



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA CONDE DE VALENCIANA
FARMACOLOGÍA CLÍNICA

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE COESTIMULACIÓN EN CÉLULAS
DENDRÍTICAS DE PACIENTES CON CONJUNTIVITIS ALÉRGICA ANTES Y DESPUÉS DEL
TRATAMIENTO CON ITS_L

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORE EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

PRESENTA:
HENRY VELÁZQUEZ SOTO

TUTOR:
DRA. MARIA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA "CONDE DE VALENCIANA"
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZALES
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSIO VILLEGAS"

DR. FRANCISCO RAÚL CHÁVEZ GONZALES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez del Departamento de Inmunología del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”

El trabajo recibió apoyo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”. (RENIECYT 1800829)

Durante la realización de este trabajo, el alumno con CVU 294674 recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de doctorado con número 480910.

Dedicatoria

A mis hijos, Luka y Harry; por ser la inspiración y el motor de mis días, por permitirme comprender que todo esfuerzo vale la pena y tiene recompensa,

A mi esposa, Yu; por el siempre presente apoyo y aliento,

A mis padres, Goyita y Toño; por ser el mejor ejemplo de amor, dedicación y educación

Agradecimientos

A mi tutora, Dra. Maricarmen Jiménez; por motivarme a continuar por el camino de la ciencia, por su ejemplo, por la confianza brindada, y por su constante apoyo durante todos estos años,

Al comité tutor de este proyecto, Dr. Francisco Raúl Chávez Sánchez y Dr. José Sullivan López Gonzales por su valiosa orientación en el curso de esta investigación,

Al jurado examinador en examen de grado de Doctorado, Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo, Dr. Alejandro Navas Pérez, Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont, Dr. Mario Israel Vega Paredes,

A los participantes de esta investigación, sin ellos esto no sería posible,

A mis compañeros de laboratorio,

A los departamentos de Inmunología y Cornea del Instituto de Oftalmología,

Índice

Índice de figuras	9
Índice de tablas	10
Resumen	11
Abstract	13
Abreviaturas	15
1. Marco Teórico	17
1.1. Conjuntivitis Alérgica	17
1.1.1. Fisiopatología	19
1.2. Células Dendríticas	19
1.3. Células Dendríticas y su participación en la polarización de la respuesta inmune adaptativa	21
1.4. Moléculas de coestimulación en alergia	23
1.4.1. Moléculas de coestimulación en CA.....	23
1.5. Formas Solubles de las moléculas de coestimulación B7	24
1.6. Citocinas en el contexto de la Conjuntivitis Alérgica	24
1.7. IRF4 como factor de transcripción asociado a polarización de la respuesta inmune	24
1.8. Tratamiento con Inmunoterapia Sublingual Antígeno Desensibilizante	25
2. Planteamiento del problema	26
3. Pregunta de Investigación	26
4. Justificación	26
5. Hipótesis	27
6. Objetivos	27
6.1. Objetivo General:	27
6.2. Objetivos Específicos:	27
7. Metodología	28
7.1. Tipo de estudio:	28
7.2. Universo de estudio:	28
7.3. Tamaño de muestra:	28
7.4. Criterios de selección sujetos con conjuntivitis alérgica:	28
7.4.1. Criterios de Inclusión	28
7.4.2. Criterios de exclusión	29
7.4.3 Criterios de eliminación	29

7.5. Criterios de selección sujetos sin alergia:	29
7.5.1. Criterios de Inclusión.....	29
7.5.2. Criterios de exclusión	29
7.5.3. Criterios de eliminación	30
7.6. Materiales y métodos: Métodos específicos	30
7.6.1. Sujetos experimentales	30
7.6.2. Valoración clínica	30
7.6.3. Recolección de muestras sanguíneas.....	31
7.6.4. Recolección de lágrima.	31
7.6.5. Cultivo de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica	32
7.6.6. Marcaje de antígenos de membrana e intracelular:	32
7.6.7. Análisis de los datos de citometría de flujo.....	33
7.6.8. Determinación de moléculas de coestimulación solubles.	33
7.6.9. Determinación de citocinas en cultivo de Mo-DCs.	34
7.6.10. Análisis estadístico de los resultados:	34
8. Consideraciones éticas	35
9. Aspectos de bioseguridad	35
10. Financiamiento y sitio de la investigación	36
11. Declaración de conflicto de intereses de los investigadores	36
12. Resultados	37
12.1. Establecimiento de un modelo para investigación de moléculas de coestimulación en células dendríticas derivadas de monocitos en sujetos sanos	37
12.2. Verificación de fenotipo	37
12.3. Estrategia de análisis para datos de citometría de flujo	38
12.4. Expresión de las moléculas de coestimulación en células dendríticas.	39
12.5. Evaluación de la concentración de formas solubles de las moléculas de coestimulación.	41
12.6. Citocinas en sobrenadante de cultivos.	43
12.7. Expresión de moléculas de coestimulación en pacientes con conjuntivitis alérgica. ..	47
13. Discusión	52
14. Conclusiones	56
15. Perspectivas	56
16. Referencias	57
17. ANEXOS	63
17.1. Metodología evaluación clínica	63
17.1.1. Prueba de Schirmer	63
17.1.2. Tiempo de ruptura de la película lagrimal	63
17.1.3. Escala de severidad utilizada en la valoración clínica	63

17.1.4. Tratamiento.....	65
17.2. Consentimiento y asentimiento informados.....	67
17.3. Cartas de aprobación del protocolo de investigación por los comités de Investigación, Bioseguridad y Ética en investigación.	76
16.4. Productos de investigación derivados del proyecto de doctorado	79
16.4.1. Artículo Original	79
16.4.2. Artículo de revisión	80
16.4.3. Presentación en congreso internacional	81
16.4.4. Difusión en página web.....	82
16.5 Otros productos de investigación logrados durante el doctorado	83
16.5.1. Artículo original (coautor).....	83
16.5.2. Artículo original (coautor).....	84

Índice de figuras

<i>Figura 1. Esquema representativo de la conjuntiva ocular.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2. Clasificación de la Conjuntivitis Alérgica propuesta por la DECA.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3 . Modelo de las tres señales durante la sinapsis inmunológica.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4. Sensibilización a alérgenos y polarización de la respuesta inmune adaptativa. 21</i>	
<i>Figura 5. Moléculas coestimuladoras, coinhibidoras y sus receptores en la célula T</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6. Efecto de la inmunoterapia antígeno desensibilizante en la respuesta inmune. 25</i>	
<i>Figura 7.- Metodología para el análisis de la expresión de las moléculas de coestimulación.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 8. Verificación de fenotipo en monocitos y células dendríticas diferenciadas.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 9.- Estrategia de análisis para citometría de flujo.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 10. Expresión de las moléculas de coestimulación en Mo-DCs.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 11. Expresión de IRF4 en Mo-DCs y su correlación con PDL2.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 12. Incremento de la expresión de las moléculas de coestimulación B7 en Mo-DCs</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13. Concentración de las formas solubles de CD86, ICOSL, PDL1 y PDL2.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 14. Producción de citocinas solubles en sobrenadante de células dendríticas</i>	<i>44</i>
<i>Figura 15. Correlación entre concentración de citocinas y expresión de moléculas de coestimulación.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 16. Modelo integrativo explicativo de la dinámica de expresión de moléculas de coestimulación.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 17. Expresión de CD86 en DCs de pacientes con CA activa.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 18. Expresión de ICOSL en DCs de pacientes con CA activa.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 19. Expresión de PDL1 en DCs de pacientes con CA activa.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 20. Expresión de PDL2 en DCs de pacientes con CA activa.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 21. Expresión de IRF4 en DCs de pacientes con CA activa</i>	<i>51</i>
<i>Figura 22. Dinámica de expresión de las moléculas de coestimulación membranales, solubles y citocinas secretadas por Mo-DCs.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 23. Expresión de moléculas de coestimulación B7 en Mo-DCs de sujetos con Conjuntivitis alérgica.</i>	<i>55</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Clasificación clínica e inmunopatológica de la conjuntivitis alérgica.</i>	18
<i>Tabla 2. Cinética de expresión de las moléculas de coestimulación.</i>	39
<i>Tabla 3. Concentración de sCD86, sICOSL, sPDL1 y sPDL2.</i>	42
<i>Tabla 4. cinética de producción de citocinas solubles.</i>	43
<i>Tabla 5. Matriz de correlación entre citocinas vs moléculas de coestimulación e IRF4.</i>	45

Resumen

Actualmente el único tratamiento inmunológico para los pacientes con conjuntivitis alérgica es la inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante, el cual ha demostrado tener efecto a nivel de poblaciones celulares de la respuesta inmune adaptativa pero poco se conoce acerca de su efecto en células dendríticas las cuales son cruciales para la adecuada activación y polarización de esta respuesta inflamatoria a través de la expresión de moléculas de coestimulación.

