotípicamente la respuesta Th1 se caracteriza por la expresión de receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 en linfocitos T efectores.²³ En modelos de asma murina, el IFN- γ previene el desarrollo de la eosinofilia tisular y de la hiperreactividad bronquial en etapas iniciales¹⁴. En ratones deficientes del receptor de IFN- γ (IFN- γ R) se generan eosinofilia persistente en respuesta a la inhalación del

alergeno.²⁴ Sin embargo, algunos estudios han demostrado la coexistencia de células Th1 durante un proceso alérgico prolongado, que agrava el daño generado por la respuesta Th2 durante una Inflamación alérgica.^{25,26} Utilizando transferencia de células en modelos de asma bronquial se ha visto que linfocitos Th1 alérgico específicos pueden aumentar la respuesta Th2 cuando ésta ya está establecida en las vías aéreas,^{27,28} induciendo la producción de TNF- α , por lo que la relación del IFN- γ y respuesta Th2 es mucho más complicada que una simple retroalimentación negativa.²⁹

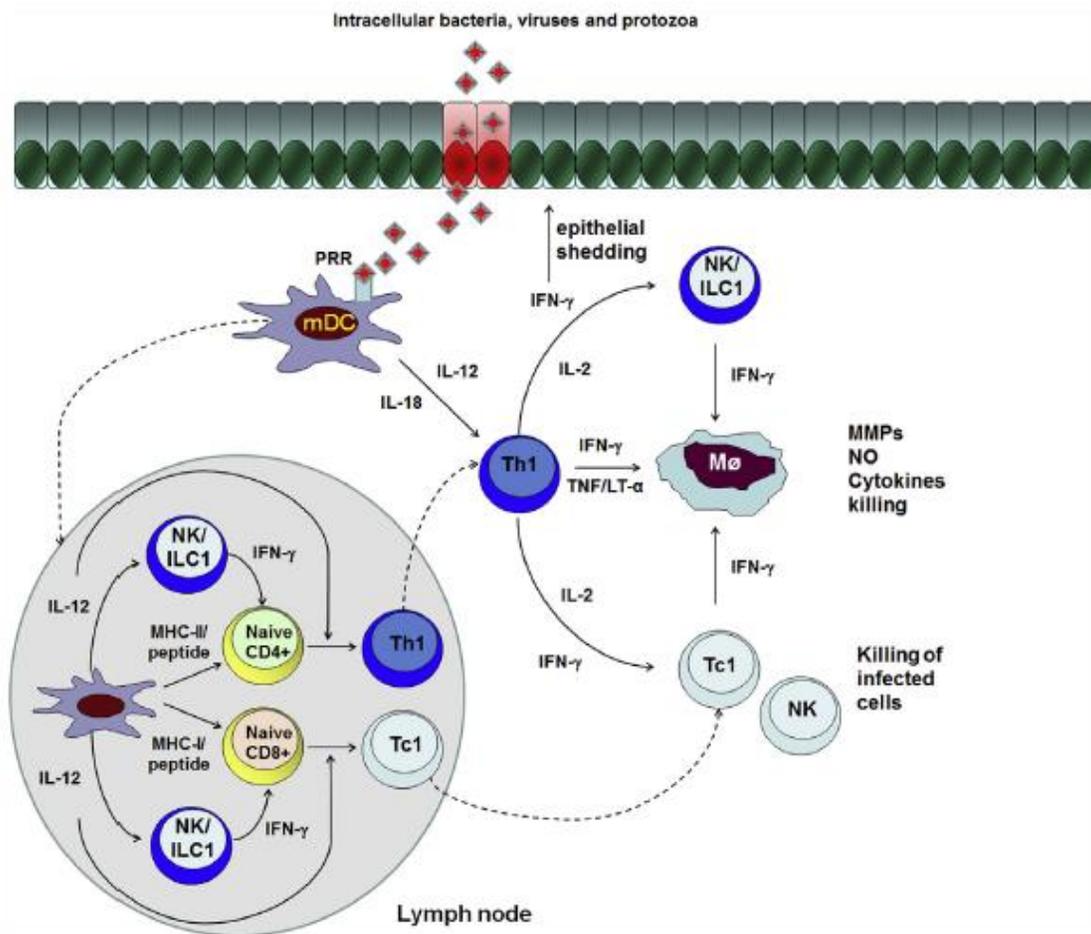


Fig.1.1 Células, citocinas efectoras de la inmunidad tipo 1. Interacción de microorganismos intracelulares con receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), las células dendríticas producen IL-12 e IL-18 y estimulan a las células NK/ILC1 derivadas de IFN γ e induce Th1 o Tc1. Tc1 y NK matan células infectadas por virus. (Willart M & Hammad H. 2011)

La respuesta tipo Th2 la podemos observar ejemplificada en la figura 2.2, se induce biológicamente frente a helmintos y patológicamente frente a alérgenos, es controlada

por GATA-3, generando la producción de IL-4, IL-5 e IL-13. La interacción entre IL-4 y su receptor resulta en la activación de STAT6, promoviendo la expresión de GATA-3, lo que induce la trans-activación del promotor de IL-4 y regula directamente a la expresión génica de IL-5 e IL-13.³⁰ Las células Th2 expresan receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 y CCR8;²² en el modelo de asma, el epitelio bronquial secreta los ligandos para CCR4 CCL17 e CCL22, interesantemente IL-4 y TNF- α regulan la producción de CCL17 en el epitelio, lo que favorece el reclutamiento de las células Th2.³¹

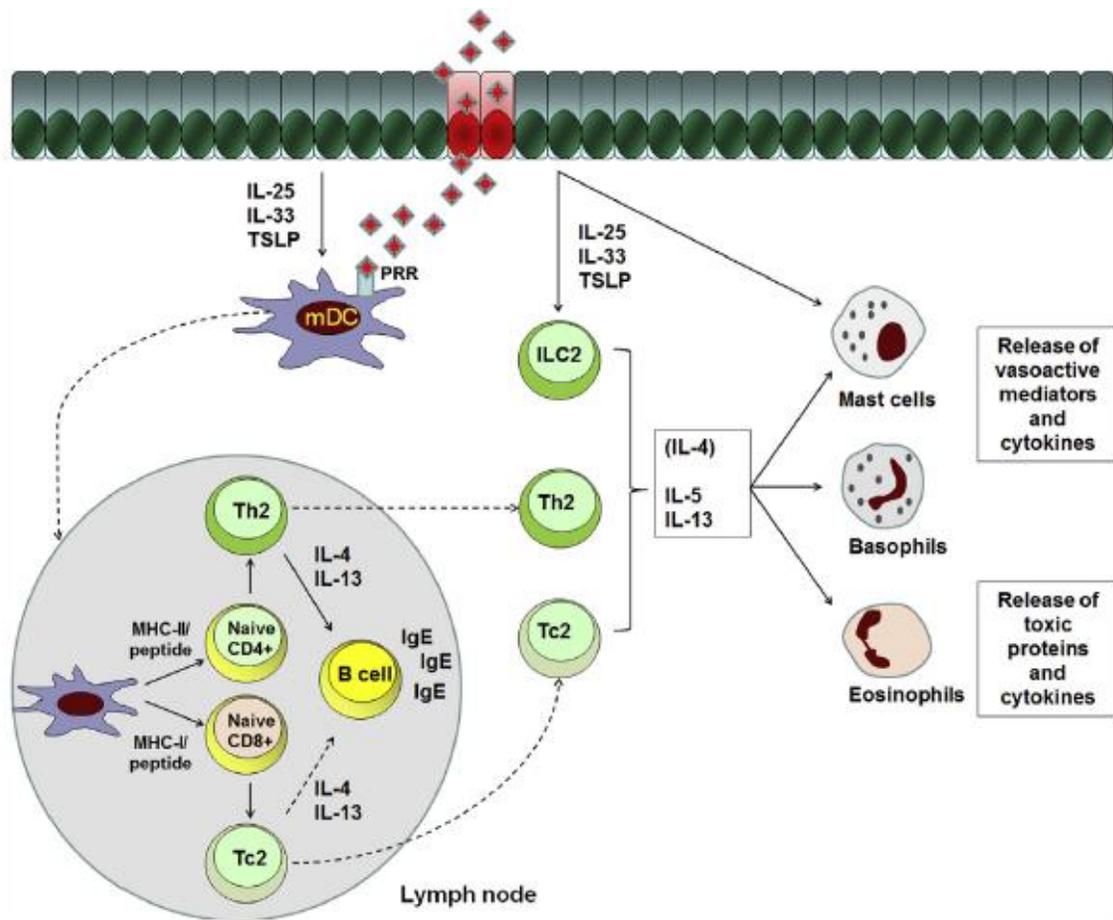


Fig 1.2 Células, citocinas de la respuesta efectora tipo 2. Los helmintos y alérgenos inducen a que los epitelios produzcan IL-25, IL-33 y linfopoyetina tímica estromal (TSLP), y de esta forma activar a mastocitos, eosinófilos y basófilos y producir IL-4, IL-5 e IL-13. Al activarse las células dendríticas en presencia de IL-4 hacen que el linfocito T se convierta en Th2 y que IL-4 e IL-13 induzca a que el linfocito B produzca IgE, además la IL-5 promueve el reclutamiento de eosinófilos. (Willart M & Hammad H. 2011)

La IL-4 promueve la regulación de moléculas de adhesión en el epitelio inflamatorio, la producción de eotaxina por parte de las células cebadas en la reacción alérgica. Al interactuar IL-4 e IL-13 potencializan la inducción de TSLP, GM-CSF y CCL20 por el epitelio bronquial.³²

En humanos, el anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (Pascolizumab) muestra resultados prometedores en líneas celulares humanas y de simios³³. Este posible blanco terapéutico se explica porque la acción de IL-4 como de la IL-13 es más importante en la fase de sensibilización, ya que tiene efecto sobre las elevadas concentraciones de IgE, el proceso inflamatorio pulmonar y la producción de moco en etapas crónicas de la enfermedad alérgica pulmonar. Es por esto que, en el modelo de asma, el bloqueo de IL-4 durante la fase efectora, no impacta ni en el proceso de inflamación pulmonar, ni en la hiperreactividad bronquial, ni en los niveles de IgE. En contraste, el bloqueo de IL-13 al tiempo de la estimulación alérgica atenúa el proceso inflamatorio, la hiperreactividad bronquial y la producción de moco. Estos resultados son importantes para observar la relación estrecha de IL-4 e IL-13 en el tejido inflamatorio³⁴. En individuos alérgicos las células T CD4⁺ secretan menor cantidad de IL-10 e incrementan la producción de IL-4 en células de sangre venosa periférica, en comparación de los individuos sanos³⁵. Esto sugiere que altas concentraciones de IL-10 e IL-4 pueden ser importantes en el mantenimiento de la homeostasis y prevención de la respuesta hacia alérgenos; en este sentido, los macrófagos alveolares de pacientes asmáticos secretan menores niveles de IL-10 que individuos no asmáticos.³⁶ De hecho varios estudios importantes han aludido a la existencia de una correlación inversa entre niveles de IL-10 y la severidad del asma.^{37,38}

Por otra parte, la participación de IL-5 es fundamental para la maduración y diferenciación de los eosinófilos.³⁹ En biopsias de pacientes con asma bronquial, se han identificado altos niveles de expresión del mRNA para IL-5 en linfocitos T CD4⁺.⁴⁰ El uso de anticuerpo monoclonal (mAb) anti-IL-5 inhibe la infiltración eosinofílica inducida por antígeno en las vías aéreas en modelos de asma en ratones⁴¹ y suprime la fibrosis causada por la inhalación repetida del antígeno.⁴² En humanos, el tratamiento

con un anticuerpo anti-IL-5 disminuye el daño tisular en asma,⁴³ y lo contrario, la inhalación de IL-5 en pacientes asmáticos induce hiperreactividad bronquial⁴⁴

Una fuente importante de IL-5 son las células linfoides innatas tipo 2 (ILC2).⁴⁵ Las ILCs han sido descritas en la respuesta inmune asociada a mucosas. Estas son a su vez clasificadas en ILC1, ILC2 e ILC3, las cuales tienen una producción de citocinas y factores de transcripción similares a las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17.⁴⁶

También se conoce de la participación de las células Th17 en la enfermedad alérgica. Las células Th17 se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR γ T y por la secreción de citocinas IL-17^a, IL-17F, IL-21 e IL-22⁴⁷ y su diferenciación es dependiente de TGF β y de IL-6. Asimismo, se ha demostrado que IL-23 es la citocina que participa en la estabilización de esta respuesta celular y en las diferentes funciones efectoras patogénicas en las cuales se presenta una gran producción de IL-17 e IFN γ .⁴⁸

En padecimientos alérgicos como el asma el papel que juega IL-17 es el reclutamiento y activación de neutrófilos favoreciendo la secreción de IL-8⁴⁹, (CXCL8) y el Factor Estimulante de Colonias. En un estudio en el cual se les administró IL-17 a ratones se observó el incremento en el infiltrado de neutrófilos y la hiperreactividad bronquial en el modelo animal⁵⁰ En otro estudio, en el que se polarizó la respuesta inmunológica hacia Th2 o Th17 utilizando OVA como Ag, se observó que las células Th2 favorecieron la inflamación aérea y el infiltrado de eosinófilos en el pulmón, lo cual disminuía con tratamiento esteroideo; interesantemente, las células Th17 Ag inducidas, favorecieron el infiltrado de neutrófilos, pero no de eosinófilos, sin mejoría con tratamiento esteroideo. De manera similar en pacientes asmáticos alérgicos resistentes a esteroides se asocian a una elevación de los niveles de IL-17 con un predominio de infiltrado de neutrófilos.⁵¹

Por otra parte, las células T reguladoras (Tregs) son un subtipo celular responsable de la regulación de la respuesta inmune. Las Tregs corresponden del 5-10% de los linfocitos T CD4⁺, y se caracterizan por ser CD4⁺CD25⁺ y expresar el factor de

transcripción Foxp3.⁵² Las Tregs pueden ser naturales o inducidas, las Tregs naturales se desarrollan en el timo, su TCR puede reconocer antígenos propios, por lo que su función se asocia con la prevención de la autoinmunidad. Las Tregs inducidas se generan en la periferia, debido al microambiente inducido por TGF β y favorecen la tolerancia de aloantígenos.⁵³ Las Tregs producen citocinas supresoras como IL-10 y TGF- β , la interacción de Tregs con células DC maduras reduce la expresión de CD80/CD86 en las DC, además de prevenir la diferenciación de los linfocitos T naïve.⁵⁴

Mecanismos inmunológicos de daño en alergia ocular

A) FASE DE SENSIBILIZACIÓN

Plantea un primer contacto del antígeno con el Tejido Linfoide Asociado a Conjuntiva (CALT), el cual, por sus características estructurales, tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunológica. A nivel ocular, el alérgeno atraviesa el epitelio conjuntival, donde es capturado por una célula presentadora de antígeno (CPA) residente. La CPA puede presentar el antígeno a linfocitos T CD4⁺ del CALT, o migrar a ganglios linfáticos de relevo, en donde lo presentará a un linfocito TCD4⁺, dirigiendo su diferenciación efectora.

En diversos modelos de alergia, la diferenciación hacia una respuesta Th2, está determinada por diversos factores como el tipo de antígeno (alérgeno) y la participación genética (atopia), entre otros. Las células dendríticas que no expresan CD8 α preferentemente generan respuestas Th2 cuando el paciente está predispuesto genéticamente; si el antígeno se encuentra en bajas concentraciones o si tiene baja afinidad para el receptor T entonces se genera la diferenciación a células Th2. Las clonas Th2 producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y la IL-4 inhibe la respuesta Th1 y junto con la IL-13 se desvía la producción de anticuerpos hacia IgE, por las células plasmáticas⁵⁵; la IL-5 promueve la generación de eosinófilos en médula ósea y la IL-9 induce la generación y activación de células cebadas o mastocitos, observándose un incremento de receptores para IgE en su superficie y mayor actividad celular. Cuando los mastocitos tienen sus receptores de IgE ocupados por IgE las “células están sensibilizadas”. Es

necesario contar con un gran número de células sensibilizadas cerca de la barrera epitelial, para que un segundo encuentro con el alérgeno, genere la degranulación de éstas y liberen mediadores de la inflamación. Esta fase se representa en la figura 1.3

Por otra parte, para el mantenimiento de la respuesta alérgica a nivel local es necesaria la infiltración constante de linfocitos T CD4⁺ alérgeno-específicos lo que dará pie a la fase efectora, en el caso de la superficie ocular. Allansmith y colaboradores⁵⁶ reportaron la presencia de IgE en las lágrimas humanas y las células B se localizan en los folículos linfoides conjuntivales y se caracterizan por ser CD23+CD21+CD40+, sugiriendo que estos son precursores de los linfocitos B productores de la IgE.^{57,58}

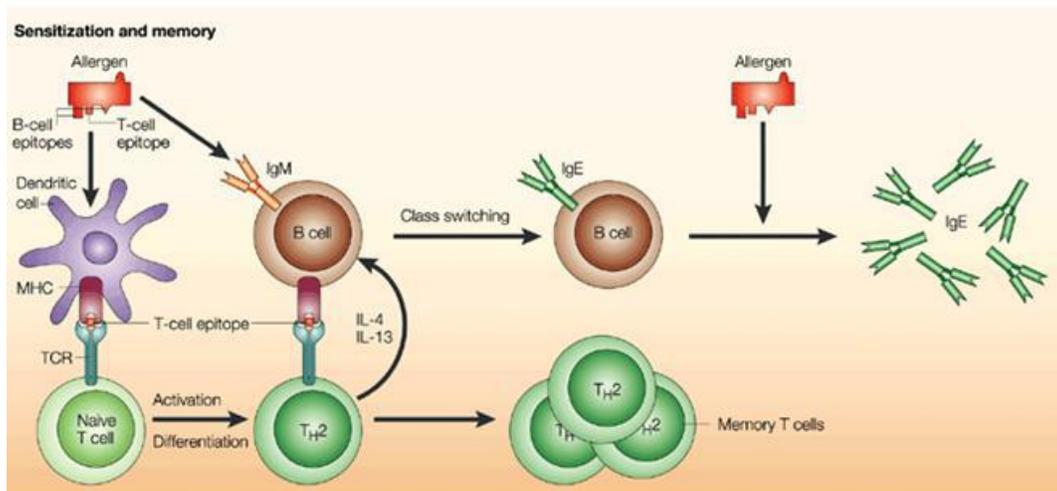


Figura 1.3 Sensibilización y memoria. Un contacto inicial con pequeñas cantidades del alérgeno en la superficie del CALT puede inducir la toma del antígeno por CPA (por ejemplo, células dendríticas) y/o linfocitos B. Si participan células Th2 se producirán IL-4 e IL-13 las cuales favorecen el cambio de isotipo de inmunoglobulinas a IgE completando la fase de sensibilización. Esta nos lleva a el establecimiento de células B y T de memoria específicas para el alérgeno. Contactos repetidos con el alérgeno disparan a las células B IgE⁺ los cuales recibirán cooperación por los linfocitos T. La cooperación incrementará los niveles de producción de anticuerpos IgE, que se fijarán a las células cebadas por medio de receptores de alta afinidad como FcεRI, y de baja afinidad como el FcεRII⁶² (*Nature Rev Immunol.* 2: 446-453)

B) FASE EFECTORA

Se presenta cuando aparece un segundo contacto con el alérgeno, generando una serie de eventos que despiertan una respuesta inflamatoria. Ésta a su vez la podemos dividir en una etapa aguda y una crónica. En la primera, las células efectoras son aquellas que fueron sensibilizadas directamente por el alérgeno, es decir, células residentes como mastocitos o células que han migrado desde la periferia, como eosinófilos y/o basófilos, en las que el reconocimiento del alérgeno, dado por la IgE genera la degranulación de éstos con la liberación de mediadores proinflamatorios. En la figura 1.4 se describe la acción de los mediadores de los mastocitos en la fase efectora. Si esta condición persiste, el microambiente conduce a la fase crónica, en la cual se activan más células inflamatorias y células residentes como las del epitelio, que contribuyen con producción de quimiocinas (RANTES, EOTAXINA, MCP, MIP-1 e IL-8), aumentando el reclutamiento leucocitario, sobre todo de eosinófilos, fibroblastos y macrófagos conjuntivales, lo que desemboca en un daño estructural de la conjuntiva.

La activación de los mastocitos favorece la liberación de varias citocinas como IL-4, IL-6, IL-13 y TNF α contribuyendo de forma importante a la inflamación local y a la respuesta Th2.⁵⁹ Además también son capaces de incrementar la expresión de Fc ϵ RI en la queratoconjuntivitis crónica.

En la fase aguda se observa:

- a) Reorganización del citoesqueleto de la célula cebada, permitiendo que las vacuolas donde se encontraban almacenados los mediadores preformados se fusionen a la membrana plasmática y liberen su contenido al tejido circundante.
- b) Activación de las vías relacionadas con la generación de mediadores lipídicos por activación de la lipooxigenasa con la producción de leucotrienos y sus consecuentes efectos biológicos.
- c) Liberación de citocinas, que favorecen un microambiente pro-inflamatorio, manteniendo la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de IgE.⁶⁰

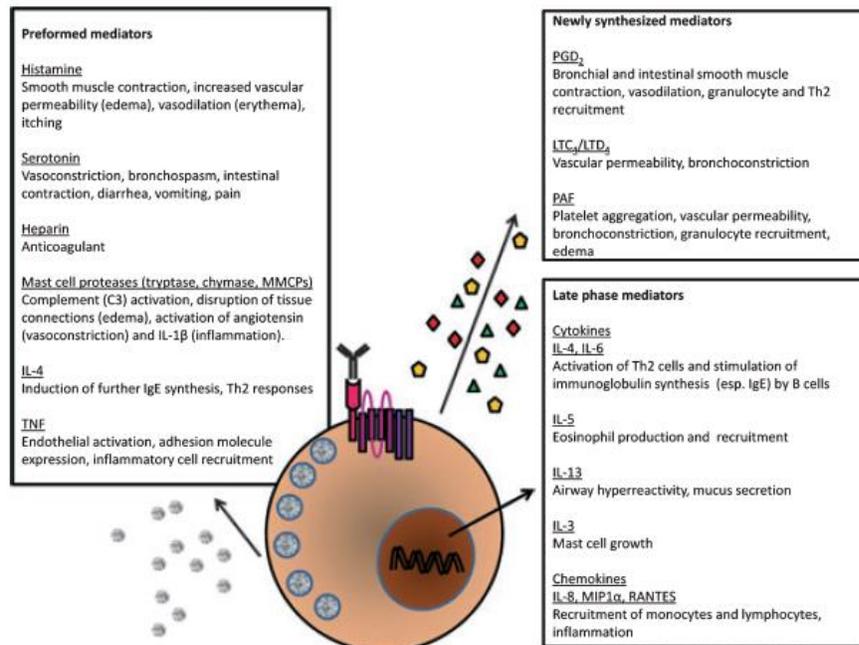


Figura 1.4 Acción de los mediadores de los mastocitos en la fase efectora. Degranulación de mastocitos y basófilos; secreción de potentes mediadores los cuales se dividen en tres categorías: mediadores preformados de acción inmediata (ej. histamina), mediadores que se sintetizan en minutos (ej. leucotrienos) y factores que requieren genes de transcripción que se presentan en la fase tardía (ej. citocinas). La figura resume algunas acciones de los mediadores que tienen connotación clínica en la sintomatología del proceso de hipersensibilidad inmediata. (Immunological Reviews 2011Vol. 242: 128-143)

La activación de los eosinófilos es relevante en la inmunofisiopatología de la alergia ocular, ya que además de inducir la liberación de muchos de los mediadores preformados y de novo iniciales, liberan otras proteínas que resultan tóxicas para el epitelio conjuntival y corneal, como la proteína básica principal, la proteína catiónica eosinofílica, la peroxidasa eosinofílica, entre otras; además de que en sus gránulos se han detectado citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y TGF- β , que activarán la síntesis de colágeno por los fibroblastos, responsables de las manifestaciones tardías de la enfermedad y favoreciendo el proceso de neo-vascularización.