La expresión de las moléculas de coestimulación clave que han sido estudiadas en los procesos alérgicos son las pertenecientes a la familia B7, en específico: B7.2(CD86), CD275(ICOS-L), CD273(PDL-2) y CD274(PDL-1). Estas moléculas regulan los procesos de activación o inhibición y supervivencia de las células T, y se ha observado que están implicadas en la inducción de la respuesta Th2, sin esta señalización, generalmente se induce un estado muerte celular o anergia en los linfocitos T.

De igual forma diversos estudios han intentado identificar factores de transcripción expresados por células dendríticas asociados a fenómenos alérgicos, sin embargo, hasta el momento no se ha descrito alguno de forma contundente.

El presente trabajo exploró como se modifica la expresión de las moléculas de coestimulación de la familia B7 y el factor de transcripción IRF4 en un modelo in vitro de Mo-DCs estimuladas con LPS y posteriormente en pacientes con conjuntivitis alérgica.

La expresión de moléculas de coestimulación CD86(B7.2), CD275(ICOS-L), CD273(PDL-2) y CD274(PDL-1) y del factor de transcripción IRF-4 se determinaron, por citometría de flujo en cultivos de células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica. Utilizando el método de ELISA, se determinó la concentración de las formas solubles de las moléculas de coestimulación sCD86, sICOSL, sPDL1, sPDL2 y la producción de citocinas IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-2 en el sobrenadante de los cultivos de Mo-DCs se determinó por el método de CBA. Finalmente se determinó la expresión de las moléculas de coestimulación en Mo-DCs de pacientes con conjuntivitis alérgica.

Los resultados demostraron que la expresión de las moléculas de coestimulación es diferencial y depende de alcanzar un umbral de la concentración y tiempo de

estímulo. Nuestro trabajo propone que las células dendríticas están propensas a responder de manera sigilosa y propensas a enviar señales tolerogénicas: PDL1, PDL2 , sPDL1,sPDL2 hasta que se alcance un umbral de tiempo y concentración antigénico para dar inicio a la expresión de moléculas con capacidad de promover la activación de células T como ICOSL,CD86,IFN- γ e IL-2.

Con relación a lo evaluado en conjuntivitis alérgica, nuestros hallazgos demostraron que existe una expresión disminuida de las moléculas coninhibitorias PDL1, PDL2 y de ICOSL en células dendríticas de paciente con CA.

Este proyecto de investigación nos permitió una mejor comprensión de la participación de las células dendríticas, la expresión de las moléculas de coestimulación (solubles y de membrana) así como la producción de citocinas en respuesta a estímulos antigénicos y permitió explorar de forma inicial el involucro de estas interacciones en la conjuntivitis alérgica.

Abstract

At present, allergen-specific immunotherapy (AIT) is the only disease modifying therapy available for allergic patients. AIT has shown to modify adaptive immune response, but little is known about its effect on dendritic cells, which are crucial for the orchestration of inflammatory response through the signals they convey through costimulatory molecules.

The expression of the key costimulation molecules that have been studied in allergic processes are those belonging to the B7 family, specifically: B7.2(CD86), CD275(ICOS-L), CD273(PDL-2) and CD274 (PDL-1). These molecules regulate the processes of activation or inhibition and survival of T cells, and it has been observed that they are involved in the induction of the Th2 response. Without this signaling, a state of cell death or anergy is generally induced in T lymphocytes. Similarly, various studies have attempted to identify transcription factors expressed by dendritic cells associated with allergic phenomena, however, to date none have been conclusively described.

In this research project the expression of costimulation molecules CD86(B7.2), CD275(ICOS-L), CD273(PDL-2) and CD274(PDL-1) and of the transcription factor IRF-4 were determined in cultures of differentiated dendritic cells from peripheral blood monocytes. The concentration of the soluble forms of costimulation molecules sCD86, sICOSL, sPDL1, sPDL2 and the production of cytokines IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-2 were determined in the supernatant of Mo cultures. -DCs. Finally, the expression of costimulatory molecules in Mo-DCs from patients with allergic conjunctivitis was determined.

The present work explored how the expression of costimulation molecules of the B7 family and the transcription factor IRF4 is modified in an in vitro model of Mo-DC stimulated with LPS and subsequently in patients with allergic conjunctivitis.

The expression of costimulation molecules CD86(B7.2), CD275(ICOS-L), CD273(PDL-2) and CD274(PDL-1) and the transcription factor IRF-4 were determined by flow cytometry in cultures dendritic cells differentiated from peripheral blood monocytes. Using the ELISA method, the concentration of the soluble forms of costimulation molecules sCD86, sICOSL, sPDL1, sPDL2 and the production of cytokines IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-2 in the Supernatant of Mo-DC cultures is extended by the CBA method.

The results show that the expression of costimulation molecules is differential and depends on reaching a threshold concentration and stimulus time. Our work proposes that dendritic cells are prone to respond in a stealthy manner and prone to send tolerogenic signals: PDL1, PDL2, sPDL1, sPDL2 until a time and antigenic concentration threshold is reached to initiate the expression of molecules capable of promote the activation of T cells such as ICOSL, CD86,IFN- γ and IL-2.

In relation to what was evaluated in allergic conjunctivitis, our demonstration shows that there is a decreased expression of the coinhibitory molecules PDL1, PDL2 and ICOSL in dendritic cells of patients with AC.

This research project allowed us a better understanding of the participation of dendritic cells, the expression of costimulation molecules (soluble and membrane) as well as the production of cytokines in response to antigenic stimuli and took the opportunity to initially explore the involvement of these interactions in allergic conjunctivitis.

The findings of this research project led us a better understanding of the participation of dendritic cells, the expression of costimulation molecules (soluble and membrane) as well as the production of cytokines in response to antigenic stimuli and allowed us to initially explore the involvement of these interactions in allergic conjunctivitis.

Abreviaturas

- (AIT) Inmunoterapia alérgeno específica
- (CA) Conjuntivitis alérgica
- (CBA) *Cytometric bead array*
- (DC) Célula dendrítica
- (PRR) Receptor de reconocimiento de patrones
- (TLR) Receptor tipo *toll*
- (LCR) Receptor de lectina tipo c
- (IL-4) Interleucina 4
- (IL-13) Interleucina 13
- (IL-9) Interleucina 9
- (IL-6) Interleucina 6
- (TNF- α) Factor de necrosis tumoral alfa
- (IL-2) Interleucina 2
- (IL-10) Interleucina 10
- (IFN- γ) interferón gamma
- (PDL1) Ligando de muerte programada 1
- (PDL2) Ligando de muerte programada 2
- (ICOSL) Ligando del coestimuladora inducible
- (Mo-DCs) Células dendríticas derivadas de monocitos
- (IRF4) Factor 4 regulador del interferón
- (sPDL1) Ligando de muerte programada 1 soluble
- (sPDL2) Ligando de muerte programada 2 soluble
- (sICOSL) Ligando del coestimulador inducible soluble
- (sCD86) CD86 soluble
- (IL-12) Interleucina 12

(IL-6) Interleucina 6

(IL-5) Interleucina 5

(Der-p) *Dermatophagoides pteronyssinus*

(LPS) Lipopolisacárido

(EDTA) Ácido etilendiaminotetraacético

(GM-CSF) Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

(MHC) Complejo principal de histocompatibilidad

(SCIT) Inmunoterapia subcutánea alérgeno específica

(SLIT) Inmunoterapia sublingual alérgeno específica

(TCR) Receptor de célula T

1. Marco Teórico

1.1. Conjuntivitis Alérgica

La conjuntivitis alérgica (CA) o alergia ocular se define como una inflamación bilateral de la conjuntiva mediada por mecanismos de hipersensibilidad de tipo I. (Sanchez-Hernandez, et al 2015) (Figura 1)



Figura 1. Esquema representativo de la conjuntiva ocular. Tomado de Azari y Barney, 2013.

Esta es una enfermedad de alta prevalencia que afecta entre el 10% y el 20% de la población mundial, y esta puede tener manifestaciones concomitantes como la rinitis y asma. (Brozek, et al 2011) La CA mediada por IgE se puede subclassificar como conjuntivitis alérgica perene y conjuntivitis alérgica estacional dependiendo de si las manifestaciones clínicas se presentan a lo largo de todo el año (persistentes) o fluctúan dependiendo de la estación del año en la que son más frecuentes ciertos alergenos (intermitente).

En la conjuntivitis alérgica perene los individuos alérgicos están sensibilizados generalmente a alérgenos persistentes y de constante exposición como caspa de animales y acaro del polvo. (Leonardi, et al 2007)

Tabla 1. Clasificación clínica e inmunopatológica de la conjuntivitis alérgica.

Traducido de Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities (Leonardi 2007)

	Mediada por IgE	Mediada por IgE y no mediada por IgE	No mediada por IgE
Intermitente	SAC		
Persistente	PAC	VKC	CPG
crónico		AKC	CDC

IgE, Inmunoglobulina E; SAC, Conjuntivitis alérgica estacional; PAC, Conjuntivitis alérgica Perenne, VKC, Kerato Conjuntivitis Vernal; AKC, Keratocconjuntivitis atópica; CPG, Conjuntivitis papilar gigante; CDC, Dermatoconjuntivitis por contacto.

La conjuntivitis alérgica, generalmente afecta ambos ojos y los pacientes reportan síntomas como prurito conjuntival (principal síntoma), lagrimeo, sensación de ardor visión borrosa y fotofobia. En cuanto a los signos identificables en estos pacientes, se suele presentar, hiperemia, edema e hipertrofia papilar leve.

En el 2015 se publicó el Documento Consenso de Conjuntivitis Alérgica emitió un documento (DECA, evidencia nivel D; 2++) donde se propone una clasificación de la frecuencia y severidad de la conjuntivitis alérgica con la finalidad de homogenizar criterios. (Figura 2) Esta es una de las clasificaciones más aceptadas y propone: para la frecuencia: presencia de signos y/o síntomas hasta 4 días por semana o hasta 4 semanas consecutivas, como CA intermitente. O si existe la presencia de signos y/o síntomas más de 4 días por semana o más de 4 semanas consecutivas como persistente. Con relación a la severidad, el DECA propone que: se debe considerar CA leve cuando los síntomas no son molestos, no afectan la visión o el desempeño en actividades ocupacionales o académicas o actividades diarias como la lectura o los deportes; se deberá considerar como moderada cuando se reúnen 1-3 de las condiciones antes mencionadas o severa cuando se reúnen todas las características mencionadas. (Sánchez-Hernández et al, 2015)

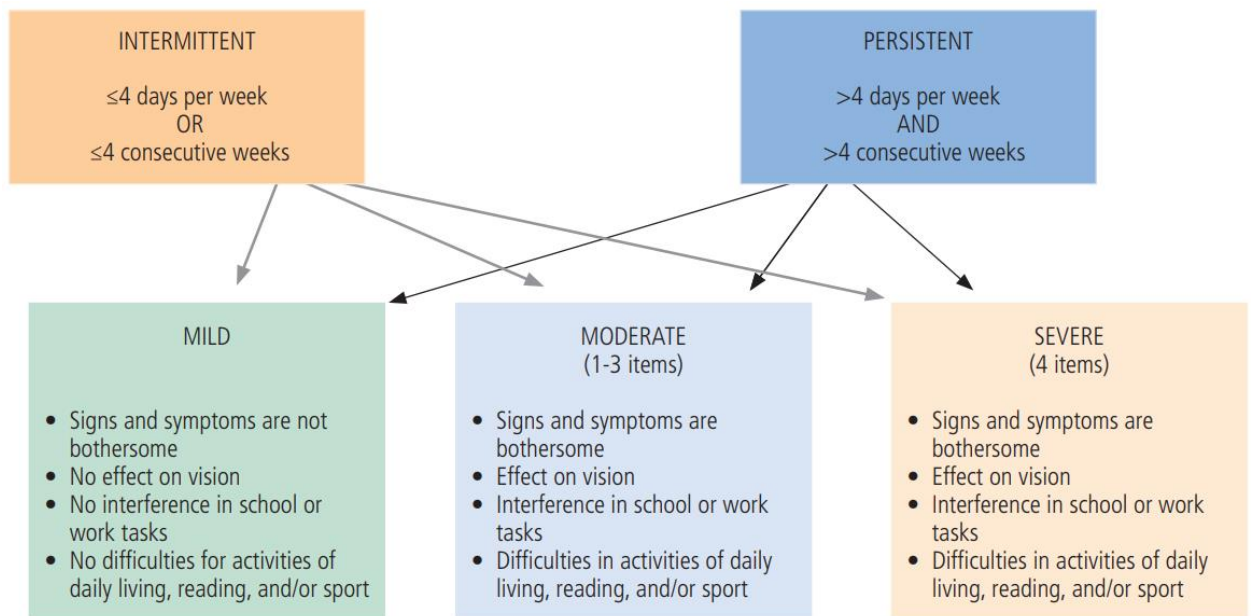


Figura 2. Clasificación de la Conjuntivitis Alérgica propuesta por la DECA. Tomado de Sanchez-Hernandez 2015

1.1.1. Fisiopatología

La CA, como otras enfermedades alérgicas, comparte mecanismos y patrones de inflamación en común, es decir, se compone por una fase de sensibilización y una fase efectora. En cada una de ellas existen diversas poblaciones celulares que participan y una función predominante, por ejemplo, linfocitos B y T son mediadores celulares de la respuesta inmune alérgica en la fase tardía, los mastocitos median principalmente la fase efectora temprana de la respuesta alérgica, mientras que, las células Dendríticas (*Dendritic Cells*, DC) actúan como iniciadoras y moduladoras de esta respuesta. Su actividad es crítica para determinar la naturaleza de la respuesta alérgica, fenómeno que ocurre durante la fase de sensibilización. (Kumar y Bhatia, 2013)

1.2. Células Dendríticas

Las DC poseen características particulares que las identifican como células centinela que incluyen: su capacidad fagocítica, una extensa distribución en epitelios y tejidos, además, poseen una gran diversidad de receptores para antígenos, también tienen la capacidad de migrar en respuesta a gradientes químicos, son capaces de activar células T (vírgenes y de memoria) y, de manera muy importante, a través de la producción de diversas citocinas y moléculas de coestimulación, modulan la

intensidad y la polarización de la respuesta inmune. (Hamida y Lambrecht, 2008) (Velazquez Soto, et al, 2022) (Figura 3)

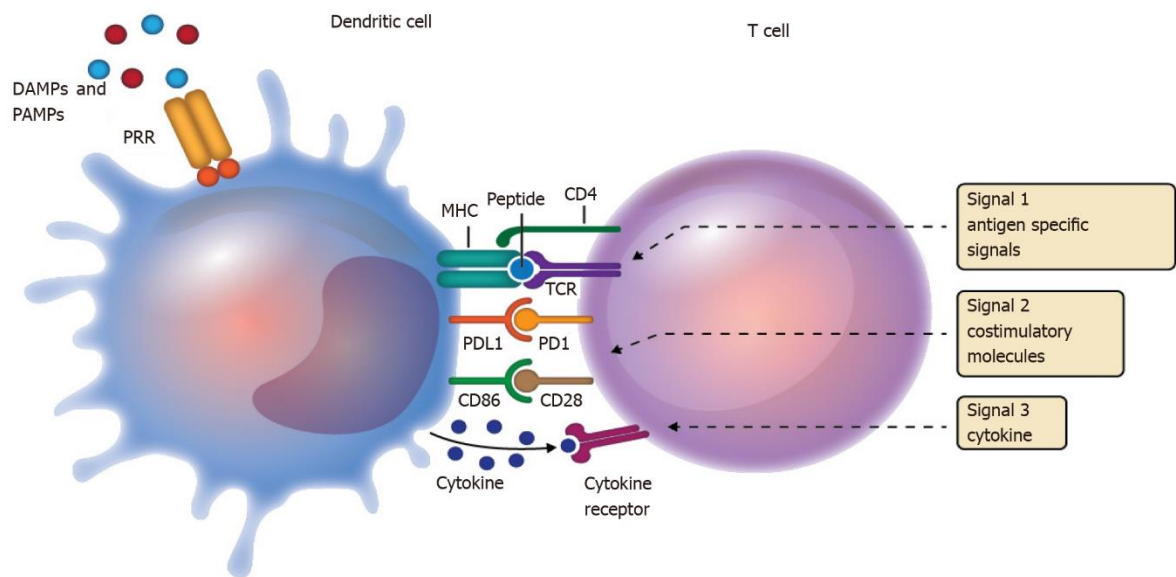


Figura 3 . Modelo de las tres señales durante la sinapsis inmunológica. Tomado de Velázquez et al 2022. (1) Presentación antigénica a través de MHC/péptido-TCR (2) Expresión de moléculas de coestimulación e interacción con sus receptores en la célula T (3) Producción de citocinas e interacción con sus receptores. DAMPs: Damage-associated molecular patterns; PAMPS; Pathogen-associated molecular patterns; PD1: Programmed death-1; PDL1: Programmed death ligand 1; PRR: Pattern recognition receptor

Durante la fase de sensibilización, cuando un individuo atópico tiene contacto con un alérgeno, éste será reconocido por células de la respuesta inmune innata donde particularmente las DCs a través de los diversos PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) que se expresan en su membrana, por ejemplo, TLRs, LCR o Scavenger. Este reconocimiento inducirá un estado de activación en las DC, haciéndolas migrar a los nódulos linfáticos proximales (submandibulares, submaxilares, retroauriculares, el anillo de Waldeyer, etc.) donde adquirirán un fenotipo característico de maduración y de esta forma, llevar a cabo la activación de células T. Durante la activación de las células T ocurren tres interacciones cruciales entre la DC y la célula T: la primera señal es la presentación antigénica, la segunda comprende la interacción de las moléculas de coestimulación con sus receptores en la célula T y la tercera señal se caracteriza por la producción de citocinas. Se ha planteado que la polarización hacia Th2 inducida por el alérgeno dependerá de estas tres señales en forma individual o de manera conjunta. (Galli, Tsai y Piliponsky , 2008) (Figura 4)