TIPOS DE CONJUNTIVITIS

En el caso de los pacientes con conjuntivitis alérgicas perenes, se ha reportado que a nivel periférico una disminución en la frecuencia de linfocitos Treg CD4+CD25+, con incremento en el número de células CD4+CCR4+CCR9+ productoras de IL-5, lo que pudiera favorecer la cronicidad de la inflamación ocular.⁶²

Por otra parte, la queratoconjuntivitis alérgica es una de las manifestaciones clínicas más severa, en ella se distingue quemosis, hiperemia conjuntival e hipertrofia papilar difusa, predominantemente localizada en el tarso superior. Las papilas pueden tener un tamaño mayor de 0.3 mm y considerarse papilas gigantes, son de forma poliédrica y en algunos casos se encuentran sobreelevadas del plano conjuntival erosionando la córnea. Además, puede haber un acumulo de moco denso con fibrina entre las papilas, lo que se conoce como signo de Maxwell-Lyons y es común observar un aspecto empedrado de las mismas lo que puede ocasionar blefaroespasmos o pseudoptosis por tallado intenso (Figura 1.5). Las características inmunológicas sistémicas de éste tipo de conjuntivitis no han sido exploradas lo suficientemente.

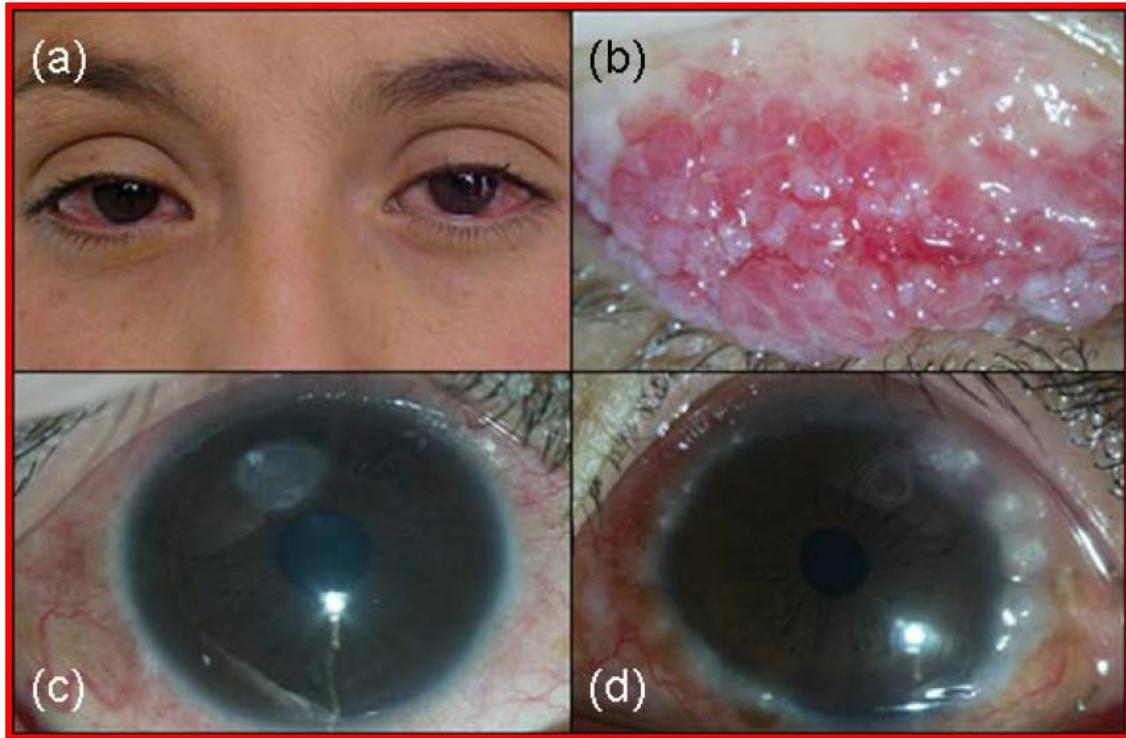


Fig. 1.5 Queratoconjuntivitis primaveral. a) Pseudoptosis e hiperemia conjuntival importante; b) Forma palpebral c) Úlcera corneal en escudo; d) Punto de Horner-Trantas en la forma limbal. Aguliar- Velazquez 2010.⁶¹

Bibliografía

- 1.- ARIA Mexico 2014. Adaptation of the Clinical Practice Guide ARIA 2010 for Mexico. Methodology ADAPTE Rev Alerg Mex 2014;61 Suppl 1: S3-S116.
- 2.- López-López J. 1999 Epidemiología de alergia pediátrica en el Hospital General de México O.D.
- 3.- Toribio E 2001 Conjuntivitis alérgica *Alergia e Inmunol Pediatr*;10 (1):15-19.
- 4.- Pantoja-Meléndez C. 2006 Reporte principales causas de consulta Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana con conjuntivitis alérgica estacional *Revista Alergia México*; 49(4): 105-11
- 5.- Mendez, Huerta et. Al. *Alergia* 2008 Ed Panamericana
- 6.- Leonardi A. 2005 *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 5 (5):464-472.

- 7.-Gill MA. The role of dendritic cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2012) **129**(4):889–901.
- 8.-Salazar F, Sewell HF, Shakib F, Ghaemmaghami AM. The role of lectins in allergic sensitization and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* (2013) **132**(1):27–36.
- 9.-Shakib F, Ghaemmaghami AM, Sewell HF. The molecular basis of allergenicity. *Trends Immunol* (2008) **29**(12):633–42.
- 10.- Willart M, Hammad H. Lung dendritic cell-epithelial cell crosstalk in Th2 responses to allergens. *Curr Opin Immunol*(2011) **23**(6):772–7.
- 11.- Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* (2008) **8**(3):193–204.
- 12.- Setsuya Aiba. Dendritic cells importance in allergy. *Allergology International*. 2007; **56**:201-208
- 13.- Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol*. 2001; **2**:1144–1150. [PubMed: 11713464]
- 14.- Immunity. 2012 Jul 27; **37**(1):25-33. doi: 10.1016/j.immuni.2012.07.003. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. Gurish MF1, Austen KF.
- 15.- Borish L, Joseph BZ. Inflammation and the allergic response. *Med Clin North Am* 1992; **76**:765e87.
- 16.- Kawa Amim The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory medicine* (2012) **106**, 9-14
- 17.-Smyth MJ, Godfrey DI. NKT cells and tumor immunity—a doubleedged sword. *Nat Immunol* 2000; **1**:459–60.
- 18.- Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:211–22.
- 19.- Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in human disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**:227-57
- 20.- Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002; **109**:431-5

- 21.-Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* 2003; 24:207-12.
- 22.- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129-34
- 23.- Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. 1993 Interferon-g regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med.* 177:573-576.
- 24- Coyle AJ, Tsuyuki S, Bertrand C, Huang S, Aguet M, Alkan SS, Anderson GP. 1996. Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol.* 156: 2680-2685.
- 25.- Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. 1999. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol.* 162: 2375-2383.
- 26.- Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest.* 103:175-183.
- 27.- 37. Kay AB. 2006. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy.* 91:59-75.
- 28.-Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJ, Chaplin DD.1999. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest.* 104: 1021–1029
- 29.- Murphy KM, Reiner SL. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2: 933–944.
- 30.- Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002; 109:431-5
- 31.- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129-34.

- 32.- Kato A, Favoreto S Jr, Avila PC, Schleimer RP: TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2007, 179:1080-1087.
19. Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T: Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28:648-654.
- 33.- Hart TK, Blackburn MN, Brigham-Burke M, Dede K, Al-Mahdi N, Zia-Amirhosseini P, Cook RM: Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clin Exp Immunol* 2002, 130:93-100.
- 34.- William et. al. *Toxicologic Pathology*, 40: 205-215, 2012
- 35.- Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al.: Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004, 199:1567-1575
- 36.- John M, Lim S, Seybold J, et al.: Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157:256-262
- 37.- Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, et al.: Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996, 97:1288-1296.
- 38.- Heaton T, Rowe J, Turner S, et al.: An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet* 2005, 365:142-149
- 39.- Koike M, Takatsu K. 2006. IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? *Int Arch Allergy Immunol*. 104: 1-9.
- 40.- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 326:298-304
- 41.- Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, Brenneise IE, Horton MA, Haczku A, Gelfand EW, Leikauf GD, Lee NA. 1997. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*. 185:2143-2156.

- 42.- Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, Delespesse G, Nagai H. 2004. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31: 62-68.
- 43.- Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, Barnes N, Robinson D, Kay AB. 2003. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in 102 the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest.* 112: 1029-1036.
- 44.- Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R et al.: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000, 356:2144-2148.
- 45.- Halim TY, Krauss RH, Sun AC, Takei F: Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 2012, 36:451- 463.
- 46.- Briseno CG, Murphy TL., Murphy KM., Complementary diversification of dendritic cells and innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol.* 2014; 29C:69-78
- 47.- Moisee P., Korn T., Interleukin 17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361:888-898.
- 48.- Wu C., Yosef N, Thalhamer T, et al. Induction of pathogenic Th17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1 *Nature* 2013; 496:513-517
- 49.- Pelletier M, Maggi L, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010; 115:335-343
- 50.- Mizutani N. Nabe T. Yoshino S. IL17A promotes the exacerbation of IL-33 induced airway hiperresponsiveness by enhancing neutrophilic inflammation via CXCR2 signaling in mice. *J Immunol.* 2014; 192:1372-1384
- 51.- Zhao Y, Yang J, et. al. Th17 immunity inn patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151:297-307
- 52.- Malek TR, et al. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* 2002; 17:167-178

- 53.-Barrat FJ, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1) and Th2 -inducing cytokines J Exp Med 2002; 195:603-616
- 54.- Read S. et. al. Cytotoxic T lymphocyte- associated antigen 4 play an essential role in the function of CD25(+) CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J Exp Med 2000; 192:295-302
- 55.- Jelinek DF. 2000 Regulation of B lymphocyte differentiation. Ann Allergy Asthma Immunol.; 84(4): 375-385.
- 56.- Abu El-Asrar, AM., Fatani, RA., Missotten, L. & Geboes, K. (2001). Expression of CD23/CD21 and CD40/CD40 ligand in vernal keratoconjunctivitis. Eye (Lond). pp. 217-224.
- 57.- Allansmith, MR., Hahn, GS., & Simon, MA. (1976). Tissue, tear, and serum IgE concentrations in vernal conjunctivitis. Am J Ophthalmol. pp. 506-511.
- 58.- Valenta R. 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature Rev Immunol.* 2: 446-453
- 59.- Anderson, DF., MacLeod, JD., Baddeley, SM., Bacon, AS., McGill, JL., et al. (1997). Seasonal allergic conjunctivitis is accompanied by increased mast cell numbers in the absence of leucocyte infiltration. Clin Exp Allergy. pp. 1060-1066.
- 60.- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Obayashi M, Toda M. 2003 Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. J Allergy Clin Immunol; 111:1185-99.
- 61.-Aguilar-Velazquez G. 2010. Tesis Doctoral: Estudio comparativo de las citocinas séricas y lagrimal posterior al tratamiento con Factor de Transferencia o Terapia desensibilizante en pacientes con Conjuntivitis alérgica. IPN ENCB.
- 62.-Galicia-Carreón J. 2010 An imbalance between frequency of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and CCR4+ and CCR9+ circulating helper T cells is associated with active perennial allergic conjunctivitis. Clin Dev Immunol. 2013; 2013:919742

Capítulo 2. Papel del *Dermatophagoides ptenonyssinus* en la Alergia

Se le denomina alérgeno a un antígeno que induce la producción de IgE¹. Los aeroalergenos son partículas transportadas por el aire que suelen ser proteínas o sustancias unidas a proteínas, que tienen un peso molecular entre 10-40 kDa.¹

Los aeroalergenos más frecuentes son pólenes, esporas de hongos, ácaros del polvo casero (HDM, siglas en inglés de *House Dust Mite*) y epitelio de animales. Los HDM son los mayormente implicados en las enfermedades alérgicas además de ser la causa más frecuente en lugares cerrados.²

Se conoce que el 1 al 2 % de la población mundial es afectada por HDM, lo que representa aproximadamente entre 65 a 130 millones de personas;³ esta población se encuentra distribuida predominantemente en países occidentales, siendo en Europa la prevalencia de 21% y en E.U y América Latina de 37% debida a *Dermatophagoides pteronyssinus* y 34% a *Dermatophagoides farinae*.

Los ácaros pertenecen al *phylum* Arthropoda, clase Aracnida y orden Acarina. Se alimentan de escamas dérmicas y se encuentran fundamentalmente en el polvo, acumulados en camas, colchones, ropa, muebles tapizados y alfombras. Hay diversos factores que contribuyen a la presencia de los ácaros tanto en el interior como el exterior de las casas, el más importante es la humedad.³ La humedad se encuentra incrementada en el momento en que las personas se acuestan en la cama, por la cual es el sitio preferido para habitar; otros lugares importantes son las alfombras y calentadores.^{4,5}

Las dos especies de ácaros más estudiados son: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) y *Dermatophagoides farinae* (Df) de los cuales se ha estudiado su ciclo de vida. Estos tardan en llegar a la edad adulta entre 3 y 4 semanas y su expectativa de vida adulta es entre 4 a 6 semanas; durante este tiempo las hembras son capaces de arrojar entre 40 a 80 huevecillos. Dp es el ácaro más frecuente en causar cuadros clínicos de rinitis, rinoconjuntivitis, asma y dermatitis atópica.⁶ Su nombre deriva del griego *dermatos* (piel) y *phagos* (comer), "comedores de piel". *Der p* pertenece a una familia de

proteínas con diferentes funciones biológicas que contribuyen a su alergenicidad, a la fecha se han identificado diferentes alérgenos del ácaro, siendo *Der p1* el más inmunogénico de todos.⁷

En la figura 2.1 podemos observar las características estructurales del HDM en relación a su inmunogenicidad. Como por ejemplo la actividad proteasa del grupo 1 *Der p 1* y la interacción con el sistema inmune innato. Se ha observado los efectos de los ácaros tanto en la respuesta inmune innata como en la adquirida. Los componentes que activan la respuesta inmune no solo son las proteasas y los epitopes inmunogénicos sino también los componentes polisacáridicos del esqueleto, los componentes estructurales del microorganismo y los ligandos asociados a los componentes de los ácaros.^{8,9}

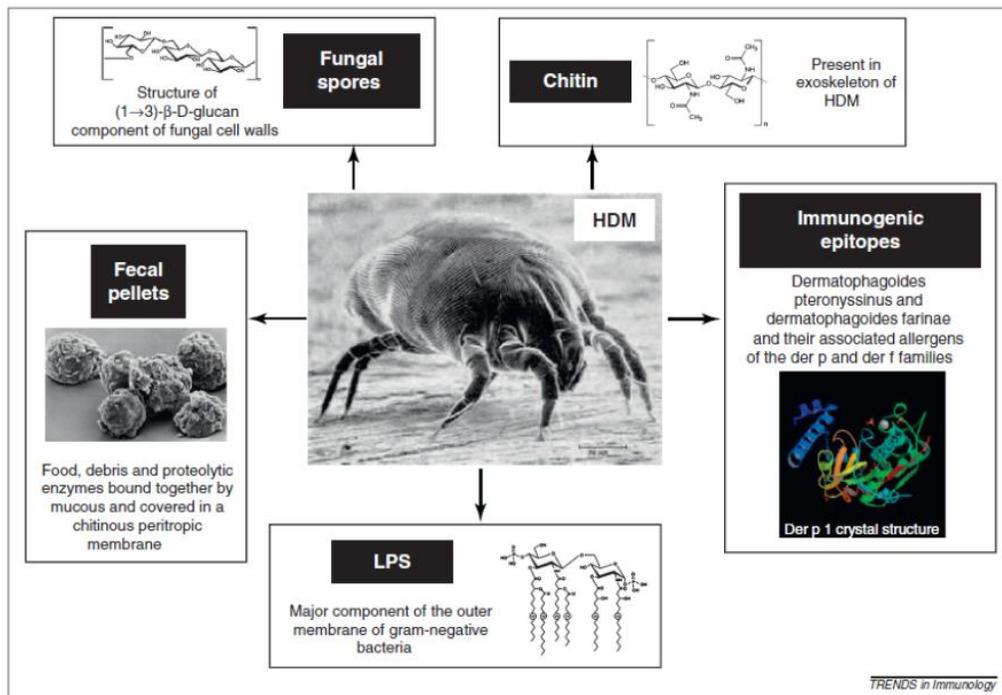


Fig 2.1 Características estructurales de HDM relacionadas con su inmunogenicidad. Propiedades alergénicas de Dp.

Consecuencias funcionales en la respuesta inmunológica de los alérgenos del ácaro del polvo.

Dp puede activar la respuesta inmunológica de diversas maneras, independientemente del reconocimiento Ag-específico y por TCR o BCR, lo que contribuye a su rol patogénico en la enfermedad. A continuación, se describen las diferentes consecuencias funcionales en la respuesta inmunológica, dependiendo de la proteína inmunogénica involucrada,¹⁰ ver también tabla 2.1

a) *Der p1* es una cisteína proteasa que puede ser reconocida específicamente por IgE en basófilos y mastocitos, posee una potente actividad proteolítica en el epitelio, resultando en una serie de respuestas específicas y no específicas. Además, es capaz de regular la permeabilidad de las células epiteliales in vivo. La interacción con células epiteliales induce la secreción de IL-6, IL-8 y mucinas de las glándulas en la submucosa.¹⁰ Este mecanismo de respuesta depende de receptores de actividad proteasa (PARs).

b) *Der p 2* es capaz de inducir altas concentraciones de IgE específica sérica y esto se correlaciona en 79.2% de los pacientes con asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica⁹. Además, activa a las células B mediante TLR4 y de esta forma favorece la síntesis de citocinas como IL-1 β , CXCL10, IL-8, y TNF- α en células B¹¹. De hecho Carpenter y cols demuestran que *Der p 2* facilita la agregación de TLR-4 la cual es necesaria para promover la señalización.

c) *Der p 3* es una serin-proteasa que interactúa con PAR 2 expresada en las células del epitelio pulmonar.¹² *Der p 3* induce la producción de citocinas proinflamatorias factor estimulador de colonias monocíticas y granulocíticas (GM-CSF) y eotaxina. Ambas citocinas están incrementadas en las células epiteliales bronquiales en pacientes asmáticos, además de que juegan un papel importante en el proceso de inflamación y en las alteraciones estructurales de la arquitectura pulmonar en el asma; además, estas

citocinas promueven la acumulación local y la activación de eosinófilos en la mucosa bronquial de los pacientes con asma.¹³

d) *Der p 7* y *Der p 14*. Ambos alérgenos provocan una fuerte producción de IgE en pacientes alérgicos. *Der p 7* es una proteína específica para polipéptido polixim B.¹⁴ se produce en el momento en que las células dendríticas inducen una respuesta Th2 con la producción de citocinas como GM-CSF, TSLP, IL-25 e IL-33.¹⁵ Las células dendríticas son necesarias para la iniciación de la inmunidad Th2, las cuales se reclutan en los nódulos linfáticos mediastinales.¹⁶ Los basófilos también juegan una función importante en la presentación antigénica. La inhalación del alérgeno permite el reclutamiento de eosinófilos en el pulmón. Las proteasas del alérgeno pueden producir contracción del músculo liso y son capaces de activar basófilos en ausencia de antígeno IgE específico.¹⁷ Debido a que *Der p 7* se caracteriza en ser altamente polimórfico y por consiguiente producir una alta reactividad de la IgE.

Der p 14 es un miembro del grupo tipo apoliforina, el cual está unido a proteínas lipídicas¹⁸ Estas partículas han sido asociadas con la habilidad de inducir respuestas Th1, el antígeno envuelto en partículas lipídicas también actúa como adyuvantes Th2. Al igual que *Der p 2*; *Der p 14* puede promover a la producción de IL-13 e IL-4 en células mononucleares de pacientes alérgicos.¹⁴

En la tabla 2.1 se describen las características moleculares y funcionales de los diferentes alérgenos derivados del *Dermatophagoides pteronyssinus*, descritos a la fecha.