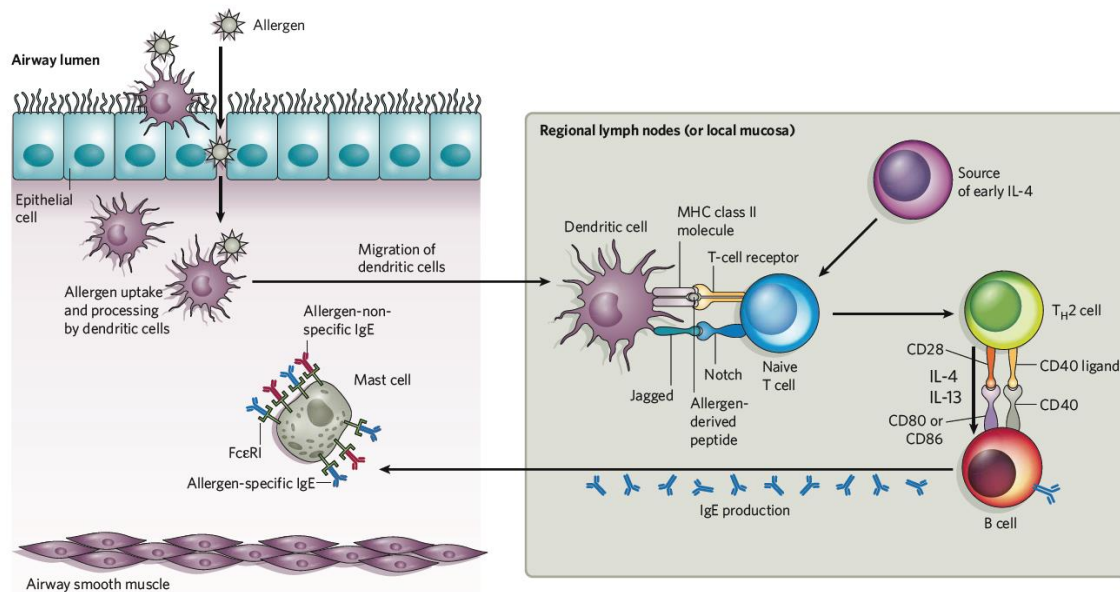


Figura 4. Sensibilización a alérgenos y polarización de la respuesta inmune adaptativa. Tomado de Galli et al 2008.

1.3. Células Dendríticas y su participación en la polarización de la respuesta inmune adaptativa

Respecto a la participación de las citocinas en la polarización de la respuesta (tercera señal), se ha descrito ampliamente que la producción de las citocinas IL-4 e IL-13 producidas por la célula dendrítica en respuesta a estímulos alérgicos favorecen una respuesta de tipo Th2, perfil característico de una respuesta alérgica. (Walsh y Mills, 2013)

Experimentos *in vitro* han demostrado que la concentración del antígeno y la duración de la interacción de la primera señal (MHC-TCR) es un factor determinante de la polarización, sin embargo, estos resultados no son del todo concluyentes ya que se demuestra que existe activación y proliferación sin que necesariamente haya polarización de la respuesta. (Langenkamp, et al 2000)

Como segunda señal durante la activación de células T, las células dendríticas expresan diversas moléculas de coestimulación en su superficie: CD80, CD86, ICOSL, Estas moléculas de coestimulación tienen la función de generar señales de activación o regulación al interactuar con sus receptores CD28, CTLA4 e ICOS en las células T. (Hubo, et al 2013) (Figura 5)

Dentro del grupo de moléculas de coestimulación se han descrito también las que de manera predominante participan en la modulación de respuestas de tolerancia periférica, a través de mecanismos de inducción de anergia. (Chen y Flies 2013) Dentro de estas moléculas denominadas moléculas de coinhibición se encuentran PD-L1 y PD-L2 cuyo receptor es el PD1 y cuya interacción ha sido estudiada brevemente en el contexto de alergia sugiriendo una participación de regulación. (Tordesillas, et al 2018; Abinav, et al 2011)

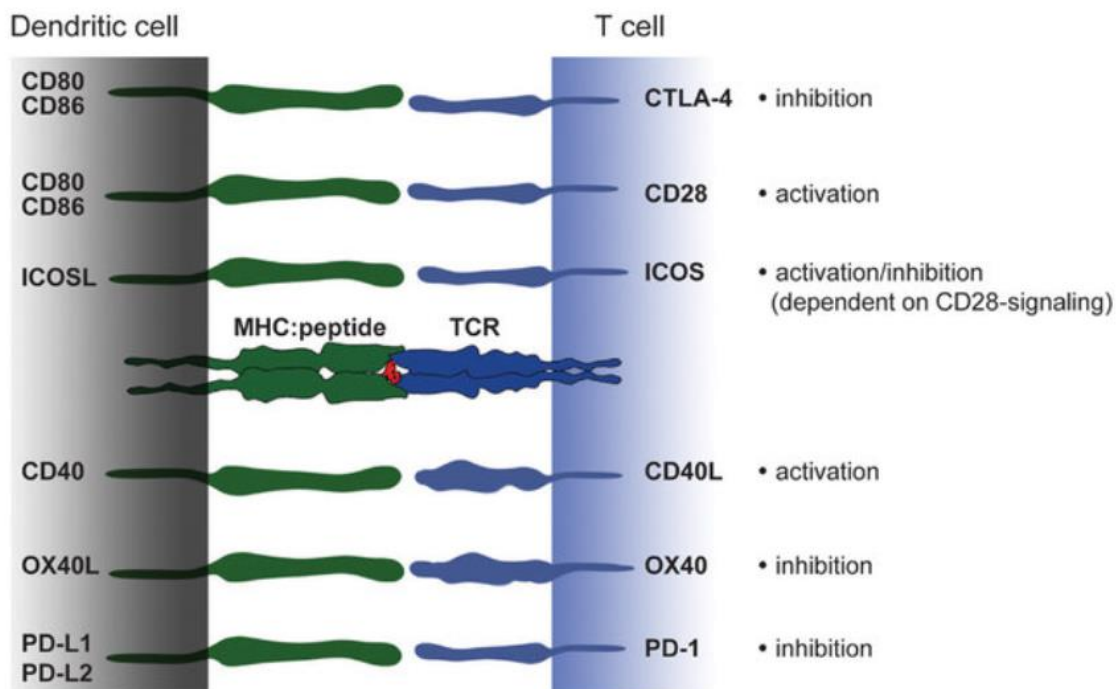


Figura 5. Moléculas coestimuladoras, coinhibidoras y sus receptores en la célula T. Tomado de Hubbo et al 2013.

1.4. Moléculas de coestimulación en alergia

La expresión de las moléculas y su interacción se ha estudiado en distintos fenómenos inmunológicos; particularmente, en el caso de las enfermedades alérgicas, existe evidencia que demuestra su activa intervención en la regulación del proceso inflamatorio en el asma. (Lombardi, Singh y Akbari , 2010)

1.4.1. Moléculas de coestimulación en CA

B7-2 (CD86)

CD86 es una molécula coestimuladora cuya interacción con su receptor CD28 en linfocitos T promueve la activación, proliferación y la polarización. Al evaluar esta molécula en el contexto de CA se ha identificado un incremento en su expresión en Mo-DC, así como en células de Langerhans de biopsias de conjuntiva ocular de pacientes. (Manzouri, et al 2010 ; El-Asrar 2001)

ICOSL (CD275)

Al igual que CD86, ICOSL es una molécula coestimuladora perteneciente a la familia B7. Aunque ICOSL es una molécula no explorada en conjuntivitis alérgica, se ha visto su participación favoreciendo la producción de citocinas Th2 posterior al reto alérgico en modelos murinos de asma. (Kadkhoda, et al, 2011). Por otra parte, en pacientes sensibilizados y en tratamiento con inmunoterapia para veneno de avispa se demostró que la estimulación de ICOS (CD278) promovía producción de citocinas asociadas a perfiles proinflamatorios Th2 y Th1. (Bellinghausen, et al 2004)

PDL1 (CD274)

PDL1 es uno de los ligandos descritos para PD1 en células T. Aunque no hay estudios que exploren su participación en conjuntivitis alérgica, investigaciones en rinitis alérgica han descrito que la forma soluble de PDL1 (sPDL1) puede ser detectado a nivel sérico y correlaciona de forma inversa con la severidad de la enfermedad. (Kalmarzi, et al, 2017)

PDL2 (CD273)

Con relación a PDL2, en un modelo murino de conjuntivitis alérgica se observó que el bloqueo de esta molécula tiene un impacto incrementando el infiltrado eosinofílico y la producción de citocinas asociadas a la respuesta inflamatoria alérgica. (Fukushima, et al ,2006)

1.5. Formas Solubles de las moléculas de coestimulación B7

Además de la expresión en la membrana en diversas células del sistema inmunitario, incluidas células dendríticas; se ha descrito que formas solubles de estas moléculas de coestimulación son detectables en fluidos corporales en distintas enfermedades como lo reportado para sCD86 en lavado bronco alveolar y en suero de pacientes con asma. (Liang et al ,2006; Shi, et al 2004) De igual manera se ha detectado sPDL1 en el suero de pacientes con rinitis alérgica. (Kalmarzi, et al 2017)

1.6. Citocinas en el contexto de la Conjuntivitis Alérgica

Como se describió en el apartado de fisiopatología de la CA, las citocinas tienen una participación crucial en la polarización de la respuesta alérgica. Diversos estudios han reportado cambios en la producción de citocinas a nivel de lagrime o a nivel sérico: estudios reportan incremento de IL-1, IL6, IL-12, IL-5 e IL-2 se encuentra incrementado en lagrime de individuos con CA en comparación de individuos sanos (Leonardi, et al, 2006), de igual manera un incremento de TNF- α en lágrima ha sido reportado en individuos con CA. (Salazar, et al 2019)

1.7. IRF4 como factor de transcripción asociado a polarización de la respuesta inmune

Diversos grupos de investigación han centrado su trabajo en investigar factores de transcripción expresados en células dendríticas que regulan su diferenciación y maduración, fenómeno indispensable para la correcta presentación antigénica y para la polarización de la respuesta inmunológica. (Bharadwaj y Agrawal 2007)

Dentro de estos factores de transcripción estudiados, IRF4 se ha asociado a la polarización de la respuesta inmune además de participar en el proceso de diferenciación. Se ha atribuido la expresión de IRF4 en la polarización a perfiles Th17. (Schlitzer,et al, 2013), Th2 (Williams, et al, 2013) y T Reg a través de la regulación de la expresión de PDL2 en DCs en modelos murinos . (Vander,et al ,2017)

1.8. Tratamiento con Inmunoterapia Sublingual Antígeno Desensibilizante

Actualmente la inmunoterapia alérgeno específica (AIT), ya sea por la vía de administración subcutánea (SCIT) o sublingual (SLIT); es el único tratamiento recomendado por guías clínicas de alergia y tiene como objetivo restaurar la tolerancia hacia los alérgenos desencadenantes de la inflamación alérgica. (Sözener et al, 2020)

La AIT se describe como un tratamiento basado en la administración controlada del alérgeno al que el paciente se encuentra sensibilizado, logrando modificar la respuesta inflamatoria Th2 y que induce tolerancia a largo plazo. (Matzuko et al, 2013)

El tratamiento basado en SLIT para los sujetos alérgicos, ha demostrado tener un perfil farmacológico más seguro y tiene efecto a nivel de células T y B en la polarización a respuesta reguladora y producción de anticuerpos IgG1, IgG4 e IgA. En relación con las células dendríticas se ha demostrado que induce la producción de IL-10 pero poco se conoce acerca de cómo modula la expresión de moléculas de coestimulación. (Larché M, Akdis C. 2006)

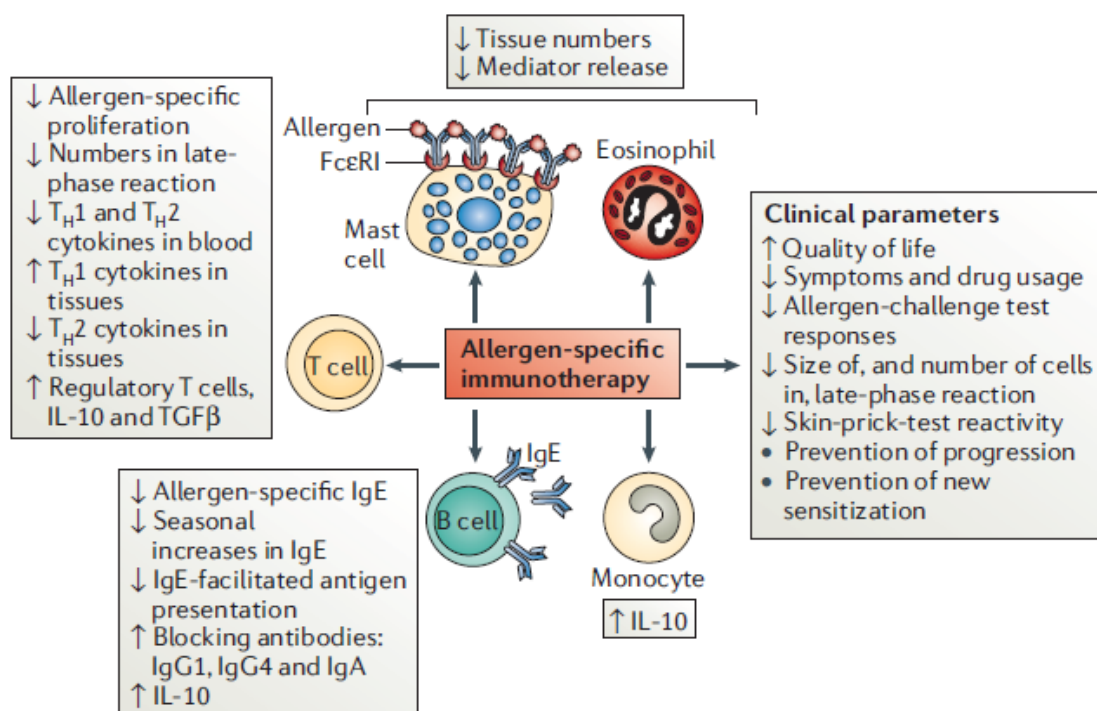


Figura 6. Efecto de la inmunoterapia alérgeno desensibilizante en la respuesta inmune. Tomado de Larché y Akdis 2006

El estudio de las moléculas de coestimulación en el contexto de la CA es un tema poco explorado, sin embargo, un estudio más profundo permitirá una mejor comprensión de la enfermedad, y del efecto de la SLIT, proponer biomarcadores y en un futuro desarrollar nuevos blancos terapéuticos.

2. Planteamiento del problema

En la actualidad, la SLIT es el único tratamiento capaz de modificar la fisiopatología de la conjuntivitis alérgica, no obstante, se conoce muy poco acerca del uso de la SLIT y la inducción de mecanismos tolerogénicos en las células de la inmunidad innata por medio de moléculas de coestimulación de la familia B7 y del factor de transcripción IRF-4 presentes en las APC de pacientes con conjuntivitis alérgica.

3. Pregunta de Investigación

En pacientes con conjuntivitis alérgica, ¿Se modificará la expresión de moléculas de coestimulación y del factor de transcripción IRF4 en las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica durante el tratamiento con SLIT comparado con la expresión de estas moléculas antes del tratamiento?

4. Justificación

La SLIT, en la conjuntivitis alérgica es la única terapia capaz de modificar la respuesta inmune al alérgeno. Por lo que el estudio de las moléculas coestimulación de la familia B7 y el factor de transcripción IRF4, proporcionará conocimientos para

entender de una mejor manera el mecanismo de acción de la SLIT y proponer biomarcadores para el monitoreo de la eficacia de este tratamiento.

5. Hipótesis

El tratamiento con SLIT disminuirá la expresión de CD86 e ICOSL, incrementará la expresión de PD-L1, PD-L2 y el factor de transcripción IRF4 en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con SLIT.

Hipótesis nula:

No existen diferencias en la expresión de moléculas de coestimulación en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica tratados con SLIT.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General:

Evaluar la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y el factor de transcripción IRF4 en células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica de pacientes con conjuntivitis alérgica antes y después del tratamiento con SLIT.

6.2. Objetivos Específicos:

- Establecer un modelo de cultivo de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica (Mo-DCs).
- Determinar la cinética de expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL, PDL1 y PDL2 y el factor de transcripción IRF4 en Mo-DCs.
- Evaluar la producción de formas solubles de las moléculas de coestimulación de la familia B7 por Mo-DCs.
- Determinar la producción de citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-2 por Mo-DCs.

-Evaluar la expresión de las moléculas de coestimulación CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2 y el factor de transcripción IRF4 en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica antes y después del tratamiento con SLIT.

7. Metodología

7.1. Tipo de estudio:

Estudio piloto, longitudinal, experimental.

7.2. Universo de estudio:

Población objetivo: Pacientes en edad pediátrica con conjuntivitis alérgica y sujetos sanos en edad pediátrica.

Población accesible/estudio: Pacientes con conjuntivitis alérgica de 7 a 17 años, que sean atendidos en el Instituto Conde de Valenciana durante el periodo de febrero 2019 a enero del 2021.

7.3. Tamaño de muestra:

El muestreo será realizado a conveniencia.

7.4. Criterios de selección sujetos con conjuntivitis alérgica:

7.4.1. Criterios de Inclusión

- Sujetos entre los 7 a 17 años, con diagnóstico oftalmológico de Conjuntivitis alérgica activa, de moderada a severa.
- Pruebas cutáneas positivas al ácaro de polvo (*Der-p*).
- Que estén por iniciar tratamiento con inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante.
- Firma de consentimiento y asentimiento informado.