Tabla 2.1 Caracterización molecular y funcional de las distintas proteínas alérgicas de Dp

Proteína alérgica	Acción biológica	Peso molecular en kDa	Consecuencias Funcionales
<i>Der p 1</i>	Cistein-proteasa	24	Eliminación de enlaces, disminución en la síntesis de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Desgranulación de eosinófilos y mastocitos. Maduración de fibroblastos y síntesis de colágena.
<i>Der p 2</i>	MD-2 relacionado con el dominio de reconocimiento lipídico	15	Mimetización molecular de MD-2
<i>Der p 3</i>	Tripsina (serin-proteasa)	31	Eliminación de enlaces, disminución en la síntesis de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Desgranulación de eosinófilos y mastocitos. Maduración de fibroblastos y síntesis de colágena.
<i>Der p 4</i>	α -amilasa	60	

<i>Der p 5</i>	<p>Proteína α- helicoidal de función desconocida que se encuentra exclusivamente en ácaros con reactividad cruzada moderada con Der p21</p>	14	<p>A través de ligandos hidrofóbicos estimula la respuesta inmune innata</p>
<i>Der p 6</i>	<p>Quimiotripsina (serin-protesas)</p>	25	<p>Eliminación de enlaces, disminución en la síntesis de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Desgranulación de eosinófilos y mastocitos. Maduración de fibroblastos y síntesis de colágena.</p>
<i>Der p 7</i>	<p>Uniones de Polimyxin Lipopéptido B. Homólogo estructural de proteínas de unión a lípidos</p>	26-30	<p>Se une de forma no específica a LPS, Su estructura es similar a la proteína de unión a LPS e interactúa con el sistema inmune innato.</p>
<i>Der p 8</i>	<p>Glutatión S transferasa</p>	27	

<i>Der p 9</i>	Serín- proteasa colagenolítica	29	Eliminación de enlaces, disminución en la síntesis de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Desgranulación de eosinófilos y mastocitos. Maduración de fibroblastos y síntesis de colágena.
<i>Der p 10</i>	Tropomiosina	36	
<i>Der p 11</i>	Paramiosina	103	
<i>Der p 12</i>	Quitinasa (pérdida de un dominio catalítico)		
<i>Der p 13</i>	Lipocalina y transportador lipídico		
<i>Der p 14</i>	Apolipoforina y alérgeno de alto peso molecular que se encuentra en cuerpos lipídicos y partículas transportadoras	177	Favorece la síntesis de IL-4 e IL-13 en CMN de pacientes alérgicos
<i>Der p 15</i>	Quitinasa		
<i>Der p 18</i>	Quitinasa		
<i>Der p 20</i>	Cinasa de Arginina		
<i>Der p 21</i>	Proteína α - helicoidal de		

	función desconocida que se encuentra exclusivamente en ácaros con reactividad cruzada moderada con <i>Der p 5</i>		
<i>Der p 23</i>	Función desconocida, contiene un dominio homólogo a peritrofin- A	14	

Activación de la Respuesta Inmunitaria

Las moléculas de los componentes de los ácaros varían de diferentes tamaños aproximadamente entre (1.1 a 4.7 μm), las cuales activan la respuesta inmune al ser reconocidas por receptores de actividad proteasa y por TLRs causando que las células epiteliales bronquiales; formen un revestimiento en la pared aérea y se active la respuesta tipo Th2 y la producción de citocinas GM-CSF, TSLP, IL-25 e IL-33,¹⁹ como se muestra en la figura 2.2 la inhalación del alérgeno permite que los eosinófilos y basófilos sean reclutados a pulmón y junto con las células dendríticas circulan por los ganglios mediastínicos.²⁰ Interesantemente los basófilos que se reclutan en el drenaje linfático de los pulmones dependen de la activación de MyD88, vía TLR-4 y a través del receptor ST2 de IL-33²¹

Las citocinas IL-23, IL-33 y la linfopoyetina tímica estromal (TSLP) producen eosinofilia, citocinas Th2 e hiperreactividad bronquial²²⁻²⁴

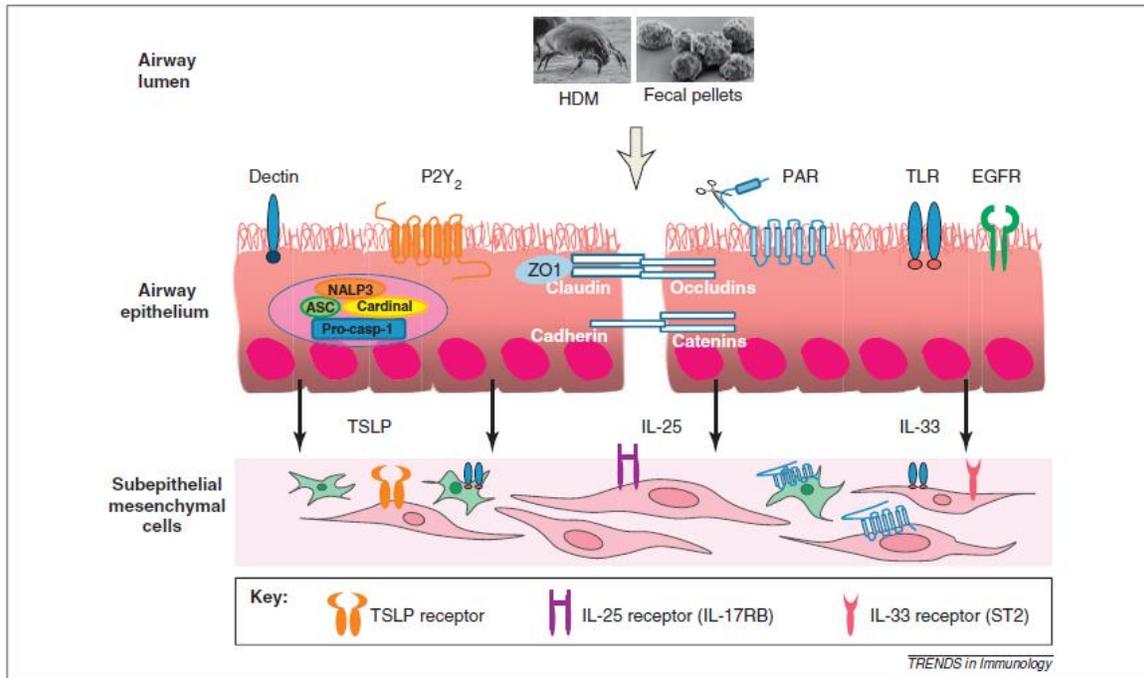


Fig 2.2 Activación del epitelio pulmonar por *Dp.* El esquema muestra los PRRs que pueden expresar las células epiteliales y como el HDM se asocia con estos u otros ligandos que se pueden unir, incluyendo β -glicanos, ATP, proteasas (*Der p* 1, 3, 6 y 9 y endotoxina). La unión de los ligandos con los PRR induce la síntesis de TSLP, IL-25 e IL-33 que actúan en los fibroblastos sub-epiteliales y las células del músculo liso.

En resumen, la constante exposición a *Der p* se traduce en la repetida activación tanto de la respuesta inmune innata como de la adquirida con una elevada producción de citocinas conduciendo al desarrollo de la hiperactividad bronquial debido a una respuesta inflamatoria que induce el reclutamiento de eosinófilos los cuales producen un remodelado constante y la progresión del asma, como se observa en la figura 2.3

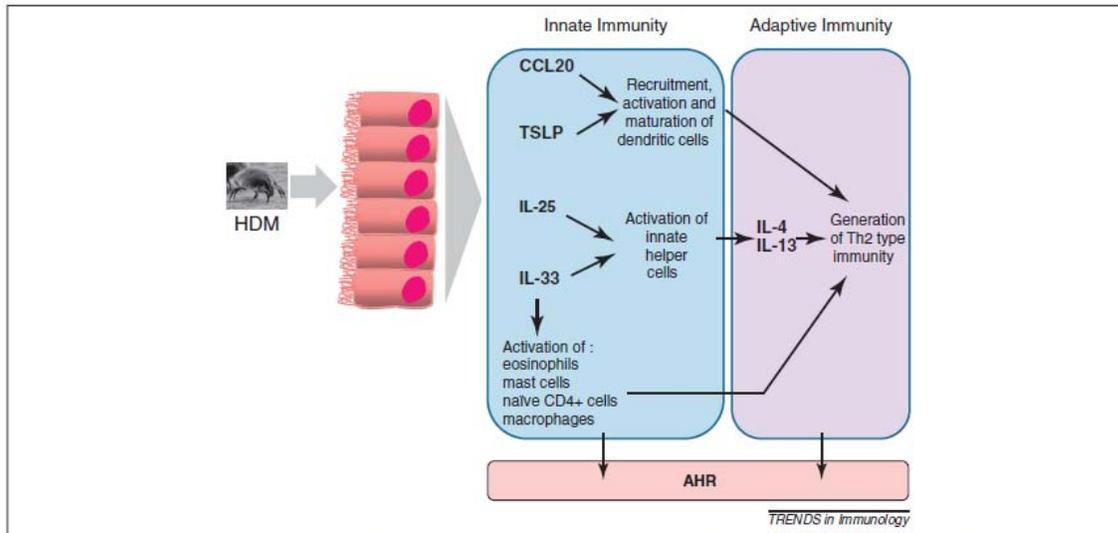


Fig 2.3 Los HDM inducen producción de citocinas en el epitelio. Las citocinas derivadas del epitelio innato TSLP, IL-33, IL-25 y CCL20 son producidas por la inmunidad innata y adaptativa induciendo la activación y la respuesta de hiperreactividad.

En las patologías alérgicas oculares se han considerado varios factores predisponentes como el clima y los alérgenos principalmente a: pólenes, ácaros y epitelio de animales; en varios estudios se ha observado a *Dp* como uno de los agentes causales de la alergia ocular.²⁵ Mimura y colaboradores en Japón reportan que *Dp* es el alérgeno más frecuente presentándose en un 52.5% de los pacientes con alergia ocular,²⁶ mientras que en un estudio similar por Gomes Fernández Pulido y colaboradores en Brasil el 93.2% son *Dp* positivos²⁵ En el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana al realizar el mismo estudio se observó que el 44% de los pacientes con alergia ocular son *Der p* positivos.²⁷ Con estos antecedentes podemos concluir como *Der p* representa la principal causa de alergia en los pacientes con alergias oculares y por esto elegimos a estos pacientes como grupo de estudio.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Voorhorst R et al. Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of the house-dust allergen? *Allerg Asthma*. 1964;10: 329-334
- 2.- Sheng-Jie Yu et al. House dust mite allergy. *Environment evaluation and disease prevention*. *Asia Pac Allergy* 2014; 4:241-252
- 3.- Colhoff MJ. *Dust mites*. (Dordrecht, The Netherlands): Springer, CSIRO Publishing; 2009. Available at: <http://www.publish.csiro.au/pid/6022.htm>. Accessed February 16, 2014
- 4.-Bousquet PJ, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy* 2007; 62:301-9.
- 5.-Bemt L, Vries MP, Knapen L, Jansen M, Goossens M, Muris JWM, et al. Influence of mattress characteristics on house dust mite allergen concentration. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:233-7
- 6.-Kemp, A.S. (2009) Allergic rhinitis. *Paediatr. Respir. Rev.* 10, 63–68;
- 7-Fahlbusch, B. et al. (2003) The effect of storage on allergen and microbial agent levels in frozen house dust. *Allergy* 58, 150–153
- 8.- Jacquet A. Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN Allergy* 2013; 2013:735031
- 9.- Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* 2011; 32:402-11.8.-Van Bronswijk, J.E. and Sinha, R.N. (1971) Pyroglyphid mites (*Acari*) and house dust allergy. *J. Allergy* 47, 31–52

10.-Trombone AP, Tobias KR, Ferriani VP, Schuurman J, Aalberse RC, Smith AM, Chapman MD, Arruda LK. Use of a chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1323.

11.-Tsai JJ, Liu SH, Yin SC, Yang CN, Hsu HS, Chen WB, Liao EC, Lee WJ, Pan HC, Sheu ML. Mite allergen Der-p2 triggers human B lymphocyte activation and Toll-like receptor-4 induction. *PLoS One* 2011;6: e23249.

12.-D'Andrea MR, Derian CK, Leturcq D, Baker SM, Brunmark A, Ling P, Darrow AL, Santulli RJ, Brass LF, Andrade-Gordon P. Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1998; 46:157-64

13.-Soloperto M, Mattoso VL, Fasoli A, Mattoli S. A bronchial epithelial cell-derived factor in asthma that promotes eosinophil activation and survival as GM-CSF. *Am J Physiol* 1991;260(6 Pt 1): L530-8. Mattoli S, Stacey MA, Sun G, Bellini A, Marini M. Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:299-301.

14.-Mueller, G.A. et al. (2010) The structure of the dust mite allergen Der p 7 reveals similarities to innate immune proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 909–917

15.-Hammad, H. and Lambrecht, B.N. (2008) Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 193–204

16.-Hammad, H. et al. (2010) Inflammatory dendritic cells—not basophils— are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J. Exp. Med.* 207, 2097–2111

17.-Siracusa, M.C. et al. (2010) New paradigms in basophil development, regulation and function. *Immunol. Cell Biol.* 88, 275–284

18.-Epton, M.J. et al. (2001) Sensitisation to the lipid-binding apolipoprotein allergen Der p 14 and the peptide Mag-1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124, 57–60.

19.-Barrett, N.A. et al. (2009) Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells, *J. Immunol.* 182, 1119-1128.

20.-Hammond, H. et al. (2010) Inflammatory dendritic cells-not basophils-are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 207, 2097-2111

21.-Kroeger, K. M et al (2009) IL-18 e IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88 and p38alpha-dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.* 86, 769-778.

22.-Angkasekwinai, P. et al. (2007) Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses *J. Exp. Med* 204, 1509-1517.

23.-Kondo, Y. et al. (2008) Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol.* 20, 791-800

24.-Zhou, B. et al. (2005) Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat. Immunol* 6, 1047-1053.

25.-Polido JG. et al. (2015) Correlations Between Allergen-Specific IgE Serum Levels in Patients with Ocular Allergy. *Cornea Sep*;34(9):1092-7

26.- Mimura T, Amano S, Funatsu H, et al. Correlations between allergen specific IgE serum levels in patients with allergic conjunctivitis in spring. *Ocul Immunol Inflamm.* 2004; 12:45–51.

27.- Ayala-Balboa et al. (2009) Frequency of skin reactivity to Allergens in patients with allergic conjunctivitis. *Investigate Ophthalmology and Visual Science.* April 50(13)

Capítulo 3. CD30 y la Alergia

Los primeros datos de CD30 aparecen en los años ochenta reportando que el antígeno Ki-1, como una proteína de membrana expresada en las células de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin. En 1992, CD30 es reconocido como un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF (TNFRSF8) y su ligando, CD30L (CD153), de la superfamilia de los TNF (TNFSF8).¹ En la figura 3.1 se puede observar la estructura molecular y organización del CD30 y CD30L.

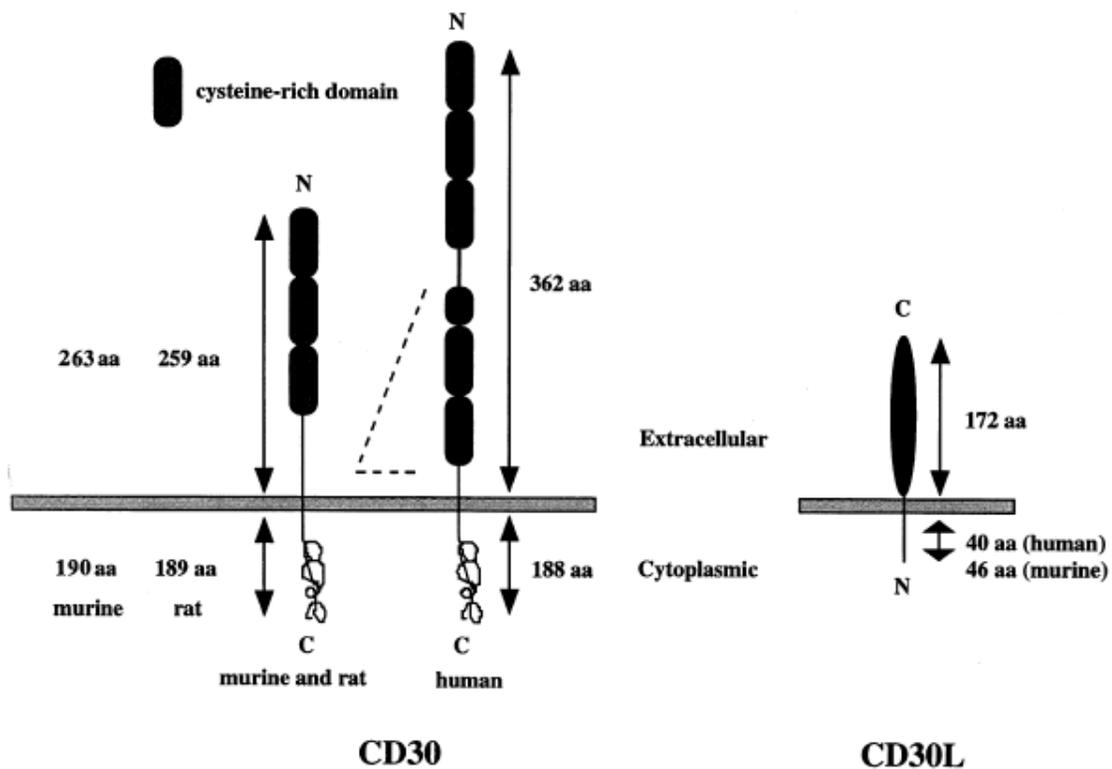


Fig. 3.1 Estructura y organización de la molécula CD30 murino y humana, cada una de ellas con dominios en común y diferencias en su tamaño. (Horie & Watanabe 1998).

CD30 es una glicoproteína transmembranal de 120 kDa con un precursor soluble de 88 KDa.² El dominio extracelular e intracelular contienen 362 residuos de aminoácidos (aa) y 188 residuos de aminoácidos respectivamente;³ en su región citoplasmática tiene dominios de muerte (DD) que son sitios de unión para proteínas adaptadoras como TRADD. Las proteínas TRADD sirven para el acoplamiento de otras proteínas como

TRAF-2 o FADD³. Cuando la señal es mediada a través de TRAF-2, la vía de activación induce la translocación de c-JUN y NFκB al núcleo, produciendo una respuesta de proliferación celular y producción de citocinas proinflamatorias.^{4,5} Sin embargo, cuando la señal es mediada a través de la depleción de TRAF-2 se activan las caspasas induciendo apoptosis.

La activación de las células T necesita de la presencia de moléculas coestimuladoras como CD28, CD27, CD30, CD134, CD137 y CD154. CD30 es expresado en células B y en linfocitos T activados, lo que sucede de 4 a 5 días después de la estimulación *in vitro*.⁶ Se conoce que para llevar a cabo la expresión de CD30 se necesita de la participación de CD28 o de IL-4R.⁷

Además, las señales de CD30 controlan la supervivencia de los linfocitos T, disminuyendo su capacidad citolítica.^{8,9} Por otra parte, CD30 ligando (CD30L, CD153, TNFSF8) es una glicoproteína de membrana de 40 KDa. CD153 se expresa en macrófagos, células dendríticas, células B y linfocitos T activados. CD153 induce señales de activación y diferenciación en linfocitos B.¹⁰

Al unirse CD30 con su ligando se inducen señales que pueden inhibir la actividad de las células por cambios en la expresión génica y de esta forma se altera la actividad citotóxica tanto de las NK, como de los Linfocitos T. Las señales inducidas por CD30 en células de linfoma, regulan a la baja la función y proliferación de los linfocitos efectores, mientras que incrementa la susceptibilidad de señales apoptóticas en las células de los ganglios linfáticos.¹¹

En el modelo murino el RNAm de CD30 es expresado en altas concentraciones en el timo y en bazo, pero no en otros tejidos.¹² Al activar células obtenidas de bazo con anti-CD3, se incrementa la expresión de CD30L, tanto en Linfocitos T CD4⁺, como linfocitos T CD8⁺. Interesantemente, los linfocitos T CD8⁺CD30⁺ producen IL-5 pero no IFN-γ, lo que demuestra la participación de CD30 en la inducción de respuestas Th2/Tc2.¹³ En

el caso de los linfocitos T CD4⁺, la expresión de CD30 aparentemente es regulada por la presencia de CD28, ya que al bloquear CD28 o al inhibir a IL-4, no se expresa CD30.⁷

En un modelo de asma inducido con OVA los ratones “knock out” para CD30, presentan menor inflamación pulmonar, además de disminución en el reclutamiento de eosinófilos en las vías aéreas después del reto antigénico, en comparación con los ratones WT.¹⁴ En el mismo modelo knock out, se observó una disminución significativa de IL-13, IL-5 e IgE en líquido de lavado bronquialveolar, tejido pulmonar y suero. Estos resultados indican que CD30 es un regulador positivo de la respuesta Th2 y un regulador de la producción de IL-13 en las células de memoria del pulmón.¹⁴

sCD30 se puede detectar *in vivo*, en suero, e *in vitro* en sobrenadantes de cultivo. Hay evidencias de que sCD30 se produce en el momento en que se une CD30/CD30L y la producción de sCD30 refleja la señalización dada por el CD30/CD30L.¹⁵ Los niveles de sCD30 son clínicamente relevantes cuando son biológicamente activos. sCD30 reduce la expresión transmembranal de CD30 por un efecto competitivo antagónico actuando como retroalimentación negativa para la señalización de CD30 y reduciendo por lo tanto al CD30L.¹⁶ Los niveles elevados de sCD30 se han encontrado en varias patologías como en el Linfoma, enfermedades infecciosas como VIH, mientras en individuos normales los niveles se mantienen muy bajos. Se le ha dado a sCD30 un papel importante como marcador de actividad de enfermedad y como factor pronóstico de estas.¹⁷⁻¹⁹ Aunque el ligando de sCD30 (sCD30L) se puede detectar en suero, su origen y efectos biológicos no han sido investigados.²⁰

Estudios de la población de linfocitos T CD4⁺ en sangre venosa periférica de individuos alérgicos al estimular con Dp se observó la expresión de CD30.²¹ Algunos autores han descrito a CD30 como marcador Th2 debido a que al medir la producción de citocinas de en la población CD4⁺CD30⁺ de los individuos asmáticos se encuentra una disminución significativa en la producción de IFN- γ ; además que al bloquear CD30 con su ligando se induce una respuesta Th1.²² Un estudio reciente sobre el papel de CD30

en el asma, utilizando un modelo de ratón “knock out” se ha observado disminución en la respuesta inflamatoria, en la producción de citocinas Th2 e IgE sérica; además de su participación disminuyendo la proliferación celular de esplenocitos estimulados con el alérgeno, dejando en claro su participación en la alergia.²³ En un trabajo previo reportamos en células mononucleadas de individuos alérgicos que los linfocitos T CD4+CD30+ en proliferación, son altamente productores de IL-5 y al bloquear la IL-4 o su receptor se observa disminución en la proliferación celular,²⁴ por lo que se hace interesante ver el papel que tiene la proliferación celular, continuar con el estudio de esta población para tratar de conocer los mecanismos que pueden estar involucrados en la causalidad de la enfermedad y estudiar las consecuencias del estímulo constante con *Der p* y en particular en la alergia ocular.

Bibliografía

- 1.-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 that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*. 1992; 68:421-7.
- 2.- *Nature* 1982 299;65-67
- 3.-Wallach, D., Varfolomeev, E.E, et al. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331-367
- 4.-Lee, S.Y., Lee, S. Y., et al *Proc Natl Acad Sci* 1996;93: 9699-9703
- 5.- Ansieu, S., Scheffrahn, et al *Proc Natl Acad Sci* 1996;93: 14053-14058
- 6.-Bowen MA, Lee RK, Miragliotta G, Nam SY, Podack ER. Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. *J Immunol*. 1996; 156:442-9.
- 7.-Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL, Thompson CB. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol*. 1998; 160:2180-7.
- 8.- Chiarle R, Podda A, Prolla G, Podack ER, Thorbecke GJ, Inghirami G. CD30 overexpression enhances negative selection in the thymus and mediates programmed cell death via a Bcl-2-sensitive pathway. *J Immunol*. 1999; 163:194-205.

- 9.-Grell M, et al. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 1999; 18:3034–43.
- 10.- Shanebeck KD, et al. Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur J Immunol.* 1995; 25:2147–53
- 11.- Telford WG, Nam SY, Podack ER, Miller RA. CD30-regulated apoptosis in murine CD8 T cells after cessation of TCR signals. *Cell Immunol.* 1997; 182:125–36.
- 12.-Amakawa R, et al. Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* 1996;84: 551–562.
- 13.- Bowen MA, Lee RK, Miragliotta G, Nam SY, Podack ER. Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. *J Immunol.* 1996; 156:442–9.
- 14.-*J Allergy Clin Immunol* 2006;118:942-8
- 15.-Rossi FM, Degan M, Mazzocut-Zecchin L, et al. CD30L up-regulates CD30 and IL-4 expression by T cells. *FEBS Lett* 2001;508(3):418–22
- 16.- Hargreaves PG, Al-Shamkhani A. Soluble CD30 binds to CD153 with high affinity and blocks transmembrane signaling by CD30. *Eur J Immunol* 2002;32(1): 163–73.
- 17.-Nadali G, Vinante F, Ambrosetti et al. Serum levels of soluble CD30 are elevated in the majority of untreated patients with Hodgkin's disease and correlate with clinical features and prognosis. *J Clin Oncol* 1994; 12:793–797.
- 18.-Pizzolo G, Vinante F, Morosato L, et al. High serum level of the soluble form of CD30 molecule in the early phase of HIV-1 infection as an independent predictor of progression to AIDS. *AIDS* 1994; 8:741–745.
- 19.-Powell IF, Li T, Jack HM, et al. Construction and expression of a soluble form of human CD30 ligand with functional activity. *J Leukoc Biol* 1998;63(6):752–7
- 20.- Leonard C, Torne V, Faul, Burke CM, Poulren LW. 1997 Allergen-induced CD30 expression on T cells o atopics *Clin Exp Allergy*; 27:780-86.
- 21.- Krocze R, et al. 2005 *J Allergy Clin Immunol*; 116:906-909
- 22.- Tobias Polte, et al. Direct evidence for a critical role of CD30 in the development of allergic asthma *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:942-8
- 23.-Garfias Y, Ortiz B, Hernández J, Magaña D, Becerril-Angeles, Zenteno E, Lascurain R. 2006 *Allergy*;61:27-34.