7.4.2. Criterios de exclusión

- Presencia de otras enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.
- Presentar cualquier enfermedad sistémica, endocrinológica, autoinmune, neoplásica, infecciosa, crónico degenerativo activa.
- Presencia de dermatitis alérgica, rinitis alérgica o asma activa en el momento de la evaluación y/o toma de muestra.
- Embarazo y/o lactancia.
- Con algún tratamiento sistémico, que induzca algún tipo de modificación en la respuesta inmunológica, particularmente tratamientos: Naturistas, psiquiátricos, bariátricos, corticoesteroides, hormonales o inmunosupresores.

7.4.3 Criterios de eliminación

- Retiro voluntario del estudio
- Falta de apego o abandono al tratamiento
- Embarazo o lactancia durante el periodo del protocolo.
- No acuda a citas.
- Muestra biológica insuficiente.

7.5. Criterios de selección sujetos sin alergia:

7.5.1. Criterios de Inclusión

- Sujetos entre los 7 a 17 años.
- Sujetos clínicamente sanos, evaluados por el servicio de inmunología del Instituto Conde de Valenciana.
- Firma de consentimiento y asentimiento informado.

7.5.2. Criterios de exclusión

- Presenten datos clínicos concluyentes de alergia.
- Presenten datos por laboratorio concluyentes de alergia.
- Presencia de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.
- Presentar cualquier enfermedad sistémica, endocrinológica, inmunológica, neoplásica, infecciosa, y crónico degenerativo activa.
- Embarazo y/o lactancia.

- Con algún tratamiento sistémico, que induzca algún tipo de modificación en la respuesta inmunológica, particularmente tratamientos: psiquiátricos, bariátricos, corticoesteroides, hormonales o inmunosupresores.

7.5.3. Criterios de eliminación

- Retiro voluntario del estudio
- Falta de apego o abandono a las citas.
- Embarazo o lactancia durante el periodo del protocolo.
- Muestra biológica insuficiente

7.6. Materiales y métodos: Métodos específicos

7.6.1. Sujetos experimentales

Los sujetos de investigación serán divididos en un grupo control de pacientes con diagnóstico de conjuntivitis alérgica de 7 a 17 años candidatos a SLIT y otro grupo de sujetos sin alergia de 7 a 17 años.

7.6.2. Valoración clínica

En la consulta de inmunología del Instituto Conde de Valenciana el médico subespecialista en córnea evaluó a los probables sujetos sanos mediante la clasificación de severidad de conjuntivitis alérgica propuesta por Robles-Contreras, Santacruz-Valdés et al (2011). El médico subespecialista en alergia, evaluó clínicamente a los probables sujetos sanos, en caso de descartar diagnóstico del espectro alergia, se procederá a la toma de muestras de sangre para iniciar con los ensayos experimentales.

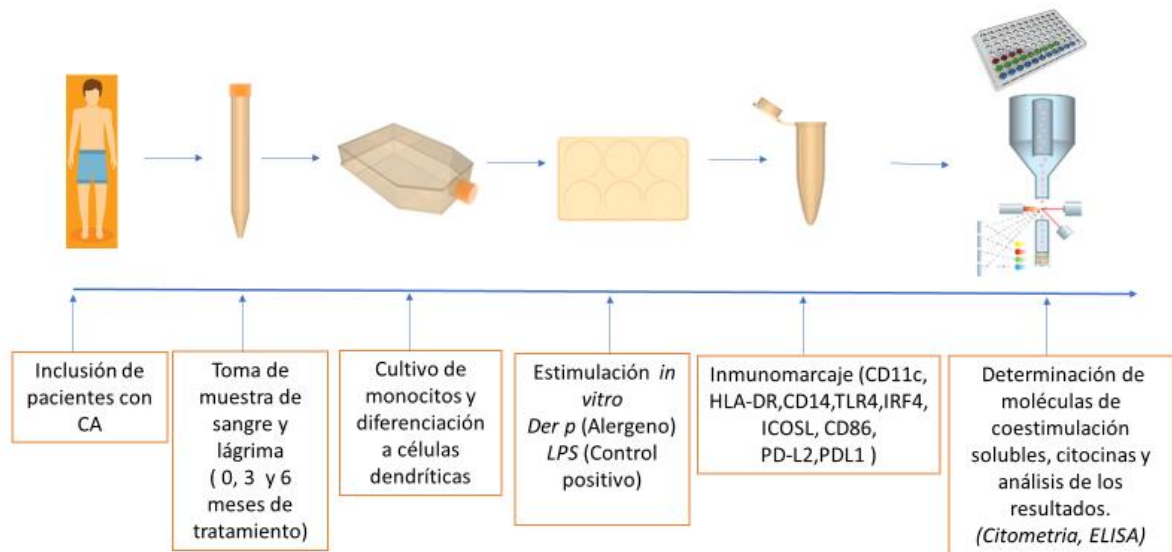


Figura 7.- Metodología para el análisis de la expresión de las moléculas de coestimulación.

Los sujetos con conjuntivitis fueron reclutados de la consulta de Inmunología del Instituto Conde de Valenciana.

7.6.3. Recolección de muestras sanguíneas.

Se verificó la previa firma de consentimiento y asentimiento informado,

Se realizó el lavado de manos y colocación de guantes.

Se recolectó sangre periférica mediante venopunción en tubos de EDTA y 1 tubo amarillo sin anticoagulante. Las muestras de sangre obtenidas de los tubos EDTA, se procesaron inmediatamente. Las muestras de sangre de los tubos amarillos se centrifugaron a 1500 rpm por 5min, el suero será distribuyó en microtubos de 1.5ml y almacenados en congelación a -20°C hasta su uso.

7.6.4. Recolección de lágrima.

Se colocaron 20 microlitros de solución salina estéril en cada ojo del paciente y la película lagrimal será obtuvo de ambos ojos desde el menisco lagrimal lateral inferior mediante capilaridad. Usando un tubo capilar de borosilicato diferente por cada ojo. Las muestras obtenidas se depositaron en microtubos de 10 µl, los cuales se almacenaron en congelación a -80 ° C hasta su uso.

7.6.5. Cultivo de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica

Se realizó la separación de células mononucleares a partir de sangre periférica, por medio del método de separación por gradiente de densidad con Lymphoprep.

Las células mononucleares se cultivaron en medio RPMI-1640 en placas de cultivo de 24 pozos, y se incubaron en la incubadora por 2 horas a 36°C, en una atmósfera de 5% CO₂. Posteriormente las células en suspensión se descartaron, y a las células adherentes se les añadió medio RPMI-1640 suplementado con 80 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 para su diferenciación a células dendríticas.

Después de 7 días se realizaron los siguientes ensayos:

- Inmunofenotipificación de células diferenciadas
- Estimulación *in vitro* con proteína *Der-p* por 12, 24 y 48 horas.
- Estimulación *in vitro* con 100ng, 1µg y 10 µg de LPS por 12, 24 y 48 horas.

7.6.6. Marcaje de antígenos de membrana e intracelular:

Para evaluar la expresión de las moléculas de coestimulación B7 y el factor de transcripción IRF4 se utilizaron los anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos distribuidos en dos paneles:

Panel 1:

Alexa Fluor 488 Anti-human CD11c, PE/Cy7 Anti-human HLA-DR, PerCP Anti-human CD14, PE Anti-human IRF4, APC Anti-human CD273 (B7-DC, PD-L2), Brilliant violet 421 Anti CD284 (TLR4).

Panel 2:

Alexa Fluor 488 Anti-human CD11c, PE/Cy7 Anti-human HLA-DR, PerCP Anti-human CD14, PE Anti-human CD86, APC Anti-human CD275 (B7-H2, ICOSL), Brilliant violet 421 Anti CD274 (B7-H1, PD-L1).

Posterior a la estimulación con *LPS* o *Der p*, las células se recolectaron, se añadió 2%EDTA+Trypsin a las placas de cultivo para lograr una completa recuperación de

las células adherentes. Las células recolectadas fueron transferidas a microtubos de 1.2 ml. Los tubos fueron centrifugados para la recuperación de los sobrenadantes. Las células fueron re-suspendidas en 300 µl de PBS y transferidas a tubos de 12x75mm. Los tubos fueron centrifugados y decantados. Las células ser resuspendieron en 50 µl de medio PBS y se añadieron los anticuerpos conjugados a fluorocromos, las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Para la tinción intracelular de IRF4, las células fueron tratadas previamente con una solución fijadora y permeabilizante.

Se realizó un último lavado y las células se Re suspendieron en 300µl. Los tubos se mantuvieron en oscuridad hasta el momento de su adquisición en el citómetro de flujo.

7.6.7. Análisis de los datos de citometría de flujo.

Los análisis se realizaron en el software Flow Jo V10. Se analizaron las intensidades medias de fluorescencia (IMF) a las distintas marcas en Mo-DCs de sujetos sanos y en Mo-DCs de pacientes antes y durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual.