24.-Horie R. and Watanabe T. CD30: expression and function in health and disease. Seminars Immunol 1998; 10:457- 470.

Capítulo 4.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que las células T CD30+ favorecen la cronicidad de la respuesta Th2 en rinitis, asma y dermatitis atópica; sin embargo, se desconoce su participación en la alergia ocular (QCP).

JUSTIFICACIÓN

La alergia ocular es uno de los padecimientos más frecuentes en la práctica clínica; sin embargo, a pesar de su frecuencia, se desconoce la participación de varias poblaciones celulares.

Los linfocitos T CD4+ CD30+ pudieran estar involucradas con la cronicidad de la afección ocular, como se ha demostrado para asma, rinitis y dermatitis atópica. Conocer estos mecanismos permitirá identificar a mayor profundidad la inmunofisiopatología de la conjuntivitis alérgica y en un futuro proponer nuevas intervenciones terapéuticas.

HIPÓTESIS

La proliferación de linfocitos T CD4+ CD30+ obtenidos de pacientes con QCP dependerá de las citocinas Th2, IL-4 e IL-5.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia y función de las células T CD30+ en pacientes con QCP

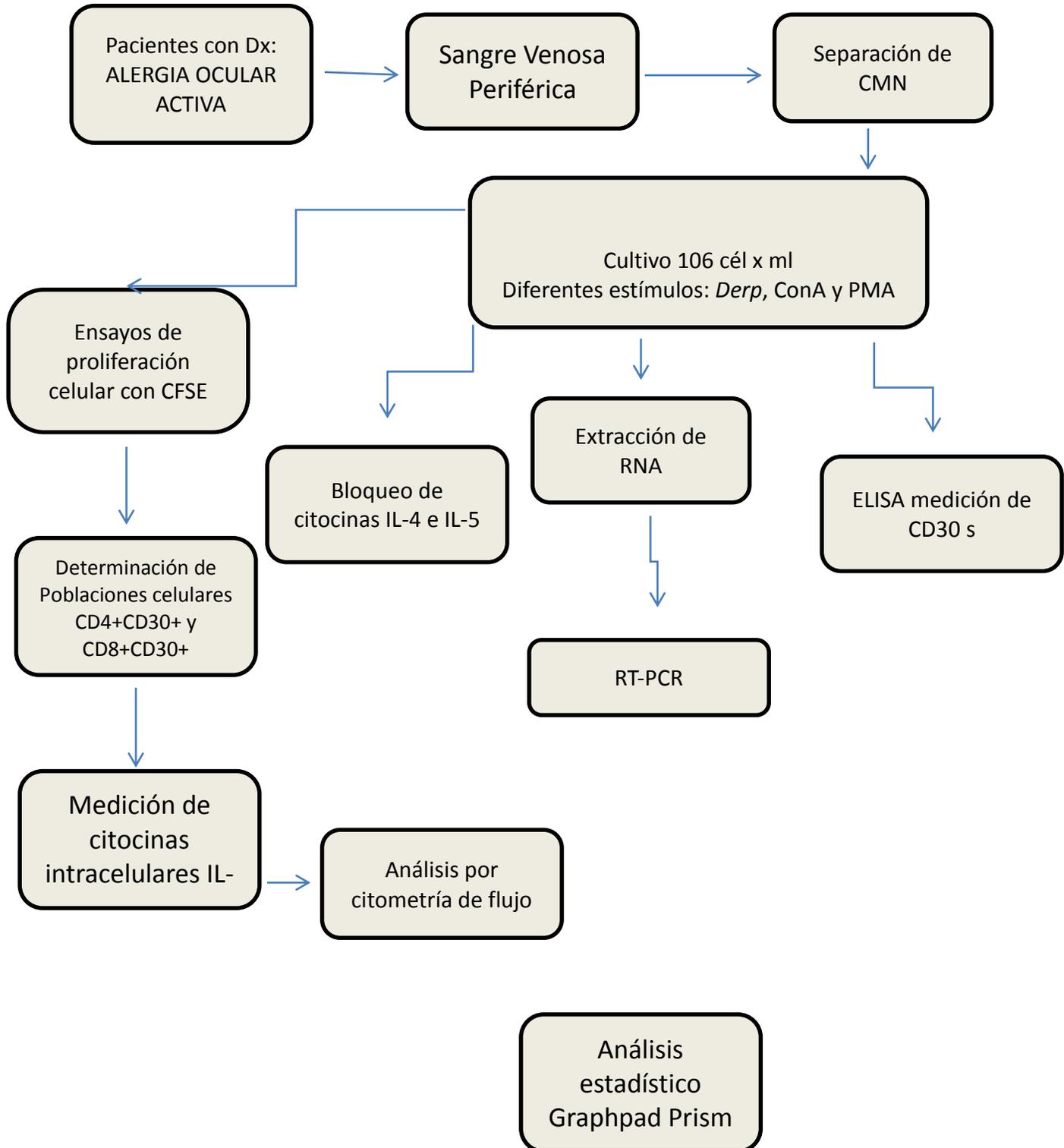
Objetivos particulares.

1. Determinar la expresión de CD30 en células T CD4+ y linfocitos T CD8+ obtenidos de pacientes con QCP.
2. Determinar la proliferación de las poblaciones CD4+CD30+ y CD4+CD30- en presencia de estimulación con *Der p*.

3. Evaluar la producción de citocinas (IL-4, IL-5 e IFN γ) y su asociación con la expresión de CD30 en células T CD4+ estimulados por alérgeno en pacientes con QCP.
4. Determinar la participación de las citocinas IL-4 e IL-5 en la expresión de CD30 en células T CD4+ estimulados por alérgeno.
5. Determinar la producción de CD30 soluble en sobrenadante de pacientes con QCP.

Capítulo 5. Material y Métodos

Figura 5.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Selección de pacientes

En este trabajo se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de QCP, obtenidos de la consulta de inmunología del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana, I. A. P.” Se consideraron los siguientes criterios:

5.1 Criterios de inclusión

1. Cuadro clínico de QCP activa.
2. Pacientes entre 8 y 25 años de edad.
3. Pruebas cutáneas por método de Prick positivas a *Dermatophagoides pteronyssinus*
4. Firma de consentimiento y asentimiento informado de acuerdo a los principios éticos de la declaración de Helsinki, el E11 de la Declaración Internacional de la *Conference of Harmonisation*.

5.2 Criterios de exclusión

1. Pacientes en tratamiento con inmunoterapia, corticoesteroides y/o inmunosupresores sistémicos.
2. Pacientes con diagnóstico de conjuntivitis papilar gigante, o dermatconjuntivitis de contacto.
3. Coexistencia de otra enfermedad oftalmológica inflamatoria.
4. Enfermedades sistémicas coexistentes de carácter endocrino, autoinmune, neoplásicas, infecciosas y crónico degenerativas.
5. Embarazo o lactancia.

5.3 Criterios de eliminación

1. Retiro del Consentimiento Informado.
2. Muestra biológica insuficiente.

5.4 Procedimientos generales

A) Pruebas cutáneas por el método de Prick

Con el paciente sentado y sin haber recibido medicación oral (antihistamínicos o antiinflamatorios) por al menos dos semanas se procedió a limpiar con alcohol la piel de la cara anterior del antebrazo. A continuación, se realizaron marcas para identificar los sitios de colocación de cada alérgeno y se aplicó una gota del antígeno sobre la piel. Una vez aplicados los alérgenos, se efectuó una escarificación en cada sitio de aplicación. Al concluir, se dejó en observación a los pacientes por 20 min y transcurrido este tiempo, se observó la presencia de ronchas en los sitios de aplicación de cada antígeno, comparándose esta en intensidad con la generada por la histamina, considerándose positiva una roncha del tamaño igual o mayor que el testigo; como se observa en la figura 5.1



Figura 5.1 Pruebas cutáneas. Se observa la roncha con eritema en el número 39 que es el que corresponde a Dp.

5.5 Valoración Inmunológica

A) Cultivos celulares

Mediante punción en la vena cefálica o basílica se obtuvieron 4 ml sangre periférica (en tubo con EDTA). En campana de flujo laminar se vertió la sangre en tubo cónico de 15 ml y diluyó Vol. 1:1 con medio RPMI-1640. En otro tubo cónico de 15 ml se colocó 4 ml de Ficoll-Hypaque (polímero de carbohidrato y metrizamida, con densidad definida de 1.077) y con ayuda de una micropipeta se adicionó lenta y cuidadosamente, la sangre-RPMI previamente mezclados. Se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min a 20°C, observándose las diferentes fases de gradiente de densidad (arriba el plasma, debajo la banda de mononucleares, debajo el Ficoll-Hypaque- debajo las células polimorfonucleares (CMN) y eritrocitos. Se obtuvo el anillo de células mononucleares y se colocaron en un

tubo cónico (al cual previamente se le agregaron 4 ml de RPMI-1640); nuevamente se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se re-suspendieron las células. Se completó el volumen con medio RPMI-1640 hasta obtener 1 ml. Posteriormente se realizó el conteo celular por medio de un contador automático (Scepter™ 2.0 Cell Counter) y se colocaron 200,000 células en placas para cultivo celular de 96 pozos con fondo plano (Costar, Corning, NY®) en 200 µl de RPMI-1640 y se incubaron en una atmósfera con 5% CO₂ a 36°C durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo, se cambió el medio por RPMI suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-Glutamina y 10% suero bovino fetal. Para la estimulación celular se utilizó Lectina de *Concanavalin A* ConA (Jack bean) (Sigma Aldrich, MO®) a 10µg/ml o el extracto de Dp (7.5µg/ml). Los cultivos se dejaron durante 24, 72 y 96 horas; 5 horas antes del término de cada estímulo se adicionó Brefeldina A (5 µg/ml) (BD GolgiPlug™ protein transport inhibitor (Brefeldin A) y al finalizar la incubación se determinó el inmunofenotipo asociado y función de las células T.

B) Ensayos de proliferación celular

Después de haber obtenido las CMN se procedió a la determinación de la proliferación celular en cultivo celular en ausencia/presencia de Con A o Dp. Para ello se obtuvieron 10⁷ CMN en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640, se incubaron con 15µl de carboxifluorescein-succimidil-ester (CFSE) a 0.5mM (preparado en dimetil sulfóxido) por 10 min en oscuridad. Posterior a la incubación, se lavaron con 8 ml de medio suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 2mM L-glutamina, 0.1 M β-mercaptoetanol 0.1 M de piruvato de sodio, 100IU/ml de penicilina y 100µl/ml de estreptomina; transcurrido este tiempo se re-suspendieron en 1 ml de medio suplementado y la viabilidad fue determinada por método de exclusión con azul tripano. Las células se cultivaron en placas de 96 pozos en una densidad de 2 x 10⁵ células por pozo en 200µl de RPMI-1640 suplementado, a 37°C en ambiente húmedo, con 5% de CO₂. Se adicionó la concentración óptima del Dp (7.5µg/ml) al momento del cultivo.

Al finalizar el cultivo las células se analizaron por citometría de flujo donde los linfocitos en proliferación se regionalizaron de acuerdo con las características morfológicas (tamaño contra granularidad) de las células. Para observar la intensidad de fluorescencia de las células incubadas con CFSE se utilizó un histograma tomado de la región previamente establecida. La proliferación se observó por la pérdida de la intensidad de fluorescencia de las células.¹

La proliferación celular se evaluó por el índice de división (ID), el cual se calcula de la siguiente manera: $(100-Y) / Y$, donde $Y (\%) = X_0 + X_1/2 + X_2/4 + X_3/8 + X_4/16 + X_5/32 + X_6/64 + X_7/128$ y X_0 representa el número de linfocitos que no se han dividido, en tanto que de X_1 a X_7 se representa el número de divisiones CFSE de acuerdo con lo descrito por Angulo y Fulcher.²

C) Preparación de alérgeno

El extracto de Dp fue obtenido por Allerstand Co. (México) el cual se encuentra libre de fenol, albúmina y glicerol. Se obtiene de un liofilizado que contiene 100 000 U de extracto alérgico. Una vez reconstituido en 5 ml de solución diluyente, cada mililitro contiene: extracto alérgico 20 000 U; fenol 4 mg; seroalbúmina humana 0,3 mg; cloruro de sodio 8 mg; cloruro de potasio 0,2 mg; fosfato de sodio dibásico 1,2 mg; fosfato de potasio monobásico 0,2 mg; agua inyectable c.s.p. 1 ml.

La concentración de endotoxina del Dp fue medida por QCL-1000 de acuerdo con las instrucciones de manufactura. El contenido de la endotoxina encontrado en las muestras fue menor a 0.01EU/ml.

La concentración de la proteína de Dp fue determinada por método de Bradford y analizado en Gel electroforesis de poliacrilamida al 10% (PAGE) acorde con el método de Laemmli.

La concentración de endotoxina del extracto fue medido por QCL-1000 de acuerdo con las instrucciones de manufactura. El contenido de la endotoxina

encontrada en las muestras fue menor a 0.1 EU/ml, de esta manera fueron utilizados para cultivos celulares.

D) Estimulación *ex vivo* con alérgeno y bloqueo de IL-4 e IL-5

Las células obtenidas y tratadas con CFSE fueron estimuladas con óptimas de Dp al inicio del cultivo y posteriormente a los 3 y 5 días en presencia de anticuerpos anti-IL-4 (10µg/ml) en placas de cultivo y se mantuvieron en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ en ambiente húmedo hasta el día 7 para ser analizados por citometría de flujo.

E) Marcaje de moléculas de membrana y marcaje intracelular de citocinas

Para el marcaje de proteínas de membrana después del estímulo, se realizó inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos dirigidos hacia CD4-QR, CD8-PE, CD30-PE o CD30 FITC, se adicionó cada uno y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. A continuación, las células fueron lavadas con 500µl de PBA (PBS 1X Albúmina 0.1%-Azida de Sodio), se centrifugaron a 1.5 x 1000 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante (éste se almacenará en tubos eppendorf de 0.2ml a -20°C). Posteriormente se fijaron y permeabilizaron las células por medio de BD Cytofix/Cytoperm™ según las especificaciones del fabricante. Se procedió al marcaje intracelular de IL-4, -5 e IFN-γ con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromo, se adicionó e incubó por 30min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las células con PBA, se centrifugaron a 1.5 x 1000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se resuspendió y adicionaron 500µl de FACS Flow. El análisis de la expresión de las proteínas de membrana e intracelulares se determinó mediante citometría de flujo.

F) Análisis de resultados por citometría de flujo

Las muestras se analizaron en un citómetro FACS Calibur Cell Sorter BD Biosciences™ equipado con la aplicación BD CellQuest software® Versión 6.0.1. Inicialmente se estableció una ventana para determinar sus características morfológicas (tamaño/granularidad). Posteriormente, se realizó una segunda ventana para determinar las características inmunofenotípicas de las células cosechadas, determinando el porcentaje de células CD4⁺CD30⁺ y CD8⁺CD30⁺. Los datos se presentan en gráficas de puntos e/o histogramas a 10000 eventos capturados.

G) Determinación de CD30 Soluble

La determinación de CD30 en sobrenadante se realizó mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) con el kit Human sCD30, (Kamiya Biomedical Company, Seattle WA). Para ello se obtuvieron los sobrenadantes de las células cultivadas de los pacientes de acuerdo a las especificaciones del fabricante y la placa se leyó a 620nm en un espectrofotómetro (*ThermoLab Systems, Multiskan Ascent*, Finland). Los resultados serán expresados en pg/ml.

H) Extracción de RNA

Se realizó mediante el kit RNeasy de QIAGEN. Un millón de células mononucleares fueron empleadas para la extracción de RNA. La determinación de células se realizó mediante conteo por cámara de Neubauer. Por centrifugación a 3500 rpm se obtuvo el pellet celular y se re-suspendió en 100 µl de buffer PBS1X. Para lisar las células, 350µl de buffer RLT fueron agregados. El lisado celular fue colocado en el interior de una columna QIAshredder (QIAGEN) y mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 2 minutos para obtener el homogenizado celular. El RNA adherido a la membrana del interior de la columna fue lavado con diferentes buffers seguidos de centrifugación por 1 minuto a 10000 rpm. Inicialmente se agregaron 700µl de buffer RW1. Posteriormente se realizaron dos lavados con buffer 500 µl de buffer RPE. Finalmente, la columna conteniendo el RNA lavado se colocó en un tubo de 1.5

ml y el ácido nucleico fue eluído con 50µl de agua libre de RNAsas por centrifugación a 12,000 rpm durante 1 minuto. El RNA obtenido fue cuantificado por lectura de densidad óptica a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. La integridad del RNA se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia. La razón de pureza varió entre 1,111 y 2,091. No se observó degradación total de ninguna de las muestras.

I) RT-PCR

Para la generación de cDNA 2 µg de RNA se mezclaron con 10 µl de 5x RT-PCR buffer, 0.5 µl de oligo (dT), 1 µl retrotranscriptasa (RT) y agua libre de RNAsas. El volumen final de reacción fue de 50 µl. Las condiciones para el RT-PCR fueron: desnaturalización a 95°C por 1 minutos, alineamiento a 50°C por 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto. Se realizaron 25 ciclos. A partir de los cDNAs obtenidos, se amplificaron las regiones de interés de PGK1 Y CD30 por PCR punto final. El cDNA fue cuantificado por nanodrop y 2 µl fueron mezclados con 10 µl de 5x buffer Taq polimerasa, 2 µl de una mezcla de dNTPs (conteniendo 10 mM de cada dNTP), 0.5 µl de primer forward y reverso (PGK1F5'-ATTAGCCGAGCCAGCCAAAATAG-3', PGK1R 5'-ATTAGCCGAGC CAGCCAAAATAG-3' ó CD30F 5'-ACTCTGGCTCTGTGCCTTGT-3' y CD30R 5'-AATGGAGCCCTTTTCAGGA-3') y 1 µl de enzima Taq Polimerasa. El volumen final de reacción fue de 50 µl. Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización a 95°C por 1.30 minutos, alineamiento 60°C para PGK y 45°C para CD30, extensión a 72°C por 1 minuto. Se realizaron 38 ciclos de temperatura. Los productos de PCR (200 pb para PGK y 468 pb para CD30) fueron separados por electroforesis empleando un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X, teñido con bromuro de etidio y visualizados mediante transiluminador.

J) Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó la t de student o U-Mann Whitney dependiendo de la distribución de las muestras, considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó con el programa Graphpad Prism software v.6.0.

Bibliografía

- 1.- Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 1994; 171:131-137.
- 2.- Angulo, Fulcher. Cytometry. 1998 Jun 15;34(3):143-51.

Hipere mia Conju ntival e hincha zón (ronch a)	Hipere mia 1+ con 1/3 edema de aspect o rosado sin plica formac ión en fondo de saco	Hipere mia 1+ con 1/3 edema de aspect o rosado sin plica formac ión en fondo de saco	Hipere mia 1+ con 1/3 edema de aspect o rosado sin plica formac ión en fondo de saco	Hipere mia >3+ Con más de 2/3 edema conjunt ival localiza do conges tión de vesícul as ciliares . Moder ada plica formac ión en fondo de saco	Sin hipere mia o edema	Hipere mia >3+ Con más de 2/3 edema conjunt ival localiza do conges tión de vesícul as ciliares . Moder ada plica formac ión en fondo de saco	Hipere mia 1+ con 1/3 edema de aspect o rosado sin plica formac ión en fondo de saco	Hipere mia 1+ con 1/3 edema de aspect o rosado sin plica formac ión en fondo de saco	Sin hipere mia o edema
Descar ga Conju ntival	Descar ga acuosa clara y con leves detritu s	Descar ga acuosa clara y con leves detritu s	Descar ga acuosa clara	Descar ga acuosa clara	Descar ga acuosa clara y con leves detritu s	Descar ga acuosa clara	Descar ga acuosa clara	Descar ga acuosa clara	Descar ga acuosa clara
Respu esta inflam atoria en conjun tiva tarsal	Menos que 1/3 papilas tarsale s de 0.3 tamaño con vesícul as unifor mes en conjunt iva tarsal	Menos que 1/3 papilas tarsale s de 0.3 tamaño con vesícul as unifor mes en conjunt iva tarsal	1/3 a 2/3tar sal moder adas papilas tarsale s de 0.3 -0.5 de tamaño con vesícul as unifor mes en conjunt iva tarsal	Mas de 2/4 papilas tarsale s con tamaño de 0.75 con fibrosis y vesicul as tarsale s irregul ares.	Menos que 1/3 papilas tarsale s de 0.3 tamaño con vesícul as unifor mes en conjunt iva tarsal	Alguna s papilas tarsale s con fibrosis y sin presen cia de vesicul as tarsale s visibles	Alguna s papilas tarsale s con fibrosis y sin presen cia de vesicul as tarsale s visibles	1/3 a 2/3tar sal moder adas papilas tarsale s de 0.3 -0.5 de tamaño con vesícul as unifor mes en conjunt iva tarsal	Alguna s papilas tarsale s con fibrosis y sin presen cia de vesicul as tarsale s visibles
Involuc ro limbal	Limbo no visible, nódulo s o puntos.	Limbo no visible, nódulo s o puntos.	Limbo no visible, nódulo s o puntos.	Manch as general izadas en el limbo con con presen cia de fibrosis y pigmen tación en mas de la mitad de LSCD	Limbo no visible, nódulo s o puntos.	Moder ado pigmen to en más de la mitad de LSCD	Moder ado pigmen to en más de la mitad de LSCD	Mas de la mitad con presen cia de manch as en el limbo y ligera pigmen tación en la mitad de LSCD	No hay presen cia visible de nódulo s o manch as

Involucro corneal	¼ de SPK sin compromiso del eje visual	No SPK	Queratocono con leucoma central	SPK generalizado con compromiso del eje visual	Queratocono con leucoma central	¼ de SPK sin compromiso del eje visual	Uno ¼ de SPK sin compromiso del eje visual	Leve SPK sin involucro central	Leve SPK sin involucro central
Promedio total y severidad	5 (leve)	3(leve)	5(leve)	3(leve)	6(leve)	7(leve)	10(leve)	6(leve)	6(leve)

Número de paciente	10	11	12	13	14	15	16	17
Sexo	F	M	M	F	M	F	M	F
Posición del párpado y aspecto de la piel	Edema del párpado superior y leve pseudoptosis(2)	Sin edema en párpado (0)	Sin edema en párpado (0)	Sin edema en párpado (0)	Sin edema en párpado (0)	Sin edema en párpado (0)	Edema de párpado sin líneas de Dennie (1)	Sin edema en párpado (0)
Margen del párpado y línea de Marx (Eyelid margin Marx's line)(MGD)	Sin desplazamiento de MCJ (0)	Sin desplazamiento de MCJ (0)	Sin desplazamiento de MCJ (0)	Sin desplazamiento de MCJ (0)	Sin desplazamiento de MCJ (0)			
Hiperemia Conjuntival e hinchazón (roncha)	Hiperemia 1+ con 1/3 edema de aspecto rosado sin plica formación en fondo de saco (1)	Hiperemia 1+ con 1/3 edema de aspecto rosado sin plica formación en fondo de saco (1)	Hiperemia 1+ con 1/3 edema de aspecto rosado sin plica formación en fondo de saco (1)	Hiperemia 1+ con 1/3 edema de aspecto rosado sin plica formación en fondo de saco (1)	Sin hiperemia o edema (0)	Hiperemia >3+ Con más de 2/3 edema conjuntival localizado congestión de vesículas ciliares. Moderada plica formación en fondo de saco (3)	Hiperemia >3+ Con más de 2/3 edema conjuntival localizado congestión de vesículas ciliares. Moderada plica formación en fondo de saco (3)	Hiperemia 1+ con 1/3 edema de aspecto rosado sin plica formación en fondo de saco (1)

Descarga Conjuntival	Descarga acuosa clara y con leves detritus (1)	Descarga acuosa clara y con leves detritus (1)	Descarga acuosa clara (1)	Descarga acuosa clara (1)	Descarga acuosa clara y con leves detritus (1)	Descarga acuosa clara (1)	Descarga acuosa clara (1)	Descarga acuosa clara (1)
Respuesta inflamatoria en conjuntiva tarsal	Menos que 1/3 papilas tarsales de 0.3 tamaño con vesículas uniformes en conjuntiva tarsal (1)	Menos que 1/3 papilas tarsales de 0.3 tamaño con vesículas uniformes en conjuntiva tarsal (1)	1/3 a 2/3 tarsal moderadas papilas tarsales de 0.3 - 0.5 de tamaño con vesículas uniformes en conjuntiva tarsal (2)	Menos que 1/3 papilas tarsales de 0.3 tamaño con vesículas uniformes en conjuntiva tarsal (1)	Menos que 1/3 papilas tarsales de 0.3 tamaño con vesículas uniformes en conjuntiva tarsal (1)	1/3 a 2/3 tarsal moderadas papilas tarsales de 0.3 - 0.5 de tamaño con vesículas uniformes en conjuntiva tarsal (2)	Cobblestone presentación de papilas. Más que 2/3 papilas tarsales de 0.75 tamaño. (3)	Cobblestone presentación de papilas. Más que 2/3 papilas tarsales de 0.75 tamaño. (3)
Involucro limbal	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)	Limbo no visible, nódulos o puntos. (0)
Involucro corneal	No SPK (0)	No SPK (0)	Leve SPK sin involucro central (1)	No SPK (0)	Queratocono sin leucoma central (4)	Leve SPK sin involucro central (1)	Uno ¼ de SPK sin compromiso del eje visual (2)	Leve SPK sin involucro central (1)
Promedio total y severidad	5 (leve)	3 (leve)	5 (leve)	3 (leve)	6 (leve)	7 (leve)	10 (leve)	6 (leve)

Dermatophagoides pteronyssinus

Con la finalidad de conocer la presencia de proteínas del Dp, se realizó un estudio electroforético del alérgeno Dp (*Allerstand*, MEX) utilizado durante la estimulación de los cultivos de CMN.