Se siguió la estrategia de análisis para determinar la IMF de las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica. Se seleccionaron los singlets (células individuales) usando FSC-H (altura)/FSC-A (área), después dependiendo de su tamaño celular y granularidad usando FSC/SSC en un dot plot, se seleccionaron los eventos sugerentes de Mo-DCs, finalmente se seleccionaron los eventos HLA-DR+ para determinar a partir de esta población el IMF de cada molécula de coestimulación.

7.6.8. Determinación de moléculas de coestimulación solubles.

Se utilizaron las muestras de lagrime, suero y sobrenadantes de cultivos celular para la determinación de las formas solubles para las moléculas de coestimulación a través de método de ELISA sanwich. Se utilizaron los kits de ELISA de (Cloud Clone, Kathy, Texas, EUA) para detección de sCD86, sICOSL, sPDL1 y sPDL2. Los sobrenadantes fueron incubados en las placas de ELISA conteniendo un anticuerpo de captura específico para cada molécula de coestimulación soluble, y con un anticuerpo secundario acoplado a

peroxidasa de rábano se obtuvo una reacción colorimétrica. La densidad óptica fue extrapolada con las concentraciones de la curva estándar para realizar la determinación en ng/ml de cada molécula de coestimulación.

Los límites de detección son los siguientes: CD86: 0.057 ng/mL, ICOS-L: 0.062 ng/mL, PDL1: 0.061 ng/mL y PDL2: 0.075 ng/mL.

7.6.9. Determinación de citocinas en cultivo de Mo-DCs.

Se determinaron las citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ por Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) Los datos fueron analizados utilizando el software FCAP Array™.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Los sobrenadantes fueron incubados con las perlas de captura acopladas a FITC con anticuerpos específicos para cada citocina determinada, posteriormente se agregó el anticuerpo conjugado a PE permitiendo detectar la citocinas en sobrenadante. Los valores de fluorescencia relativa fueron extrapolados con la curva de concentración permitiendo cuantificar la concentración de las citocinas.

Los límites de detección son: IL-2: 2.6 ng/mL, IL-6: 2.4 ng/mL, IL-10:4.5 ng/mL, TNF- γ : 3.8, and IFN- γ : 3.7 ng/mL.

7.6.10. Análisis estadístico de los resultados:

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente, con triplicados de cada condición. Se utilizó el software GraphPad Prism version 8.0. Se utilizó la escala de colores para daltónicos en las gráficas de barras coloreadas. Se realizó una prueba de normalidad a todos los datos obtenidos. Se aplicó la prueba Kruskal-Wallis para comparar 3 o más grupos para determinar diferencias estadísticas en las moléculas de coestimulación de membrana. Se aplicó la prueba de Dunnet para determinar las diferencias estadísticas en la concentración de las formas solubles de las moléculas de coestimulación. La prueba de Tukey se utilizó para analizar las diferencias estadísticas en la producción de citocinas. En las pruebas de correlación se utilizó la prueba de Pearson o Spearman dependiendo de la distribución de los datos. En todos los casos se consideró $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

8. Consideraciones éticas

A todos los sujetos experimentales (pacientes y controles sanos), que participaron en el estudio, dieron su consentimiento y/o asentimiento informado, los cuales firmaron antes de participar en el estudio. Este protocolo se basa en la NOM 012 SSA3 2012, la cual establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, la cual concuerda con la norma internacional “Declaración de Helsinki” sobre los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y con el “Protocolo de Estambul”, el cual es el manual para la investigación y documentación eficaces de la tortura y otros tratos o penas crueles, inhumanos o degradantes.

Las consultas médicas de los sujetos con conjuntivitis alérgica no tuvieron costo para los padres o responsables durante el periodo de estudio.

9. Aspectos de bioseguridad

La toma de muestra de sangre y lágrima se llevó en el área de toma de muestra en el 4to piso del edificio de hospitalización del Instituto Conde de Valenciana de acuerdo con el manual de procedimientos del área de toma de muestra de la misma institución.

Durante la realización de los ensayos experimentales del presente trabajo de investigación, se vigiló el cumplimiento de las siguientes Normas Oficiales Mexicanas (NOM):

NOM-017-STPS-2008 Para el equipo de protección personal- Selección, uso y manejo en los centros de trabajo.

NOM-005-STPS-1998. Para las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

NOM-018-STPS-2000. Para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas en los centros de trabajo.

NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002). Para la protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos-biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.

10. Financiamiento y sitio de la investigación

Fue otorgado por el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM/Unidad de investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” IAP.

11. Declaración de conflicto de intereses de los investigadores

No existe conflicto de interés

12. Resultados

12.1. Establecimiento de un modelo para investigación de moléculas de coestimulación en células dendríticas derivadas de monocitos en sujetos sanos

Exploración de la dinámica de expresión de moléculas de coestimulación B7 e IRF4 en membrana de Mo-DCs, determinación de moléculas solubles en sobrenadante de cultivos y determinación de citocinas producidas Mo-DCs.

12.2. Verificación de fenotipo

Para confirmar la diferenciación de monocitos a células dendríticas se evaluó la expresión de las moléculas CD14, CD11c y HLA-DR al día 0 de cultivo y al día 7 de cultivo con factores de crecimiento. (Figura 8)

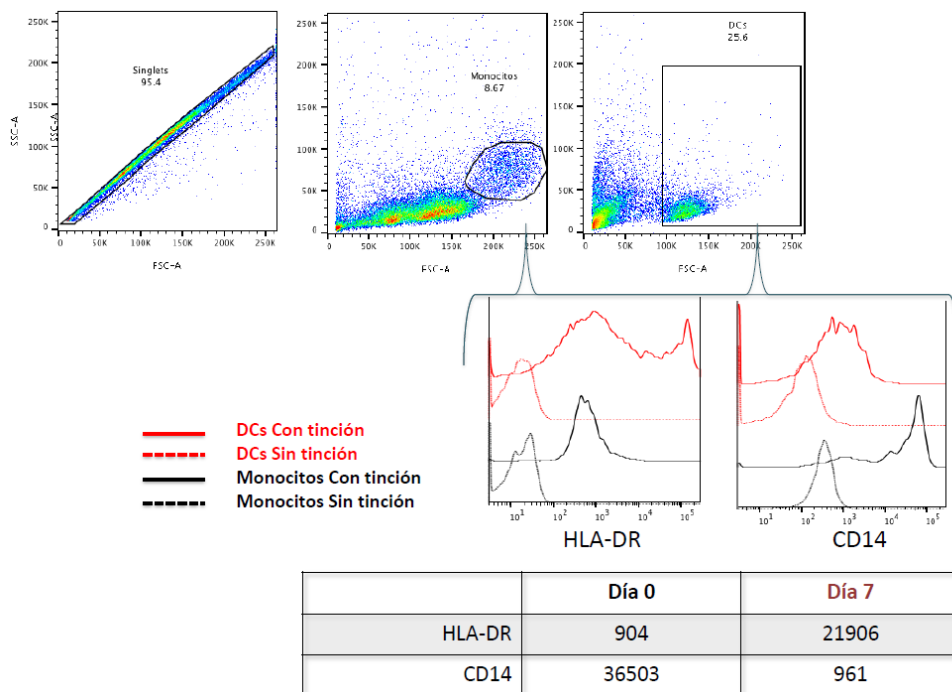


Figura 8. Verificación de fenotipo en monocitos y células dendríticas diferenciadas. Se evaluó la expresión de CD11c y HLA-DR. Histogramas negros continuos representan los monocitos con tinción, histogramas negros punteados son monocitos sin tinción, histograma rojo continuo representa a las células dendríticas teñidas y el histograma rojo punteado representa células dendríticas sin tinción.