Como primer paso se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford¹. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliácridamida al 10% de acuerdo con el método de Laemmli², se colocaron 30 µg del extracto de alérgeno y se realizó una tinción de plata tal como se observa en la Figura 6.1. El carril A corresponde a los marcadores de peso molecular; en el carril B se observan las

diferentes proteínas contenidas en el extracto alergénico podemos identificar varias bandas de las cuales por peso molecular podrían estar representando diferentes proteínas de *Der p* tal como se presentó en la tabla 2.1 sobre características moleculares del Dp.

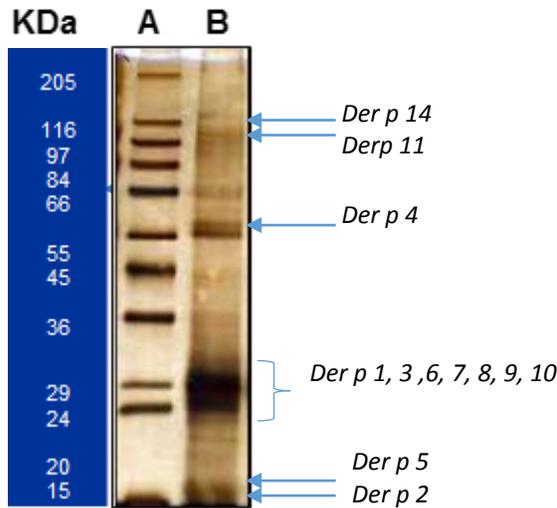


Figura 6.1 Perfil electroforético en SDS-PAGE 10%. Línea A: Marcadores de peso molecular. Sigma Marker™ de alto rangoSigma (St. Louis, MO, USA). Línea B: proteínas del alérgeno Der p (20µg) al 10%. Las flechas señalan las proteínas antigénicas conocidas de Dp.

Determinación de la concentración óptima de *Dermatophagoides pteronyssinus* para inducir proliferación celular.

Para establecer la concentración óptima de estímulo con Dp y el tiempo adecuado de cultivo para obtener la capacidad máxima de proliferación celular, se realizaron cultivos celulares de CMN obtenidas de individuos sanos y de pacientes alérgicos Dp positivos seleccionados de la consulta de Inmunología del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana estimulados con *Der p* durante 3, 5, 7, 10 y 15 días, a diferentes concentraciones. Para llevar a cabo este análisis como se presenta en la figura 6.2 primero se realizaron gráficas de puntos en las cuales se regionalizó por tamaño contra granularidad el sitio correspondiente a la población de los linfoblastos, la gráfica de puntos derecha representa el control sin estímulo y la gráfica de puntos izquierda como

proliferan los linfoblastos, a los 7 días de estímulo. Posteriormente se ejemplifica la proliferación celular con un histograma donde se puede observar las divisiones celulares. El análisis de la proliferación celular se realizó mediante dos técnicas como se representan en las gráficas. En la gráfica de la derecha por medio del método de incorporación de timidina tritiada donde se observó a diferentes días de cultivo 3, 5 y 7 días, observando la mayor cantidad de cuentas por minuto a los 7 días de cultivo con el estímulo de Dp. En la gráfica de la izquierda se representó una cinética donde se determinó la concentración óptima del alérgeno para inducir la proliferación celular, por lo cual se utilizó diferentes concentraciones y se probó tanto en individuos sanos, como en pacientes alérgicos. A dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó un incremento del doble a comparación de lo que se observa en un individuo sano; en la dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó un incremento de 3.6 veces mayor a lo observado con la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a la dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ disminuye el efecto proliferativo. Estos resultados se obtienen a un tiempo de cultivo de 7 días y con ellos se puede concluir que la dosis óptima para llevar a cabo la proliferación de linfoblastos en cultivos celulares con pacientes alérgicos estimulados con Dp es de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Estrategia de análisis

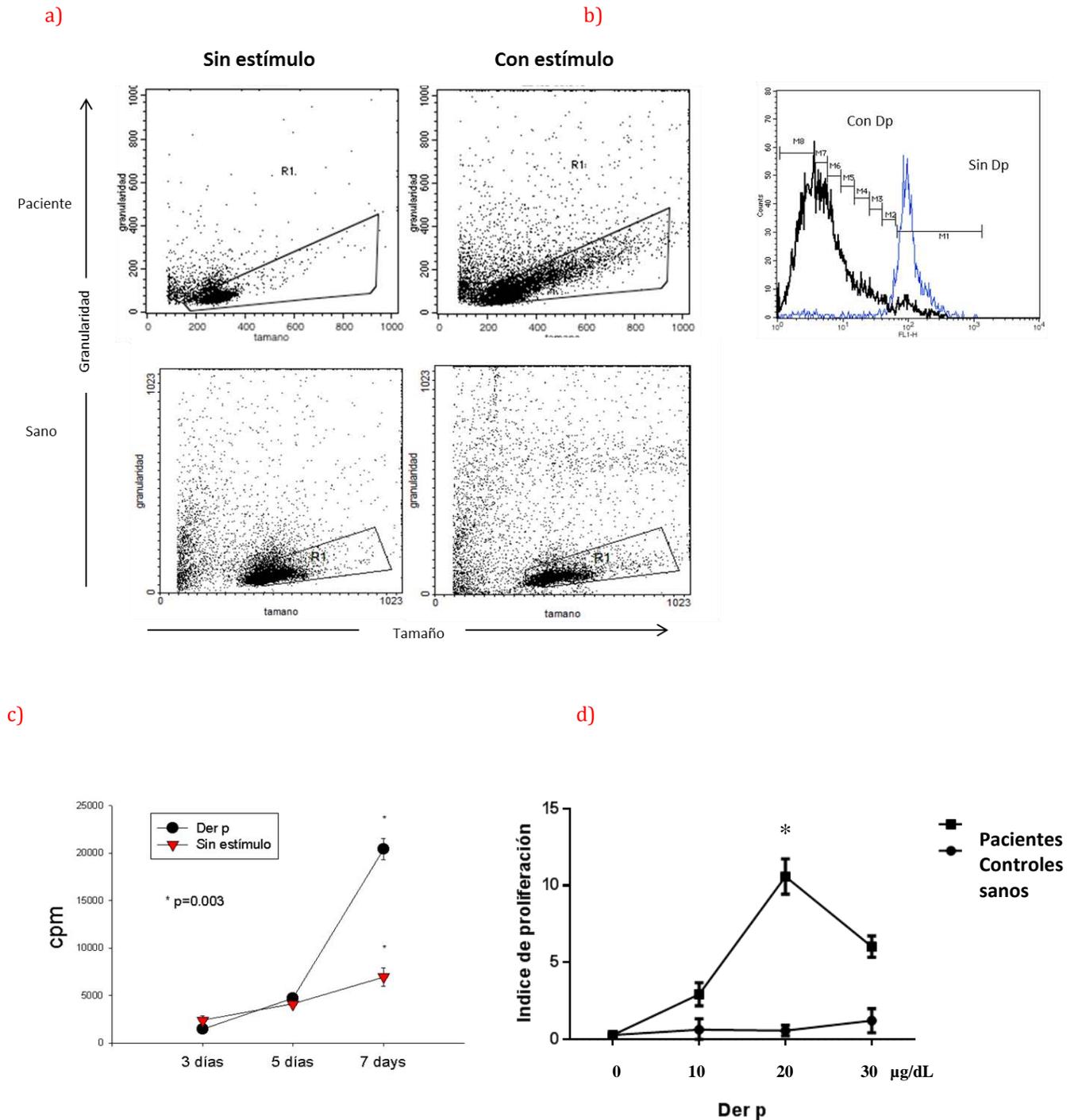
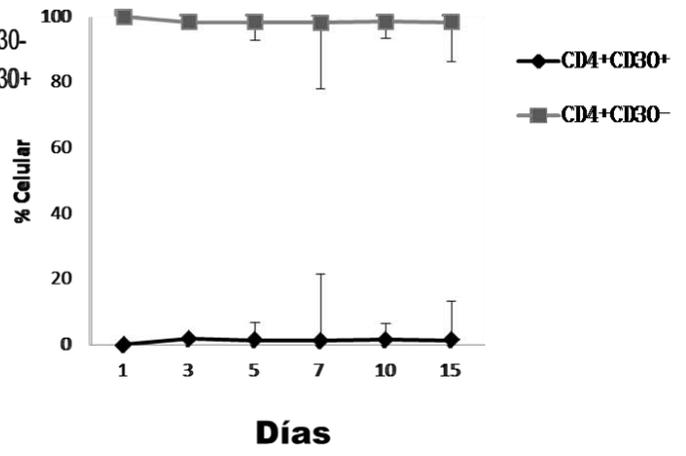
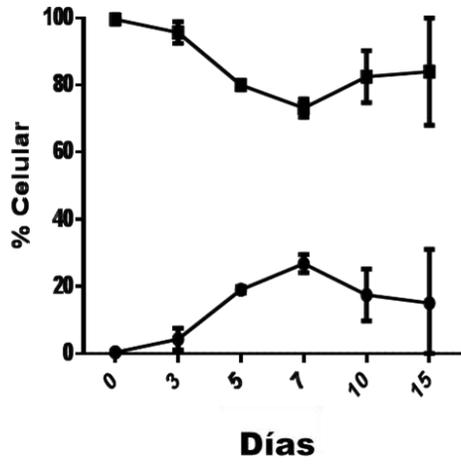


Figura 6.2 Inciso a) Gráficas de puntos que representa la región analizada del sitio de proliferación de linfoblastos de pacientes y de sanos lo cual se representa posterior con un histograma b) reducción de la intensidad de la fluorescencia analizado por la técnica de CFSE, c) Gráfica que representa incorporación de timidina tritiada a las 18 hrs antes $1 \mu\text{Ci}/2 \times 10^5$ células mononucleadas de paciente con QCP. Y d) Gráfica de proliferación celular determinado por el índice de proliferación en una cinética de estimulación de CMN de individuos sanos y pacientes en dosis crecientes de *Der p* durante 7 días de cultivo; $n = 4$. $p < 0.05$.

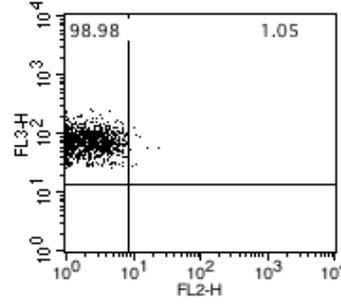
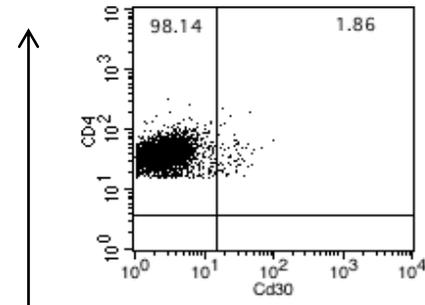
La estimulación con *Dermatophagoides pteronnyssinus* mantiene en proliferación a la población de células T CD4+CD30+ *ex vivo*.

Se llevó a cabo la proliferación celular inducida con el estímulo del *Der p* a diferentes días de cultivo de linfocitos de pacientes con QCP y controles sanos. Conforme reporta Garfias et al⁴ se observó un aumento de la proliferación celular y de la población de linfocitos T CD4+CD30+, sin embargo, se desconocía si la estimulación con el Ag podría mantenerse por más tiempo, por lo que se decidió llevar el tiempo de cultivo hasta los 15 días. La gráfica 6.3 nos muestra el aumento de la proliferación celular de linfocitos, donde al quinto día ha proliferado casi un 20% de la población de linfocitos CD4+CD30+, con un pico de proliferación a los 7 días, disminuyendo lentamente hasta llegar a los 15 días. En contraste, la población CD4+CD30- va disminuyendo progresivamente hasta el séptimo día y se incrementa paulatinamente hasta llegar a los 15 días. Se muestran las gráficas de puntos de pacientes y controles sanos.

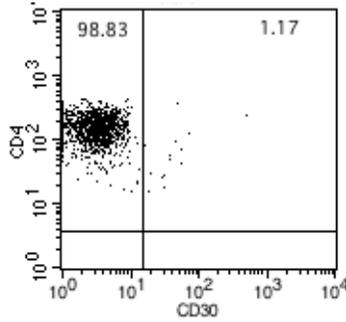
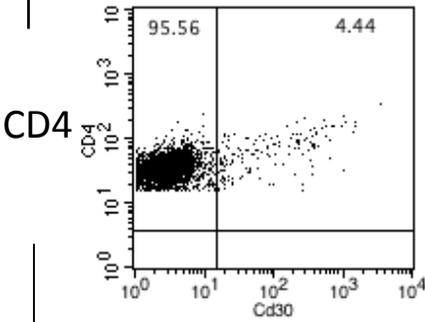


PACIENTE

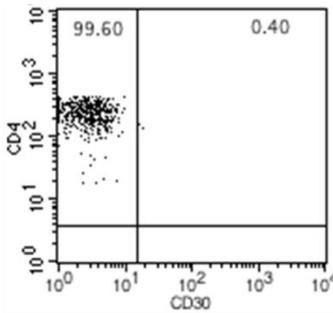
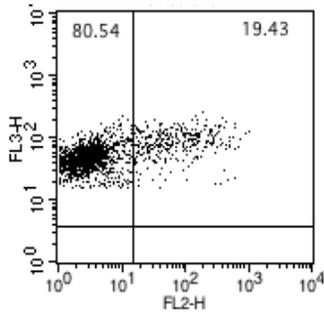
SANO



0 días



3 días



5 días

CD4

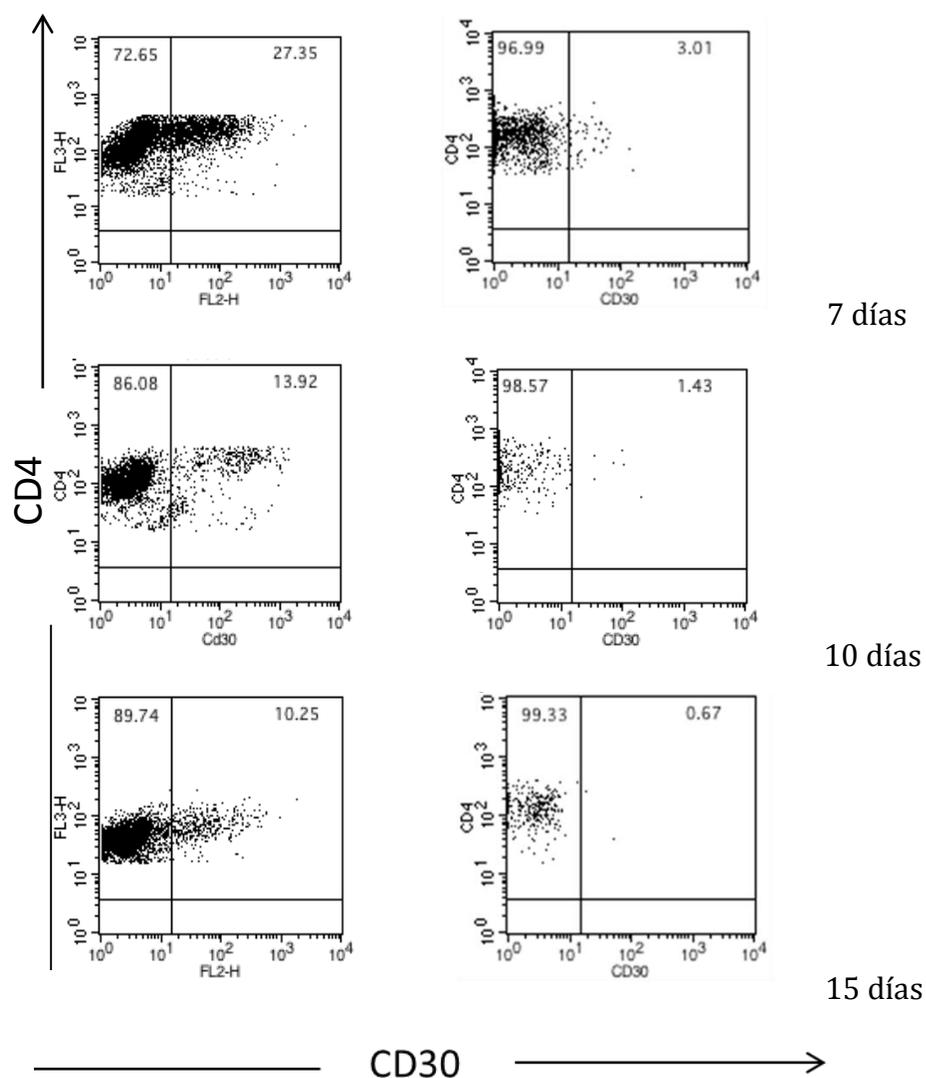


Figura 6.3 Comparativa de la cinética de porcentaje de proliferación con respecto al tiempo en linfocitos y células T CD4+CD30+ y células T CD4+CD30- de un cultivo de CMN estimuladas con Dp. La gráfica derecha representa las subpoblaciones en los pacientes y la gráfica de la izquierda de sanos. Posteriormente se muestran las gráficas de puntos por días de los pacientes y sanos.

Las poblaciones de linfocitos T CD4+CD30+ y CD8+CD30+ en circulación en la sangre periférica de pacientes con QCP no se encuentran incrementadas

Fue necesario determinar si la población de linfocitos T CD30+ se encontraba en sangre periférica y si existían diferencias en la frecuencia de esta población entre los individuos sanos y pacientes con QCP. No se encontraron diferencias estadísticamente

significativas en el porcentaje de las poblaciones $CD4^+CD30^+$ y $CD8^+CD30^+$ ex vivo (Ver gráfica de puntos 6.4 y tabla 6.2).

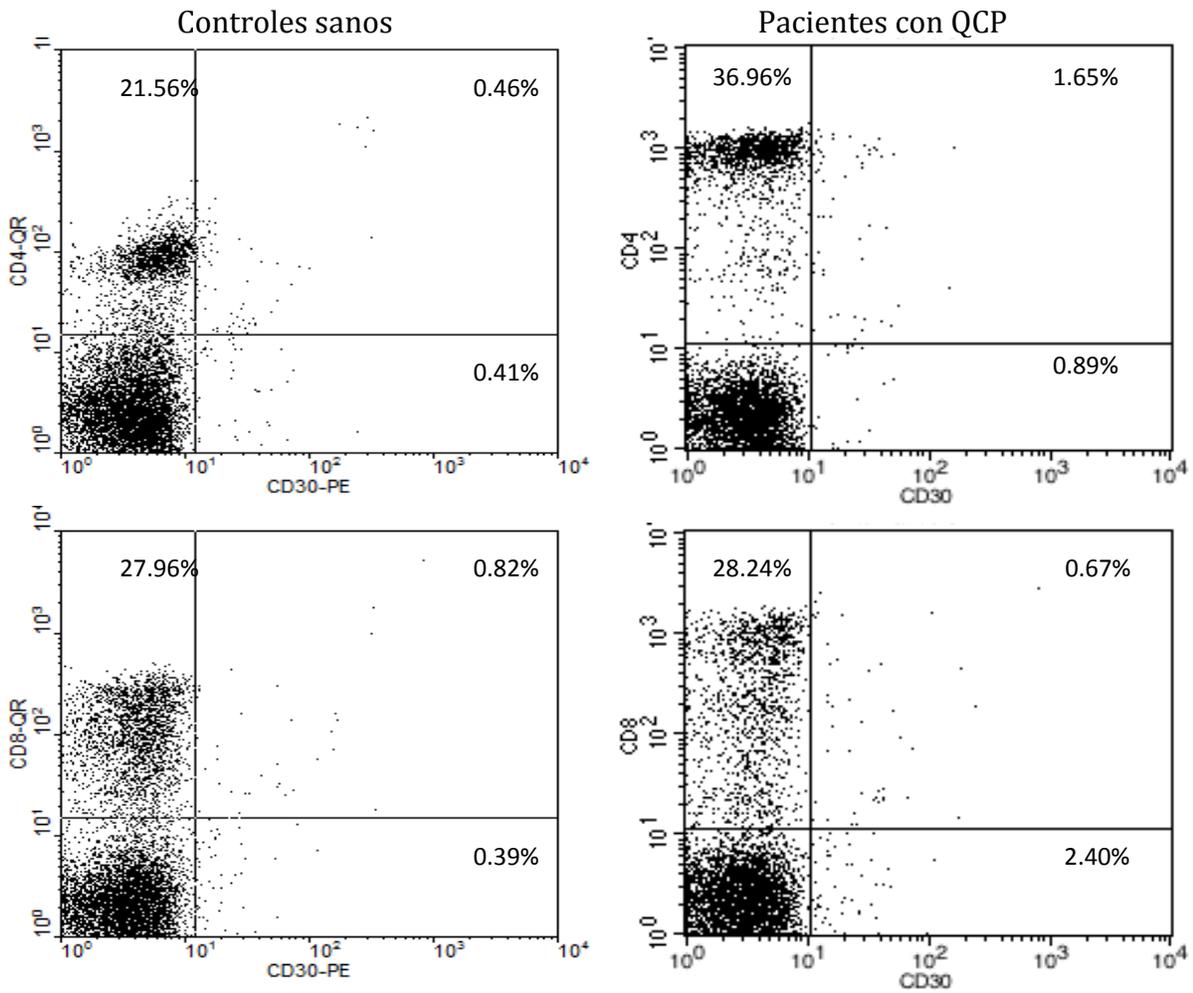


Fig. 6.4 Gráfica de puntos de la subpoblación de linfocitos T $CD4^+CD30^+$ y $CD8^+CD30^+$ de controles sanos y pacientes con QCP obtenidos de sangre venosa periférica ex vivo.

Tabla 6.2 Porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD30⁺ y CD8⁺CD30⁺ entre sujetos sanos y pacientes con QCP. MD Mediana

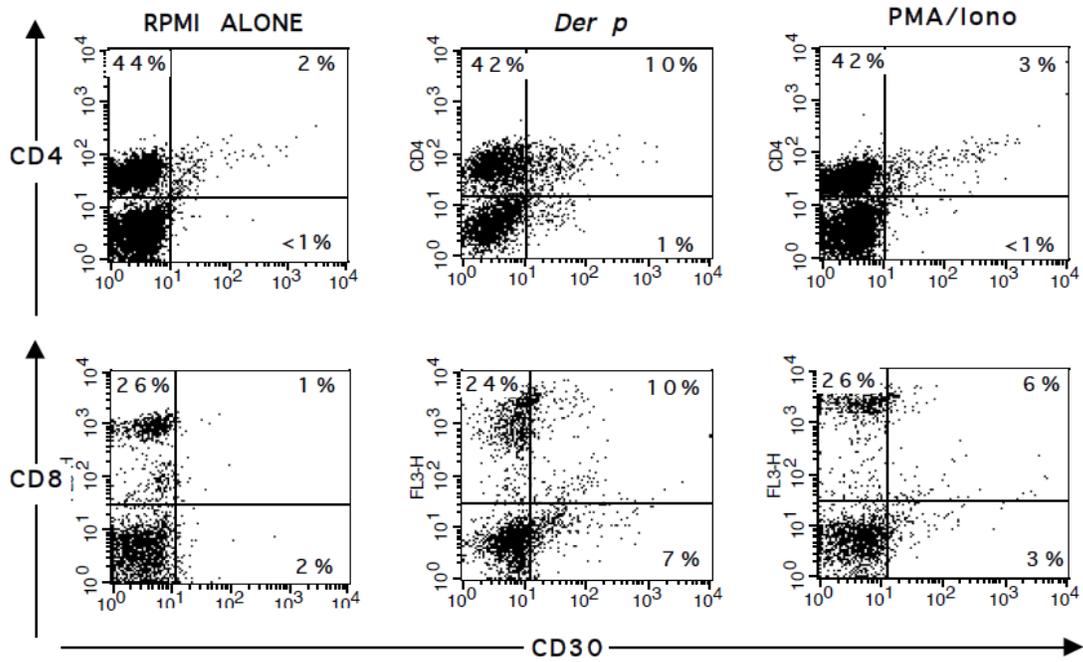
Subpoblación Celular	MD (IQR-rango)		P
	SANOS	PACIENTES	
CD4 ⁺ CD30 ⁺	1.7% IQR 1-1.7	3% IQR 1.3-3.3	p=0.08
CD8 ⁺ CD30 ⁺	1% IQR 0.4-1.8	1.5% IQR 0.5-1.8	p=0.1

MD.- Mediana IQR. - Rango Intercuartil

La estimulación con *Dp* induce la expresión de CD30 en células CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes con QCP

Con la finalidad de poder determinar si la expresión de CD30 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes con QCP era inducida por el alérgeno, se realizaron cultivos celulares con *Dp* y mitógenos policlonales. En la figura 6.5 inciso (a) se observan gráficas de puntos donde se representa en el eje de las X la población CD30 y el eje de las Y la población de CD4 o CD8; en la primera columna de gráficas se representa el control sin estímulo, en la columna central las estimuladas con *Dp* y en la última, las estimuladas con PMA/ionomicina. Se observa que al estimular las CMN con *Dp* se obtiene un incremento 3 veces mayor de linfocitos CD30⁺, comparado con las células no estimuladas, tanto en la población de linfocitos T CD4⁺CD30⁺, como en los linfocitos T CD8⁺CD30⁺. Posteriormente se analizaron las regiones positivas para CD4 y CD8, de acuerdo a la expresión de CD30, encontrando que la estimulación con *Dp* incrementa significativamente la frecuencia tanto de linfocitos CD4⁺CD30⁺, como de CD8⁺CD30⁺. Sin embargo, debido a que se había reportado en diferentes modelos que, para la CA, la participación de linfocitos T cooperadores es más importante, se decidió continuar con el análisis de esta población para este estudio.

(a) Pacientes



(b) Controles Sanos

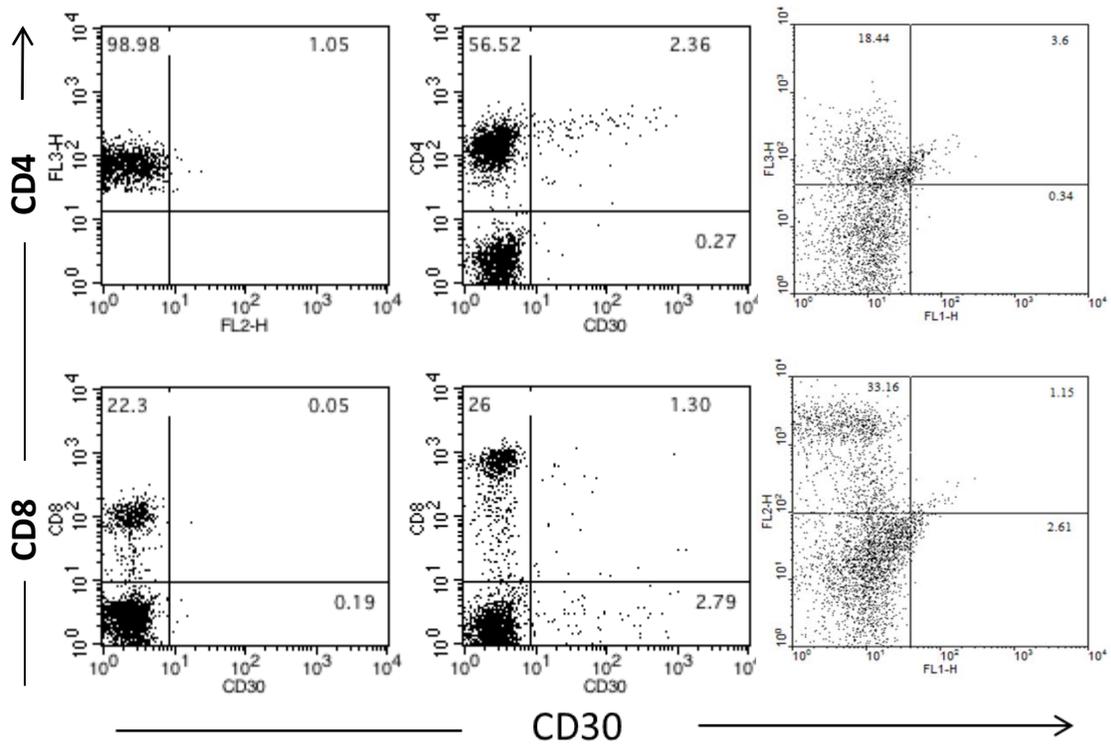


Figura 6.5 Gráficas de puntos de la subpoblación de linfocitos T CD4+CD30+ y CD8+CD30+ a los 7 días de cultivo con diferentes estímulos, Der p y con PMA de pacientes y controles sanos

Tabla 6.3 Cambios en la expresión de CD30 en linfocitos T CD4+y CD8+ en pacientes con QCP

Subpoblación Celular	RPMI MD (IQR-Rango)	Der p MD (IQR-Rango)	PMA/Iono MD (IQR-Rango)	P	
				RPMI vs. Der p	Der p vs. PMA/Iono
Pacientes CD4+CD30+	1.4% (0.5-2.2)	23.6% (15-43.2)	8.8% (4.6-11.6)	<0.0001	<0.0001
Sanos CD4+CD30+	1% (0.45-1.8)	1.2% (0.80-2.7)	2,5 (2.1-3.8)	<0.01	<0.01
Pacientes CD8+CD30+	1.0% (0.4-1.8)	19.9% (8.7-30.8)	1.7% (0.9-9.3)	<0.0001	<0.0001
Sanos CD8+CD30+	0.8% (0.05_0.9)	2,3% (1.8-2.5)	0.9 % (0.2-1.3)	<0.01	<0.01

MD.- Mediana; IQR. - Rango Intercuartil

Además del análisis de la expresión de CD30 por citometría de flujo en CMN, también se estudió la expresión de mRNA bajo las mismas condiciones de estímulo en ambos grupos (sanos y alérgicos). La figura 6.6 se muestra en la primera línea los marcadores de peso molecular utilizados. En el tercer carril se observa una banda de 200pb que corresponde al control positivo (PGK) y una banda de aproximadamente 458pb que corresponde a la molécula CD30.

En los carriles 1, 3, 5y 7 representan a un individuo sano, como se puede observar se observa la amplificación del transcrito sin embargo no se observa la presencia de la banda correspondiente al CD30, por lo contrario, en los carriles 2,4,6, y 8 que representan al paciente observamos como desde el día 0 se observa la banda del CD30 la cual se mantiene presente a los 3 y 7 días pero a los 15 días ya no está presente. Esto sugiere que el gen ya no se encuentra presente después de los 7 días debido a que las células CD30+ ya no proliferan, solo se mantienen.

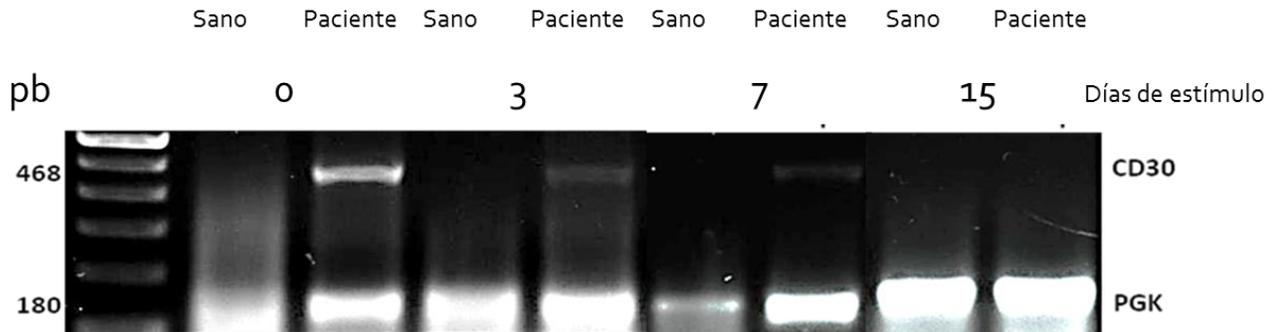


Figura 6.6 Análisis de la expresión génica de CD30 por RT-PCR. Los carriles representan CMN de sanos y pacientes al estimular con Dp a los 0, 3, 7 y 15 días de cultivo.

La sub-población de células T CD4⁺CD30⁺ produce IL-4, IL-5 e IFN- γ en respuesta a la estimulación Ag-específica con Dp.

Con la finalidad de determinar si los linfocitos CD4⁺CD30⁺ eran capaces de producir citocinas Th1/Th2 posterior al estímulo antigénico, se evaluó la frecuencia de linfocitos CD4⁺CD30⁺ productores de IL-4, IL-5 e IFN- γ . En la figura 6.7 se muestra la capacidad de producción de citocinas Th1/Th2 en las células T cooperadoras CD30⁺ o CD30⁻ posterior a la estimulación con Dp. La población CD4⁺CD30⁺ expresó 11.4 veces más IFN- γ que la población CD4⁺CD30⁻ ($p < 0.0001$). De igual manera IL-4 se expresó 4.3 veces más en los CD4⁺CD30⁺ que en los CD4⁺CD30⁻ ($p < 0.0001$) e IL-5 se expresó 4.1 veces más en las CD30⁺ ($p = 0.009$). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la población de linfocitos T CD4⁺CD30⁺ son la fuente principal de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5), como de citocinas Th1 (IFN- γ) posterior a la estimulación antigénica

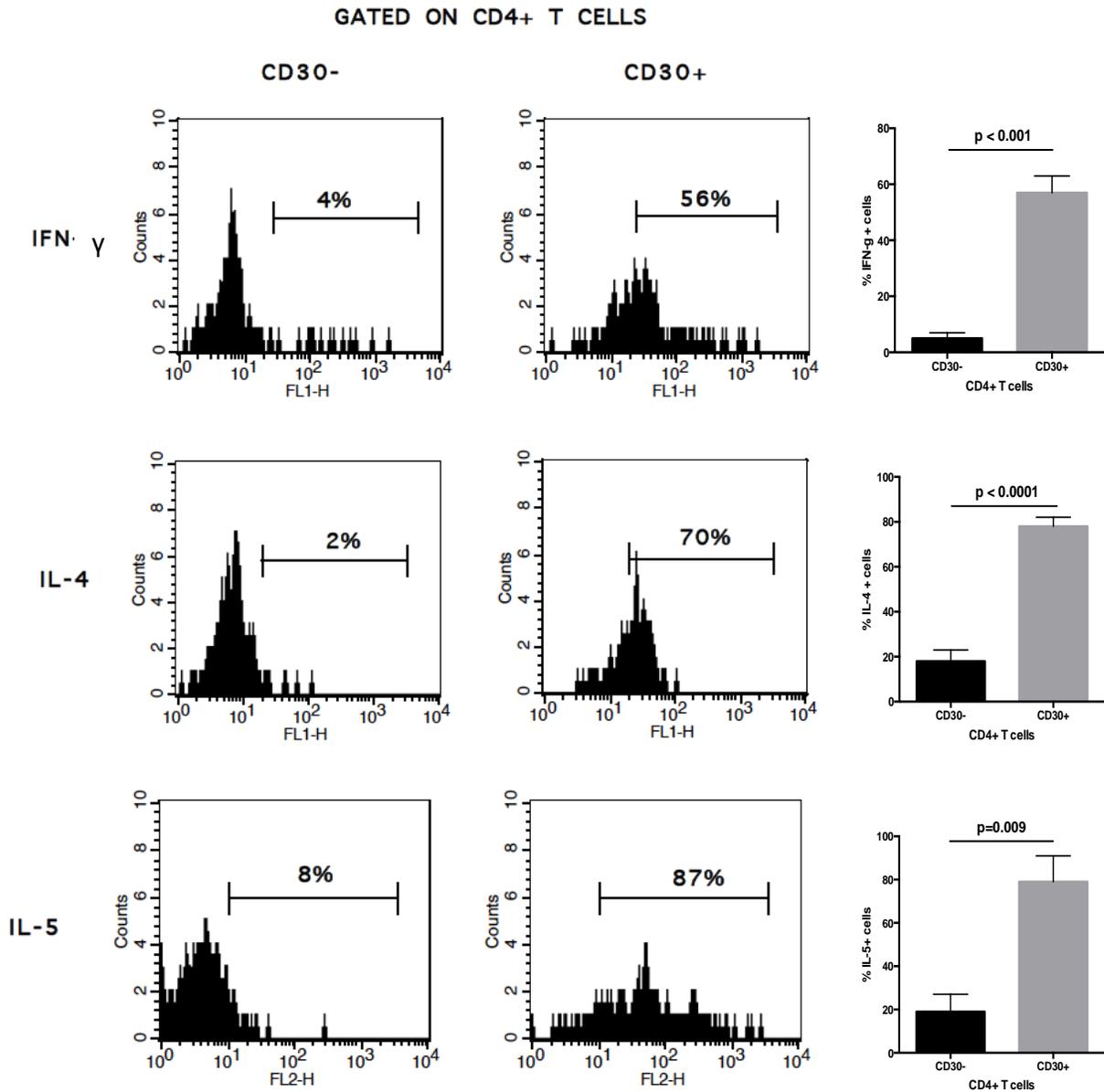


Figura 6.7 En los histogramas se observa la producción de citocinas intracelulares en las células T CD4+CD30+ y CD30-. Las CMN fueron estimuladas con Dp por 7 días y se evaluó por marcaje intracelular la síntesis de IFN-g, IL-4 e IL-5. Las gráficas de puntos de la izquierda representan la población CD4+CD30-, las gráficas de puntos centrales, a la población CD4+CD30+ y a la derecha, la gráfica comparativa entre ambas poblaciones. Todas estas mostrando las poblaciones positivas a citocinas intracelulares.

El bloqueo de IL-4 disminuye la expresión de CD30 en células T CD4+.

Para establecer si la IL-4 participaban en la expresión de CD30 en las células T CD4+ de pacientes con QCP, se bloqueó su función añadiendo el anticuerpo específico anti-IL-4 durante la estimulación con *Der p*. Como se observa en las gráficas de puntos de la figura 6.8, primero se regionalizó a los linfocitos T CD4+ y se realizó una gráfica de puntos e histograma para ver el porcentaje de CD30+, por lo que observamos una disminución

de 4 veces en la frecuencia de células T CD4⁺CD30⁺ cuando se añadió el bloqueo específico (p=0.03) con IL-4 (Figura 6.8), lo que sugiere que esta citocina actúa como un elemento de retroalimentación positiva para la expresión de CD30 posterior a la estimulación Ag-específica.

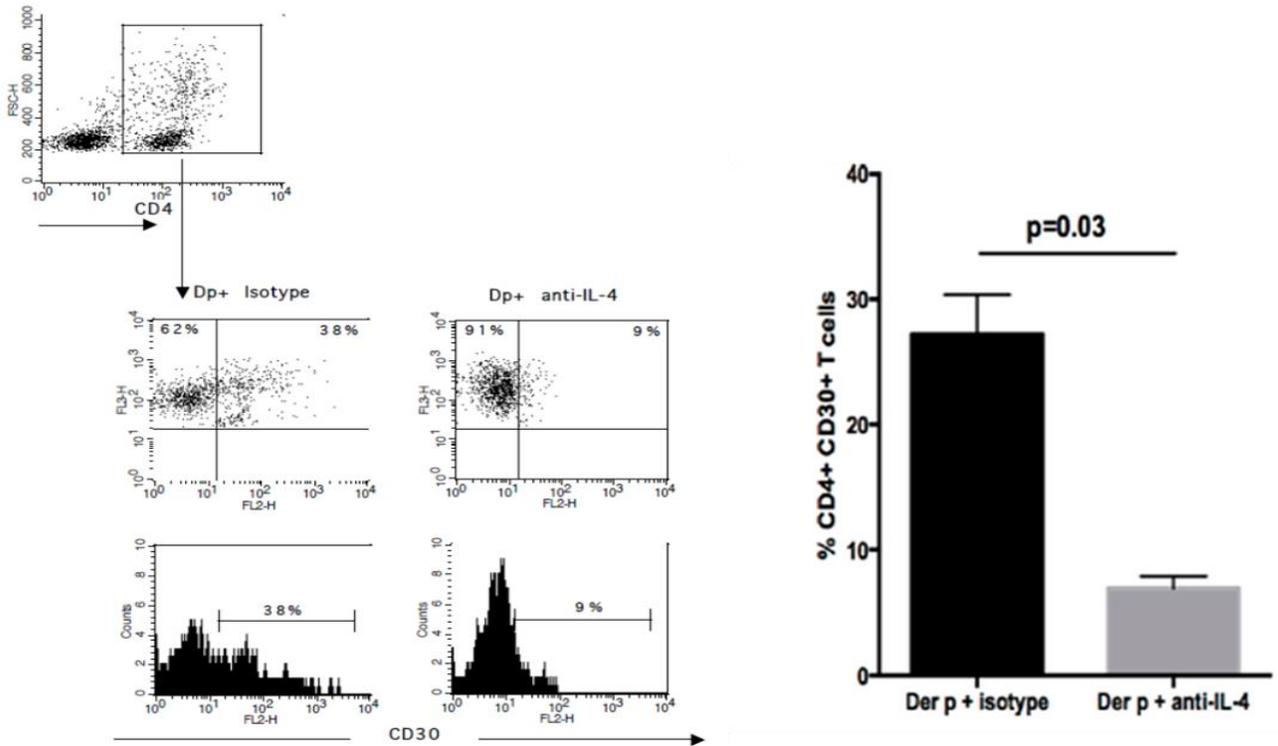


Figura 6.8 Efecto del bloqueo de IL-4 en las células T CD4⁺CD30⁺ después del estímulo con *Der p*. Células mononucleadas periféricas de 3 pacientes con Queratoconjuntivitis primaveral fueron estimuladas con *Dermatophagoides pteronyssinus* después de 7 días, y con anti interleucina 4 (IL-4) que se agregó a los 3 y 5 días como se describió en material y métodos

Determinación de CD30 soluble en pacientes alérgicos.

Se analizó la concentración de CD30 soluble (CD30s) en el sobrenadante de las CMN de los pacientes alérgicos y de los individuos sanos en una cinética de tiempo de 24 a 120 horas. Como se observa en la figura 6.9 después del estímulo policlonal en los pacientes con VKC se incrementan los niveles de CD30s, entendiendo que dicho estímulo induce

la secreción del CD30s; por lo cual se evaluó CD30s a las 24, 48, 72 y 96 h del sobrenadante celular tanto en pacientes como en sanos. Se observó un incremento de 4.3 veces del CD30s en los pacientes con VKC a comparación de los individuos sanos después de 72 hrs de estímulo con Con A ($p=0.03$) y de 7.4 veces a las 96 h ($p=0.01$).

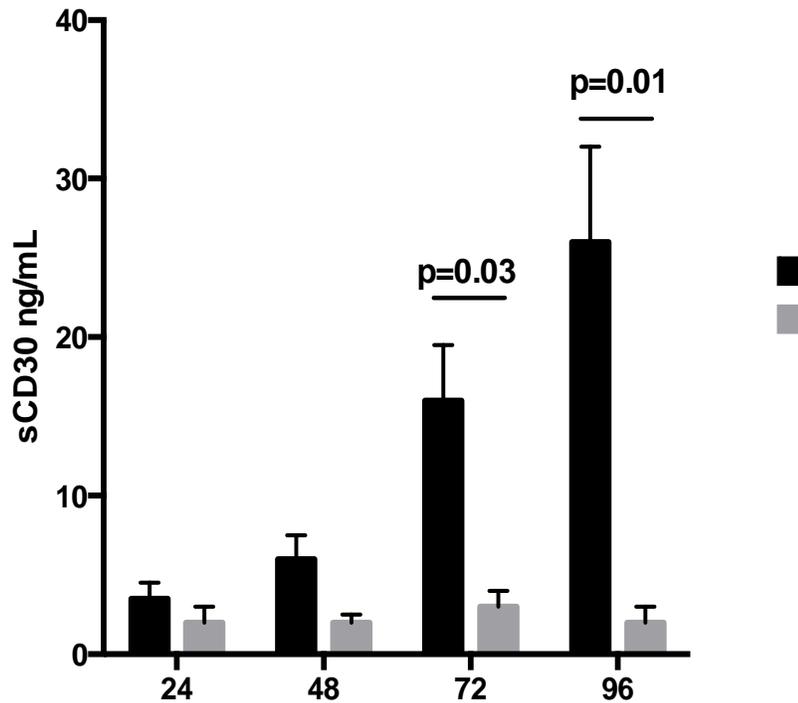


Figura 6.9 Concentración de CD30s en sobrenadante de CMN estimuladas con Con A. Las CMN fueron estimuladas durante 24, 48, 72 y 96 y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para determinar la presencia de CD30s. Hubo un incremento significativo en la concentración de CD30s se a las 72 y 96 horas después del estímulo con *Der p*. Los resultados representan las muestras de 8 pacientes (Barras grises) e individuos sanos (Barras negras).

Bibliografía

- 1.-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
2. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.

3. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 171:131-137.
4. Garfias et. al. CD4⁺ CD30⁺ T cells perpetuate IL-5 production in Dermatophagoides pteronnyssinus allergic patients. *Allergy* 2006; 61:27-34

Capítulo 7 DISCUSIÓN

En diferentes estudios se ha analizado el papel de CD30 en los procesos alérgicos, teniendo como antecedentes los estudios realizados tanto en alergias respiratorias como en dermatitis atópica. Conociendo a CD30 como una molécula de activación celular que pertenece a la familia de los receptores de TNF (TNFR), Ellis¹ y Latza² observaron que CD30 tiene la capacidad de regular tanto procesos de muerte como de proliferación celular. Por otra parte, Bengtsson³ estudió la expresión de CD30 en las poblaciones Th0, Th1 y Th2 concluyendo que CD30 es un marcador de las poblaciones Th2; congruentemente con estos datos, en 2001 se reportó que la población CD4⁺CD30⁺ se encontraba elevada en los procesos alérgicos.⁴ Resultados previos en nuestro grupo de trabajo (Garfias et. al. 2006) han mostrado que en pacientes con rinitis alérgica y asma, los linfoblastos CD4⁺CD30⁺ que proliferaron en presencia del extracto alérgico Dp son resistentes a apoptosis; en ese mismo estudio también se observó que los linfoblastos CD4⁺CD30⁺ eran IL-4⁺. Los datos anteriores sugieren que la población de CD4⁺CD30⁺ producen IL-4, contribuyendo a la cronicidad del fenómeno alérgico en los pacientes con asma y rinitis alérgica.⁵ Aunque se ha demostrado que las células T CD30⁺ favorecen la cronicidad de la respuesta Th2 en rinitis y asma, se desconoce su participación en la alergia ocular. En el presente estudio se evaluó la participación funcional de las células T CD30⁺ en la alergia ocular.

Nosotros observamos que al estimular células de paciente con Dp se indujo un incremento tanto en la población de linfocitos T cooperadores como en los citotóxicos que expresaban CD30; en particular los linfocitos T CD4⁺CD30⁺ fueron altamente productores de IL-4, IL-5 e IFN- γ . De acuerdo con nuestros resultados, Rojas-Ramos *et al.* demostró que la expresión de CD30 en las células T CD4⁺ se asocia con la producción de IL-4 posterior a la estimulación de las células T CD4⁺ aisladas de pacientes con asma.⁶ Otros autores han sugerido que la IL-4 podría inducir la expresión de CD30 en la superficie de las células T cooperadoras⁵ y en las células T citotóxicas después de estimulaciones repetidas.⁷ Además de las células Th2, la expresión de CD30 en las células T CD4⁺ se ha asociado con el mantenimiento de células T de memoria en el modelo murino.⁸ Yamamoto,⁹ en un estudio con pacientes con dermatitis atópica, observó de igual forma un incremento en la subpoblación de células T

CD4⁺CD45RO⁺CD30⁺.⁹ En este trabajo, la estimulación con el alérgeno *in vitro*, indujo el aumento en la frecuencia de las células T CD30⁺ de pacientes con VKC. Sin embargo, si estas células T CD4⁺CD30⁺ tienen inmunofenotipo de memoria en pacientes con VKC se desconoce, por lo que se requieren más estudios al respecto.

Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺CD30⁺ son una fuente importante de IL-4 e IL-5 en pacientes con asma, contribuyendo a un microambiente Th2 en el pulmón, y son un subconjunto de células asociadas con un resultado clínico desfavorable.⁷ Oflazoglu (2008) estudió la expresión de CD30 sérica y soluble en las poblaciones CD4⁺, CD1⁺ y CD8⁺, obtenidos de pacientes con dermatitis atópica y observó que la expresión de CD30 tenía un predominio en la subpoblación CD8⁺CD30⁺.¹⁰ En este contexto, la función de las células CD8⁺CD30⁺ Tc2 y su posible asociación con el grado de daño en la córnea debería de ser evaluado, ya que las células T CD8⁺ están involucradas en la fase efectora de la conjuntivitis alérgica en el modelo de ratón;¹¹ del mismo modo, la interacción CD30/CD30L en las células citotóxicas, se relaciona con la generación células de memoria¹² Por lo tanto se requieren más estudios que permitan aclarar, la función de las células CD8⁺CD30⁺ durante los fenómenos alérgicos en humanos.

El daño corneal en pacientes con VKC se asocia con la síntesis de múltiples citocinas Th1 y Th2 que se sobreexpresan en la superficie ocular. El IFN- γ , que es una citocina derivada de células Th1, podría influir en el daño ocular en la hipersensibilidad retardada y la inflamación crónica en este tipo de respuesta favorece la liberación del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) induciendo remodelación del tejido por los fibroblastos conjuntivales.^{13,14} En contraste, IL-4 e IL-5 son inducidas característicamente durante la respuesta alérgica, y están involucradas con las respuestas Th2 crónicas.⁵ Nuestros resultados mostraron que las células T CD4⁺CD30⁺ son la fuente más importante de IL-4, IL-5, e IFN- γ después de la estimulación específica alérgica, lo que sugiere que la subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD30⁺ podría ser la principal fuente de citocinas Th1/Th2 durante la respuesta alérgica en pacientes con QCP.

La IL-4 es también una citocina directamente involucrada con el aumento de la expresión de CD30 en las células T CD4⁺.^{5,6} En este trabajo, se observó que el bloqueo

específico de la IL-4 disminuye significativamente la expresión de CD30 en linfocitos T CD4⁺; ya que el bloqueo con anti-IL-5 no disminuyó significativamente la expresión de CD30. Por lo tanto, conocer el perfil de citocinas involucrado con la expresión de CD30 en membrana permitirá discernir los mecanismos de perpetuación de la respuesta inmunológica asociada a alergia ocular y sugerir en el futuro posibles blancos terapéuticos.

Después de la activación el CD30 es cortado por una TNF- α metaloproteinasa anclada a la membrana (TACE, por sus siglas en inglés), liberando un ectodominio soluble de CD30, llamado "CD30 soluble" (sCD30)¹⁵. En nuestro trabajo, se observó el aumento de los niveles de sCD30 en pacientes con VKC después de la estimulación con Con A en comparación con los individuos sanos. Lo anterior podría deberse a que se ha reportado que las células de pacientes con alergia (alimentos) tienen mayor capacidad de respuesta frente a estímulos policlonales (ref Zhang Y, et al 2016).¹⁶ Por otra parte, la determinación de sCD30 en suero ha sido sugerida como biomarcador en asma y dermatitis atópica; es decir, altos niveles de sCD30 están relacionados con la activación de la respuesta inmune^{15,17}, mientras que los niveles bajos se encuentran asociados con un entorno inmunorregulador^{11,18,19}. La determinación de sCD30 en pacientes con conjuntivitis alérgica podría ser utilizada para evaluar la actividad clínica, para modificar oportunamente los tratamientos locales, y también para poder predecir los resultados clínicos. Sin embargo, se necesitan más estudios para probar estas hipótesis.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que las células T funcionan como células T efectoras en respuesta a alérgenos específicos. Esta subpoblación celular produce IL-4, IL-5 e IFN- γ , contribuyendo con el desarrollo de un microambiente Th1/Th2 relacionado con la respuesta inmune patogénica en pacientes con alergia ocular. Ayudando a esclarecer la participación de CD30 en la QCP ya que solo se había reportado que biopsias de pacientes con queratoconjuntivitis primaveral la presencia de linfocitos T CD3⁺CD30⁺ infiltrantes.

Bibliografia.

- 1.-Ellis, T.M, Simms, P.E., et. al. CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. *J Immunol* 1993; 151:2380-2389.
- 2.-Latzka, U., Foss, A.D.- et. al. CD30 antigen in embryonal carcinoma and embryogenesis and release of the soluble molecule. *Am J Pathol* 1995; 146: 463-471.
- 3.- Bengtsson et. al. Not only Th2 cells but also Th1 and Th0 cells express CD30 after activation *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 28:683.
- 4.- Bengtsson et. al. The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* 2001; 56:593-603
- 5.- Garfias Y. et. al. CD4+CD30+ T cells perpetuate IL-5 production in Dermatophagoides pteronyssinus allergic patients *Allergy* 2006; 61: 27-34.
- 6.- Rojas-Ramos E,et. al. Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4(+) T cells from children with atopic asthma: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28:659-66
- 7.- Stanciu LA, Roberts K, Lau LC, Coyle AJ, Johnston SL. Induction of type 2 activity in adult human CD8(+) T cells by repeated stimulation and IL-4. *Int Immunol* 2001; 13:341-8.
- 8.- Withers DR, Gaspal FM, Bekiaris V, McConnell FM, Kim M, Anderson G, Lane PJ. OX40 and CD30 signals in CD4(+) T-cell effector and memory function: a distinct role for lymphoid tissue inducer cells in maintaining CD4(+) T-cell memory but not effector function. *Immunol Rev* 2011; 244:134-48.
- 9.- Yamamoto J. CD30 expression on circulating memory CD4+ T cells as a Th2-dominated situation in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2000. 55:1011-1018.
- 10.- Oflazoglu et. al. CD30 expression on CD1a+ and CD8+ cells in atopic dermatitis and correlation with disease severity. *European Journal of Dermatology* 2008 Vol 18, No 1, 41-49
- 11.- Fukushima A, Yamaguchi T, Fukuda K, Sumi T, Kumagai N, Nishida T, Imai S, Ueno H. CD8+ T cells play disparate roles in the induction and the effector phases of murine experimental allergic conjunctivitis. *Microbiol Immunol* 2006; 50:719-28

12.- Nishimura H, Yajima T, Muta H, Podack ER, Tani K, Yoshikai Y. A novel role of CD30/CD30 ligand signaling in the generation of long-lived memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2005; 175:4627-34

13.-Leonardi A, Fregona IA, Plebani M, Secchi AG, Calder VL. Th1- and Th2-type cytokines in chronic ocular allergy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*

14.-Leonardi A, Di Stefano A, Motterle L, Zavan B, Abatangelo G, Brun P. Transforming growth factor- β /Smad - signalling pathway and conjunctival remodelling in vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2011; 41:52-60.

15.- Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, Murphy G, Lemke H. CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 2000; 165:6703-9.

16

17.- Remes ST, Delezuch W, Pulkki K, Pekkanen J, Korppi M, Matinlauri IH. Association of serum-soluble CD26 and CD30 levels with asthma, lung function and bronchial hyper-responsiveness at school age. *Acta Paediatr* 2011; 100: e106-11

18.- Kotaniemi-Syrjänen A, Delezuch W, Pelkonen AS, Malmström K, Malmberg LP, Punnonen K, Matinlauri IH, Mäkelä MJ. Improvement in lung function is associated with a decrease in serum soluble CD30 in atopic infants. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 114:156-7.

19. Foschi FG, Emiliani F, Savini S, Quercia O, Stefanini GF. CD30 serum levels and response to hymenoptera venom immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18:279-83.

Intracellular IL-4, IL-5, and IFN- γ as the main characteristic of CD4+CD30+ T cells after allergen stimulation in patients with vernal keratoconjunctivitis

Diana Magaña,¹ Gustavo Aguilar,¹ Marisela Linares,¹ Julio Ayala-Balboa,¹ Concepción Santacruz,¹ Raúl Chávez,² Sergio Estrada-Parra,³ Yonathan Garfias,² Ricardo Lascurain,² Maria C. Jiménez-Martínez^{1,2}

¹Department of Immunology and Research Unit, Institute of Ophthalmology “Conde de Valenciana Foundation,” México, D.F;

²Immunology Lab, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico, D.F;

³Department of Immunology, National School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute, Mexico, D.F

Background: Vernal keratoconjunctivitis (VKC) is a severe form of allergic conjunctivitis, in which inflammatory infiltrates of the conjunctiva are characterized by CD3+ and CD30+ cells. Until today, the functional involvement of CD30+ T cells in VKC was unclear. Our aim was to evaluate the functional characteristics of CD30+ T cells after allergen stimulation in peripheral blood mononuclear cells obtained from patients with VKC.

Methods: Seventeen consecutive patients at the Institute of Ophthalmology with active forms of VKC were included.

Results: After allergen stimulation, we observed the frequency of CD30+ T cells increased compared with non-stimulated cells ($p < 0.0001$). The CD30+ T cells responded to the specific allergen-inducing expression of intracellular interleukin-4 (IL-4), IL-5, and interferon-gamma (IFN- γ) compared with the CD30- T cells ($p < 0.0001$). Increased early secretion of soluble CD30 was observed in the supernatant of the cultured cells from patients with keratoconjunctivitis, compared with healthy controls ($p = 0.03$). Blockage with IL-4 significantly diminished CD30 frequency in the allergen-stimulated cells.

Conclusions: Our results suggest that after allergenic stimulation, CD4+CD30+ cells are the most important source of IL-4, IL-5, and IFN- γ . IL-4 acts as an activation loop that increases CD30 expression on T cells after specific stimulation. These findings suggest that CD4+CD30+ T cells are effector cells and play a significant role in the immune pathogenic response in patients with vernal keratoconjunctivitis.

Allergic conjunctivitis is one of the most common ocular diseases in ophthalmologic clinical practice. Vernal keratoconjunctivitis (VKC) is a chronic form of allergic conjunctivitis with seasonal exacerbations that can lead to permanent visual impairment due to persistent inflammation. Intense itching, photophobia, tearing, and mucous discharge clinically characterize VKC [1]. In conjunctival biopsies of patients with VKC, an inflammatory infiltrate, predominantly in the epithelium and the substantia propria of the conjunctiva, characterized by CD3+ T cells expressing CD30, has been observed [2]. CD30 is a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily. TNFRs have distinctive cytoplasmic death domains, related to apoptotic signaling. CD30 lacks this domain and functions as a costimulator molecule in T-cell activation [3]. CD30 is mainly expressed on TH2 cells but also identifies a subset of T cells that comprise the major cells that produce interferon-gamma (IFN- γ) and

interleukin-5 (IL-5) in the T-cell compartment [4]. In patients with asthma, peripheral blood CD4+ T cells, following in vitro allergen-specific stimulation, express CD30 and IL-5 on the cell surface, which suggests that CD30 expression is related to long-term clinical manifestations [5]. Although CD30 expression has been associated with asthma and rhinitis, the role of CD30 in VKC remains unclear; thus, the aim of this study was to evaluate the functional involvement of CD30+ T cells in patients with vernal keratoconjunctivitis.

METHODS

Patients: Seventeen consecutive patients from the Department of Immunology at Institute of Ophthalmology (9 males and 8 females, mean age 13.11, range 8–25 years) with active forms of VKC were included in the study. VKC diagnosis was based on clinical ophthalmological history and eye examination. All patients were classified as having active forms of vernal keratoconjunctivitis characterized by limbal, tarsal, or mixed varieties of VKC. The clinical ophthalmological characteristics of the patients were described according to [6], and are depicted in Appendix 1. The specific allergic reaction to *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*)

Correspondence to: Maria C Jimenez Martinez, Institute of Ophthalmology “Conde de Valenciana,” Chimalpopoca 14, Col. Obrera, C.P. 06800; Phone: +52 (55) 5421700 ext. 3212; FAX: +52(55) 54421700 ext. 3206; email: mcjimenezm@institutodeoftalmologia.org

was confirmed with a skin-prick test positive for *D. pteronyssinus* (wheal, >3 mm diameter). Healthy age- and sex-matched volunteers were used as controls. All participants gave informed consent or their assent consent for blood sampling after written information was provided, and patient anonymity was preserved during the study. The study adhered to the ethical principles of the Declaration of Helsinki and the E11 Statements of International Conference of Harmonization (E11-ICH). The Institutional Ethics Committee Board of the Institute of Ophthalmology Fundación Conde de Valenciana, Mexico City, approved this study.

Monoclonal antibodies and reagents: Phycoerythrin (PE) labeled mouse monoclonal antibodies (mAbs) against human CD30, IL-5, and IL-4; PECy5-labeled mAbs anti-human CD4 and CD8; and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled antibodies against human IL-4, IFN- γ , and CD30 were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Lymphoprep (Ficoll 1.077 density) was obtained from Nycomed Pharma (Nyegaard, Oslo, Norway). RPMI-1640 culture medium, Concanavalin A (Con A), Phorbol myristate acetate (PMA), ionomycin, saponin, brefeldin-A, and salts were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium pyruvate, L-glutamine, and 2-mercaptoethanol were purchased from Gibco BRL (Rockville, MD). Fetal calf serum was from HyClone Labs (Logan, UT). *D. pteronyssinus* was purchased from Allerstand Co. (Mexico City, Mexico).

Peripheral blood mononuclear cells: Blood samples were collected by venipuncture. Heparinized peripheral blood was diluted 1:2 in PBS (1X; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated on a Ficoll density gradient with centrifugation at 500 \times g for 30 min at room temperature. Then, cells in the interface were collected, washed twice, and counted using a handheld automated cell counter (Millipore Co., Billerica, MA); viability was assessed with eosin dye exclusion.

Cell cultures: The PBMCs were cultured in 96-well flat-bottomed cell culture plates (Costar, Cambridge, MA) at 2×10^5 cells/well in RPMI-1640 medium supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 μ g/ml gentamicin, and 0.5% heat-inactivated fetal calf serum and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified chamber. After 24 h, the culture medium was removed. Fresh culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and *D. pteronyssinus* (7.5 μ g/ml) was added. After 7 days of culture, the cells were harvested and processed to measure intracellular cytokine expression and CD30 on the cell surface with flow cytometry. Con A mitogen (2 μ g/ml) and/or PMA/ionomycin (5 ng/ml and 0.2 μ g/ml, respectively)

was used as the cell stimulation positive control. Supernatants were collected from the culture and stored at -70 °C to determine soluble CD30. To assess intracellular IL-4, IL-5, and IFN- γ synthesis, 4 h before the antigen or polyclonal cultures ended, brefeldin-A was added (10 μ g/ml). At the end of the incubation period, the cells were harvested and then processed for immunofluorescence staining.

Immunofluorescence staining of cell surface markers: Tri- or four-color staining was performed on the PBMCs with direct immunofluorescence. Briefly, 2×10^5 cells were suspended in 20 μ l PBS supplemented with 0.2% BSA and 0.2% sodium azide (PBA), and incubated with fluorochrome-labeled mAb for 30 min at 4 °C. After incubation, the cells were washed twice with PBA, fixed with 1% p-formaldehyde, and analyzed with flow cytometry.

Immunofluorescence staining of intracellular markers: Stimulated or non-stimulated PBMCs were washed with PBA and stained with PECy5-labeled mAbs against CD4 or FITC for 30 min. After washing, the cells were fixed with 4% p-formaldehyde in PBS for 10 min at 4 °C. The cells were washed twice with PBS and permeabilized with the saponin buffer (0.1% saponin and 10% BSA in PBS) by shaking gently for 10 min at room temperature. Then, the cells were incubated with FITC-labeled anti-human IFN- γ or IL-4 and/or PE-labeled anti-human IL-5 or IL-4. In all cases, isotype-matched controls were used.

Blockade of cytokines: Capture mAbs of anti-human IL-4 (10 μ g/ml) were added at the beginning of the cell culture according to the manufacturer's protocol (R&D Systems, Minneapolis, MN). Then, 5 μ g/ml of anti-IL-4 were added at day 3, and on day 5 as a blocking maintenance dose. Isotype-matched negative antibodies were used as controls at the same concentrations. After 7 days of culture, cells were harvested and then processed for immunofluorescence staining as described.

Flow cytometric analysis: All cells were analyzed for the expression of phenotypic markers on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using CellQuest software, and 10,000 events were counted. To analyze the staining of the cell-surface markers, the lymphocytes were first gated by their physical properties (forward and side scatter). Then a second gate was drawn based on the immunofluorescence characteristics of the gated cells, and fluorescence intensity was assessed with histograms. To determine CD30+ T cells, the cells were first gated on an Forward Scattered (FSC)-Side Scattered (SSC) dot plot. Then the lymphocytes were gated on CD4+ or CD8+ T cells in an SSC-CD4 or SSC-CD8 dot plot, CD4+ or CD8+ cells were selected, and a dot plot was created to select CD30+ or CD30- on CD4+ and CD8+ T

TABLE 1. FREQUENCY OF HELPER AND CYTOTOXIC CD30+ T CELLS, AFTER *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* (*DER P*) STIMULATION IN PATIENTS WITH VKC.

Cell subset	RPMI MD (IQR-Range)	<i>Der p</i> MD (IQR-Range)	PMA/Iono MD (IQR-Range)	<i>P</i>	
				RPMI versus <i>Der p</i>	<i>Der p</i> versus PMA/ Iono
CD4+CD30+	1.4% (0.5–2.2)	23.6% (15–43.2)	8.8% (4.6–11.6)	<0.0001	<0.0001
CD8+CD30+	1.0% (0.4–1.8)	19.9% (8.7–30.8)	1.7% (0.9–9.3)	<0.0001	<0.0001

MD- Median; IQR- Interquartile range.

cells. Finally, to analyze the intracellular cytokine staining on helper and cytotoxic CD30+ or CD30- T cells, a histogram was created to analyze the percentage of cytokine positive cells. Data are presented as dot plots or histograms. Control stains were performed using isotype-matched mAbs of unrelated specificity. Background staining was <1% and was subtracted from the experimental values.

Determination of sCD30: Soluble CD30 (human sCD30, Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA) was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the supernatants of the cultures according to the manufacturer's instructions and read at 620 nm in a microplate reader (ThermoLabsystems, Multiskan Ascent, Helsinki, Finland).

Statistical analysis: Results are described in this work using Media and standard deviation (SD), or Median (MD) and interquartile ranges (IQR), according with data distribution. The Mann–Whitney U test and the Wilcoxon signed-rank test were used to detect significant differences. The analysis was performed with GraphPad Prism software v.6.0. Differences were considered statistically significant when p value was less than 0.05.

RESULTS

CD30 is expressed after *D. pteronyssinus* stimulation on CD4+ and CD8+ T cells from patients with VKC: We began by determining the percentage of CD4+CD30+ T cells and CD8+CD30+ T cells in the peripheral blood of patients with vernal keratoconjunctivitis and healthy controls. No significant differences were observed in the frequency of circulating CD4+CD30+ T cells between patients with VKC and healthy controls (HCs; MD 3%, IQR 1.3–3.3 versus MD 1.7%, IQR 1–1.7, respectively; $p=0.08$). Similarly, we did not find differences in CD8+CD30+ T cells between patients with VKC and the HCs (MD 1.5%, IQR 0.5–1.8 versus MD 1% IQR 0.4–1.8, $p=0.1$). However, after allergen stimulation, we observed a significant increase in the percentage of CD4+CD30+ T cells from patients with VKC compared with the HCs (MD 22.2%, IQR 14.6–41.7 versus MD 9.3%, IQR 6–11, respectively;

$p=0.004$). Likewise, when we compared the frequency of the CD8+CD30+ T cells after the *D. pteronyssinus* stimulation, we observed a significant increase cytotoxic CD30+ cells in patients with VKC compared with the HCs (MD 19.9%, IQR 8–7–30.8 versus MD 7.2%, IQR 6.4–8.2, $p=0.03$).

As shown in Table 1, the frequency of CD4+CD30+ T cells from patients with VKC increased 16.8-fold compared with non-stimulated cells ($p<0.0001$), and was 2.6 times increased compared with PMA/ionomycin ($p<0.0001$; Figure 1). We also observed that the helper CD30+ T cells increased 1.18-fold compared with the frequency of the CD8+CD30+ T cells after *D. pteronyssinus* stimulation ($p=0.03$; Table 1).

CD30+ helper T cells express IL-4, IL-5, and IFN- γ after *D. pteronyssinus* stimulation: To establish the potential involvement of the specific antigenic-stimulation in the expression of Th1/Th2 cytokines in helper CD30+ or CD30-T helper cells, we assessed the percentage of IL-4, IL-5, and IFN- γ after *D. pteronyssinus* stimulation in patients with active VKC. Upon allergen stimulation, IFN- γ was expressed 11.4-fold more in CD4+CD30+ T cells than in CD4+CD30- T cells ($p<0.0001$). Similarly, IL-4 was expressed 4.3-fold more in CD4+CD30+ T cells than in CD4+CD30- T cells ($p<0.0001$). Likewise, IL-5 was expressed 4.1-fold more in CD30+ helper T cells than in CD30- helper T cells ($p=0.009$; Figure 2).

sCD30 increased after polyclonal stimulation in patients with VKC: To understand whether polyclonal stimulation (Con A) induces secretion of sCD30, we evaluated soluble CD30 at 24, 48, 72, and 96 h in the supernatant of cells from patients with VKC and the HCs. We observed 4.5 times more sCD30 in the supernatant of the cultures from patients with VKC since 72 h after Con A stimulation, compared with the HCs ($p=0.03$), and 7.4 times more sCD30 after Con A stimulation at 96 h in the supernatant of the cultures from patients with VKC compared with the HCs ($p=0.01$; Figure 3).

Blockage of IL-4 decreased CD30 expression on CD4+ T cells: To see whether IL-4 is involved in CD30 expression on helper T cells from patients with VKC, we blocked IL-4 function by adding neutralizing mAbs against IL-4 during

the *D. pteronyssinus* stimulation. We observed 3.9-fold less frequency of CD4+CD30+ T cells when we added anti-IL-4 ($p=0.03$) (Figure 4).

DISCUSSION

The current study evaluated the functional involvement of CD30+ T cells in patients with vernal keratoconjunctivitis. We demonstrated that upon *D. pteronyssinus* stimulation, CD30 expression increased in helper and cytotoxic T cells, and that CD4+CD30+ T cells are the main source of IL-4, IL-5, and IFN- γ . Consistent with our findings, Rojas-Ramos et al. [7] demonstrated that CD30 expression on CD4+ T cells was correlated with the production of IL-4 after stimulation of CD4+ T cells isolated from patients with asthma. Other authors have suggested that IL-4 could induce CD30 on

the helper T-cell surface [5] and on cytotoxic T cells after repeated stimulation [8]. In addition to Th2 cells, CD30 expression on CD4+ T cells has been associated with the maintenance of memory cells in the animal model [9]. In our work, we observed that following in vitro allergen stimulation, the frequency of CD30+ T cells from patients with VKC were increased. However, whether these CD4+CD30+ T cells have an immunophenotype related to memory in patients with VKC is unknown and requires further investigation. Likewise, interaction CD30/CD30L on cytotoxic cells is related to the generation of long-lived memory cells [10]. CD8+CD30+ T cells are an important source of IL-4 and IL-5 in patients with asthma, contributing to a Th2 microenvironment in the lung, and are a cell subset associated with worse clinical outcome [8]. In this context, the role of CD8+CD30+

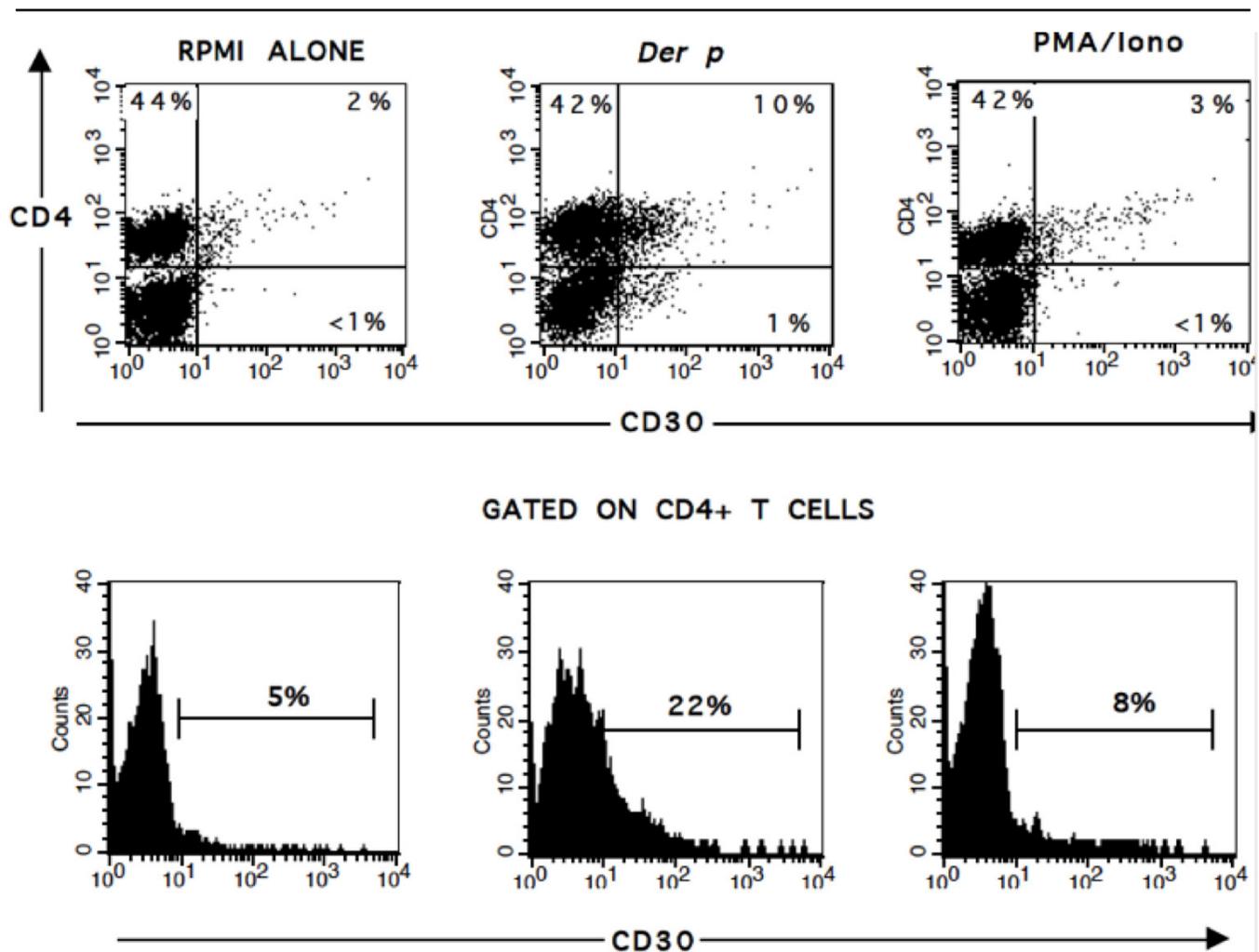


Figure 1. Frequency of CD4+CD30+ T cells after stimulation. **A:** Representative dot plots of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) or Phorbol myristate acetate (*PMA*) in patients with vernal keratoconjunctivitis (VKC). **B:** Comparative histograms of CD30 frequency on CD4+ gated cells. Dot plots and histograms are representative from 17 patients with VKC.

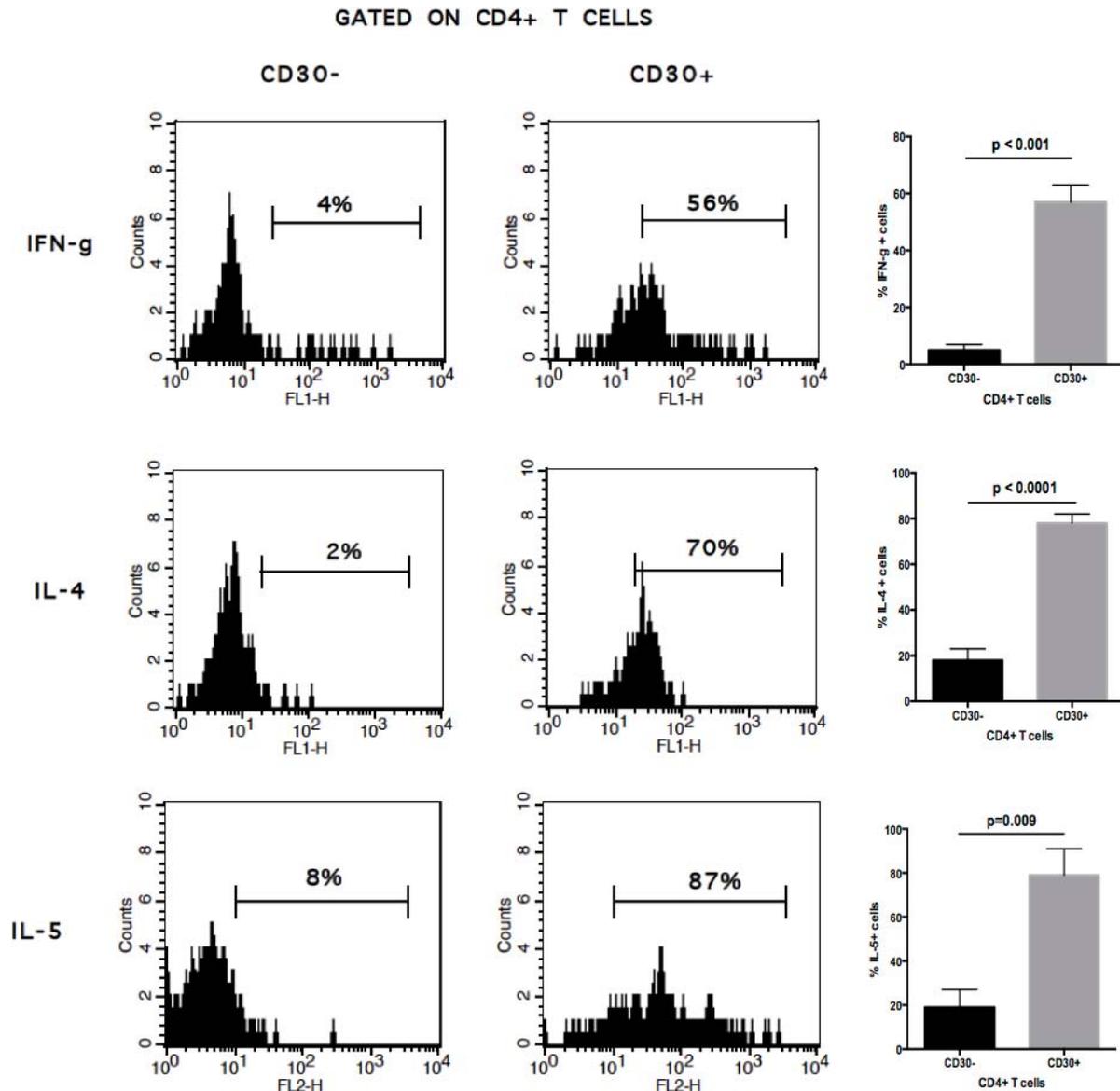


Figure 2. Comparative histograms of intracellular cytokines on helper CD30+ and CD30- T cell subsets. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were *Dermatophagoides pteronyssinus*-stimulated for 7 d and stained with CD4, CD30, and intracellular interferon-gamma (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4), or IL-5 as described in the Materials and Methods section. Left panel, CD4+CD30- T cells; central panel, CD4+CD30+ T cells; right panel, comparison of the frequency of cells positive to intracellular cytokines in either CD30+ or CD30- cell subsets. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Tc2 cells in corneal damage must be further evaluated, since CD8+ T cells are involved in the effector phase of allergic conjunctivitis in the mouse model [11].

The corneal damage in patients with VKC is associated with multiple Th1 and Th2 cytokines that are overexpressed on the ocular surface. IFN- γ , a Th1-derived cytokine, could influence delayed hypersensitivity ocular damage and activate the transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling pathway favoring tissue remodeling by conjunctival

fibroblasts [12,13]. In contrast, IL-4 and IL-5 cytokines are characteristically induced during the allergic response, and both cytokines are involved with chronic Th2 responses [5]. Our results showed that CD4+CD30+ T cells are the most important source of IL-4, IL-5, and IFN- γ after allergenic specific stimulation, suggesting that the CD4+CD30+ T cell subset could be the major source of Th1/Th2 cytokines during the pathogenic immune response in patients with VKC. IL-4 is also a cytokine directly involved with the increased

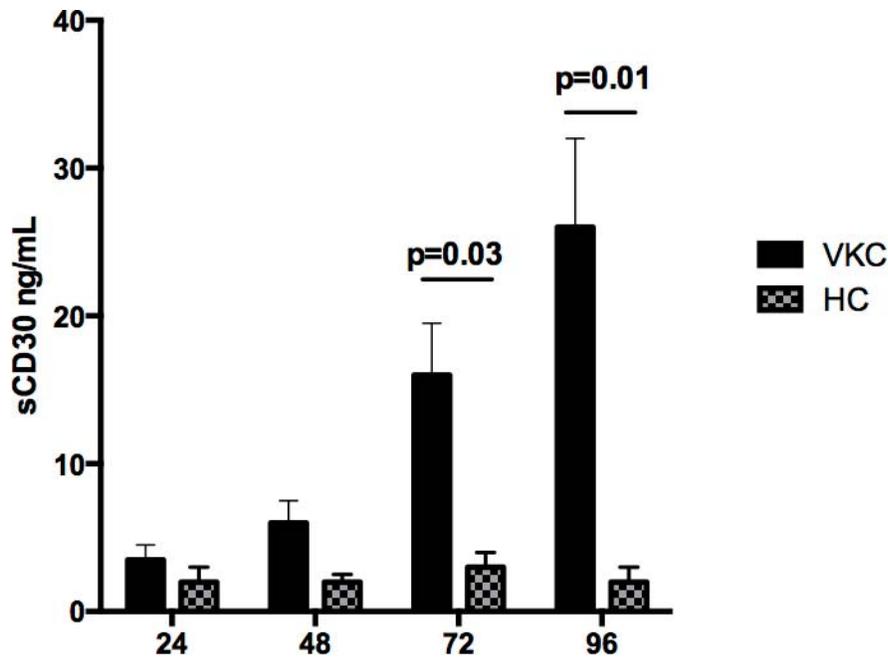


Figure 3. Soluble CD30 is secreted early after *Concanavalin A* (*Con A*) stimulation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated at 24, 48, 72, and 96 h, and the supernatant of the cultures was collected to determine soluble CD30. An increased significant concentration of soluble CD30 was observed at 72 and 96 h after *Con A* stimulation. Results are representative of eight patients with vernal keratoconjunctivitis (VKC) and matched controls.

expression of CD30 on CD4+ T cells [5,7]. In this work, we observed that blocking IL-4 is not enough to completely abrogate CD30 expression on helper T cells. Thus, IL-4 acts as an activation loop to increase CD30 expression on CD4+ T cells after specific stimulation. Investigation of other type 2 cytokines that could be involved in the upregulation of CD30 on CD4+ T cells in patients with VKC is needed

to fully understand the immune pathophysiological role of CD4+CD30+ T cells in ocular allergy.

After T cell activation, CD30 is cleaved by the membrane-anchored metalloproteinase TNF- α converting enzyme (TACE), and releases a soluble ectodomain of CD30 (sCD30) [14]. In our work, we observed increased levels

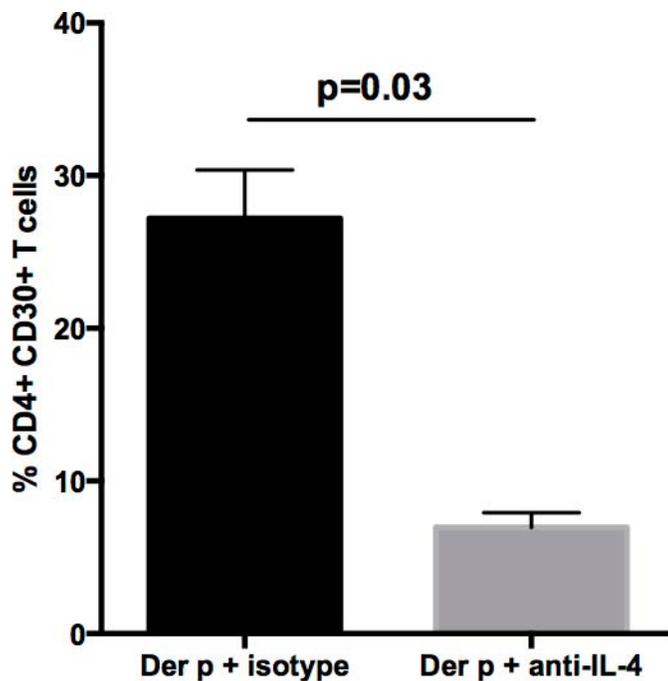


Figure 4. Effect of blockade of IL-4 on frequency of CD4+CD30+ T cells after *D. pteronyssinus* (*Der p*) stimulation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from three patients with vernal keratoconjunctivitis (VKC) were stimulated with *Dermatophagoides pteronyssinus* for 7 days, and mAb anti-interleukin-4 (IL-4) was added at baseline, 3 d, and 5 d as described in the Materials and Methods section. The plot shows the significant diminished frequency of CD4+CD30+ T cells when IL-4 was blocked.

of sCD30 in patients with VKC after Con-A stimulation compared with the HCs. Determination of sCD30 in serum has been proposed as a disease biomarker in pediatric asthma; that is, high levels of sCD30 are related to activation of the immune response [14,15], while low levels are associated with an immune regulatory environment [16,17]. The determination of sCD30 in patients with allergic conjunctivitis could be used to assess clinical activity, to modify with opportunity medical-ophthalmological treatments, and to predict clinical outcomes. Nevertheless, further studies are needed to test this hypothesis.

Taken together, our results suggest that CD4+CD30+ T cells function as effector T cells in response to specific allergens. This cell subset produces the intracellular IL-4, IL-5, and IFN- γ cytokines provoking a Th1/Th2 microenvironment related to the immune pathogenic response in patients with vernal keratoconjunctivitis.

APPENDIX 1. CLINICAL-OPHTHALMOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH VKC.

To access the data, click or select the words “[Appendix 1](#)”.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors wish to thank Veronica Romero Martinez for their technical assistance. Maria C. Jiménez-Martínez and Ricardo Lascurain (rlascurain@yahoo.com.mx) contributed equally to this work. This work was supported in part by CONACYT 71,291 and Fundación Conde de Valenciana. Diana Magaña received a Ph.D. scholarship from CONACYT number 186,211 and CVU 209,062. This article is part of the requirements for the doctoral degree of Diana Magaña. Ph.D. Program in Biomedical Sciences. Faculty of Medicine. UNAM. **AUTHOR CONTRIBUTIONS:** D.M., G.A., M.L.- Performed immunological evaluation; D.M.- Analyzed data, and wrote the paper; C.S. Performed clinical ophthalmological evaluation of patients, and analyzed data; J. A-B Performed clinical allergo-immunological evaluation of patients, and analyzed data; R.C., S.E-P, Y.G.- Analyzed and interpreted immunological data; R.L. and M.C.J-M.- designed the study, conducted research, and wrote the paper.

REFERENCES

- Bonini S, Bonini S, Lambiase A, Marchi S, Pasqualetti P, Zuccaro O, Rama P, Magrini L, Juhas T, Bucci MG. Vernal keratoconjunctivitis revisited: a case series of 195 patients with long-term followup. *Ophthalmology* 2000; 107:1157-63. [PMID: 10857837].
- El-Asrar AM, Struyf S, Al-Kharashi SA, Missotten L, Van Damme J, Geboes K. Expression of T lymphocyte chemoattractants and activation markers in vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:1175-80. [PMID: 12234902].
- Lombardi V, Singh AK, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151:179-89. [PMID: 19786798].
- Alzona M, Jäck HM, Fisher RI, Ellis TM. CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN-gamma and IL-5 and exhibit enhanced B cell helper activity. *J Immunol* 1994; 153:2861-7. [PMID: 8089475].
- Garfias Y, Ortiz B, Hernández J, Magaña D, Becerril-Angeles M, Zenteno E, Lascurain R. CD4+ CD30+ T cells perpetuate IL-5 production in Dermatophagoides pteronyssinus allergic patients. *Allergy* 2006; 61:27-34. [PMID: 16364153].
- Robles-Contreras A, Santacruz A, Ayala J, Bracamontes E, Godínez V, Estrada-García I, Estrada-Parra S, Chávez R, Perez-Tapia M, Bautista-De Lucio MV, Jiménez-Martínez MC. (2011). Allergic Conjunctivitis: An Immunological Point of View, *Conjunctivitis - A Complex and Multifaceted Disorder*, Prof. Zdenek Pelikan (Ed.), ISBN: 978-953-307-750-5
- Rojas-Ramos E, Garfias Y, Jiménez-Martínez Mdel C, Martínez-Jiménez N, Zenteno E, Gorocica P, Lascurain R. Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4(+) T cells from children with atopic asthma: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28:659-66. [PMID: 18201430].
- Stanciu LA, Roberts K, Lau LC, Coyle AJ, Johnston SL. Induction of type 2 activity in adult human CD8(+) T cells by repeated stimulation and IL-4. *Int Immunol* 2001; 13:341-8. [PMID: 11222503].
- Withers DR, Gaspal FM, Bekiaris V, McConnell FM, Kim M, Anderson G, Lane PJ. OX40 and CD30 signals in CD4(+) T-cell effector and memory function: a distinct role for lymphoid tissue inducer cells in maintaining CD4(+) T-cell memory but not effector function. *Immunol Rev* 2011; 244:134-48. [PMID: 22017436].
- Nishimura H, Yajima T, Muta H, Podack ER, Tani K, Yoshikai Y. A novel role of CD30/CD30 ligand signaling in the generation of long-lived memory CD8+ T cells. *J Immunol* 2005; 175:4627-34. [PMID: 16177108].
- Fukushima A, Yamaguchi T, Fukuda K, Sumi T, Kumagai N, Nishida T, Imai S, Ueno H. CD8+ T cells play disparate roles in the induction and the effector phases of murine experimental allergic conjunctivitis. *Microbiol Immunol* 2006; 50:719-28. [PMID: 16985294].
- Leonardi A, Fregona IA, Plebani M, Secchi AG, Calder VL. Th1- and Th2-type cytokines in chronic ocular allergy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244:1240-5. [PMID: 16538446].
- Leonardi A, Di Stefano A, Motterle L, Zavan B, Abatangelo G, Brun P. Transforming growth factor- β /Smad - signalling pathway and conjunctival remodelling in vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2011; 41:52-60. [PMID: 20977504].

14. Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, Murphy G, Lemke H. CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 2000; 165:6703-9. [PMID: 11120787].
15. Remes ST, Delezuch W, Pulkki K, Pekkanen J, Korppi M, Matinlauri IH. Association of serum-soluble CD26 and CD30 levels with asthma, lung function and bronchial hyper-responsiveness at school age. *Acta Paediatr* 2011; 100:e106-11. [PMID: 21401715].
16. Kotaniemi-Syrjänen A, Delezuch W, Pelkonen AS, Malmström K, Malmberg LP, Punnonen K, Matinlauri IH, Mäkelä MJ. Improvement in lung function is associated with a decrease in serum soluble CD30 in atopic infants. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 114:156-7. [PMID: 25492095].
17. Foschi FG, Emiliani F, Savini S, Quercia O, Stefanini GF. CD30 serum levels and response to hymenoptera venom immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18:279-83. [PMID: 18714536].

Articles are provided courtesy of Emory University and the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, P.R. China. The print version of this article was created on 25 April 2015. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.