12.3. Estrategia de análisis para datos de citometría de flujo

A partir de células individuales se seleccionó la región que por tamaño y granularidad corresponde a células dendríticas, seleccionando la población HLA-DR+ se procedió a evaluar la expresión de las distintas moléculas de la estimulación en las distintas condiciones de tiempo y concentración de estimulación en histogramas superpuestos. (Figura 9)

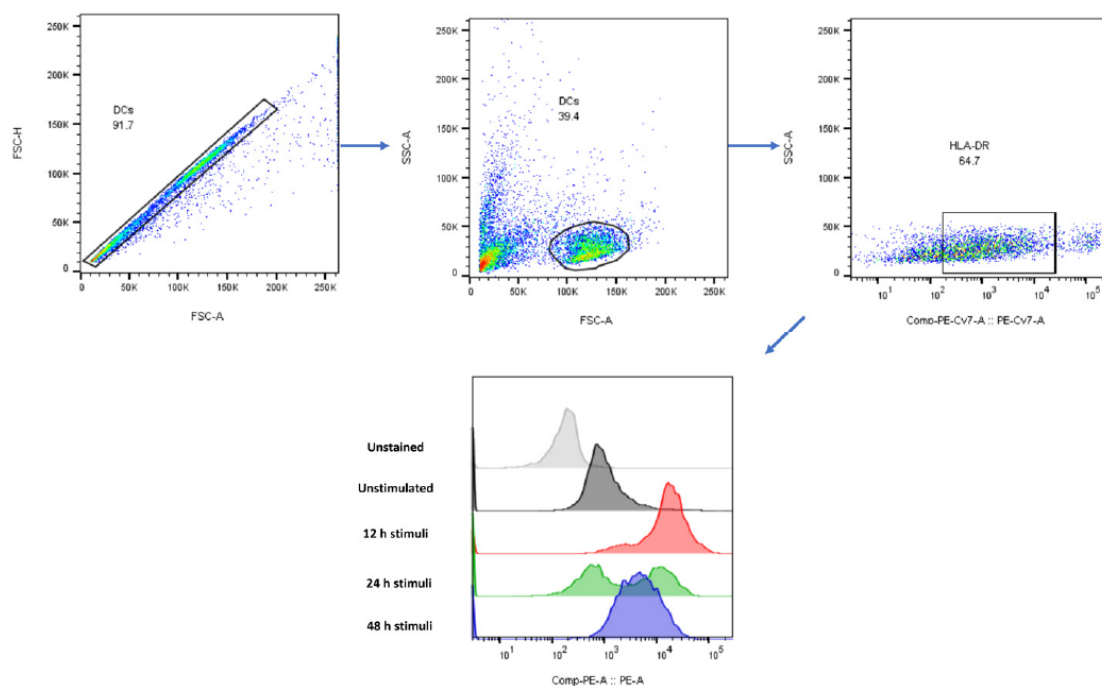


Figura 9.- Estrategia de análisis para citometría de flujo.

Células individuales fueron seleccionadas de acuerdo con los parámetros de área y altura (FSC-A vs FSC-H). Se seleccionaron eventos sugerentes de células dendríticas de acuerdo con su tamaño y granularidad. (FSC-A vs SSC-A). Células HLA-DR+ se seleccionaron para realizar la evaluación de IMF para las distintas moléculas de coestimulación en las distintas condiciones experimentales.

12.4. Expresión de las moléculas de coestimulación en células dendríticas.

Para evaluar el efecto de la concentración de LPS y el tiempo de estimulación sobre la expresión de moléculas de coestimulación B7 de membrana, se estimularon MoDCs con 100ng, 1µg o 10 µg de LPS durante 12, 24 o 48h o fueron dejadas sin estimular.

Se encontró que las moléculas coinhibitorias PDL1 y PDL2 aumentan su expresión luego de 12h de estimulación con todas las concentraciones evaluadas. PDL1 aumento progresivamente su expresión en el tiempo. Por otra parte, las moléculas de coestimuladoras CD86 e ICOSL aumentan su expresión hasta las 48h de estimulación con cualquier concentración de LPS. (Figura 10 y Tabla 2)

Tabla 2. Cinética de expresión de las moléculas de coestimulación. Se muestra la MFI promedio para CD86, ICOSL, PDL1 y PDL2. MoDCs de donadores sanos se estimularon con 100ng, 1 µg, o 10 µg de LPS por 12, 24 o 48 horas o con medio RPMI (SE). Se muestra la mediana y rangos intercuartiles.

Molécula B7	SE	Tiempo de estimulación			p
		12h	24h	48h	
CD86 100ng	437 (242-1123)*	399 (236.5-1135)	516 (340-1193)	951 (558-5623)	*0.021
CD86 1 ug	437 (242-1123)*	502 (264.5-1292)	695 (479-1103)	688 (620-5277)*	*0.044
CD86 10ug	437 (242-1123)*	387 (243-1271)	707 (356-1636)	680 (560-3474) *	*0.044
ICOSL 100ng	526 (272-1135)*	1259 (952-1755)	925 (542-3280)	1395 (891.5-2576)*	*0.0066
ICOSL 1ug	526 (272-1135)*	1684 (981-2538)*	907 (505-3743)	1062(842-221)	*0.0034
ICOSL 10ug	526 (272-1135)*	1462 (807-2089)	759(442-3728)	1768 (940-2850)*	*0.0066
PDL1 100ng	1523(1217-2483)*¶¥	4132(1681-4554)*	3389 (4851)¶ (3181-	3426(2987-8315)¥	*0.012,¶<0.0001,¥0.0003
PDL1 1ug	1523(1217-2483)*¶¥	33548 (2487-5079)*	5073(3496-6193)¶	5511(3933-9136)¥	*0.0003,¶<0.0001,¥<0.001
PDL1 10ng	1523(1217-2483)*¶¥	2973 (1863-3465)*	3805(3634-5782)¶	4293(3824-9020)¥	*0.003,¶<0.0001,¥<0.0001
PDL2 100ng	1238(725-1501)*	1508 (1268-2692)*	1004(295-2212)	1474 (1321-1706)	*0.0170
PDL2 1 ug	1238(725-1501)*¶	1555(1281-3835)*	1055(896-1759)	1789(1619-1904)¶	*0.0259,¶0.0009
PDL2 10ug	1238(725-1501)*¶	1655 (1348-3801)*	1205(1074-1797)	1609(1397-2107)¶	*0.0096,¶0.0199

Con relación a IRF4 se observó que su expresión se incrementa a las 12h de estimulación con 100ng de LPS y a las 48h con 1 µg o 10 µg de LPS. Interesantemente esta dinámica de expresión coincide con la de PDL2 y existe correlación entre estas dos moléculas. (Figura 11)

En otro abordaje, se analizó el número de veces que estas moléculas incrementaban su expresión. Los resultados demostraron que C86 se incrementa tres veces a las 48 de estímulo, ICOSL incrementa 1 vez en todos los tiempos evaluados, PDL1 incrementa de forma gradual a lo largo del tiempo, y PDL2 incrementa 1 vez a las 12 h de estímulo. (Figura 12)

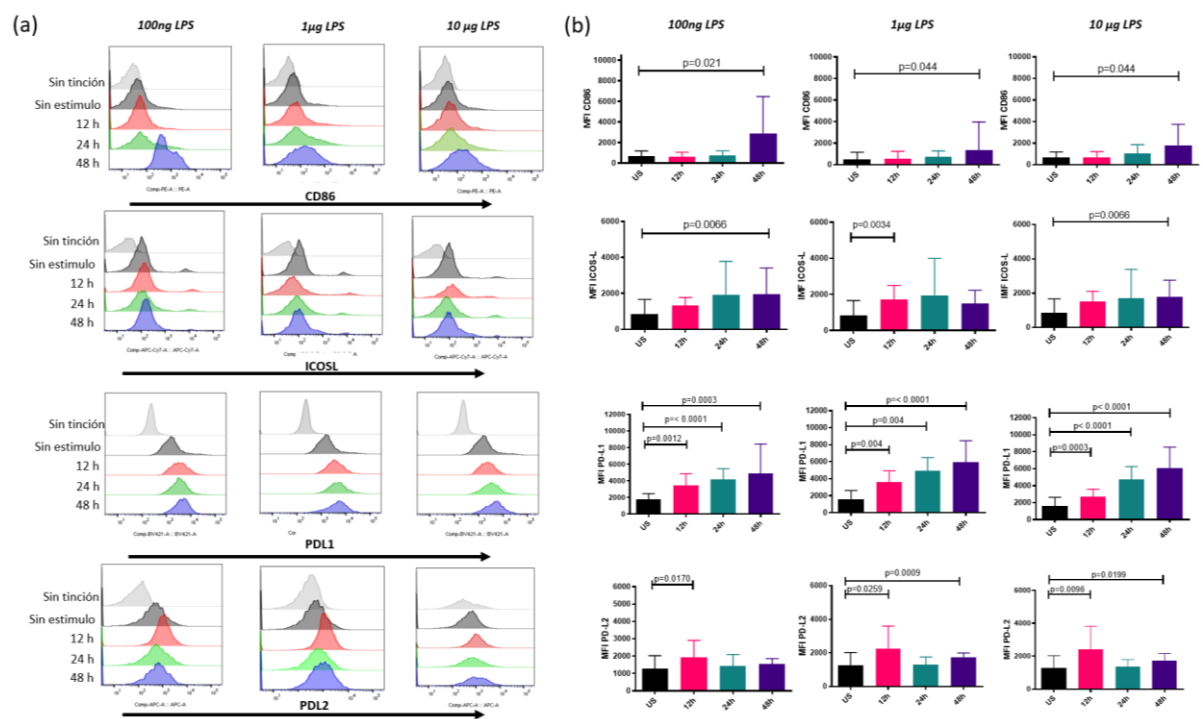


Figura 10. Expresión de las moléculas de coestimulación en Mo-DCs.

Mo-DCs de sujetos sanos fueron estimuladas con LPS durante 12, 24 o 48h con 100ng, 1µg o 10 µg de LPS o sin estimular (US). La gráfica representa la media y desviación de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

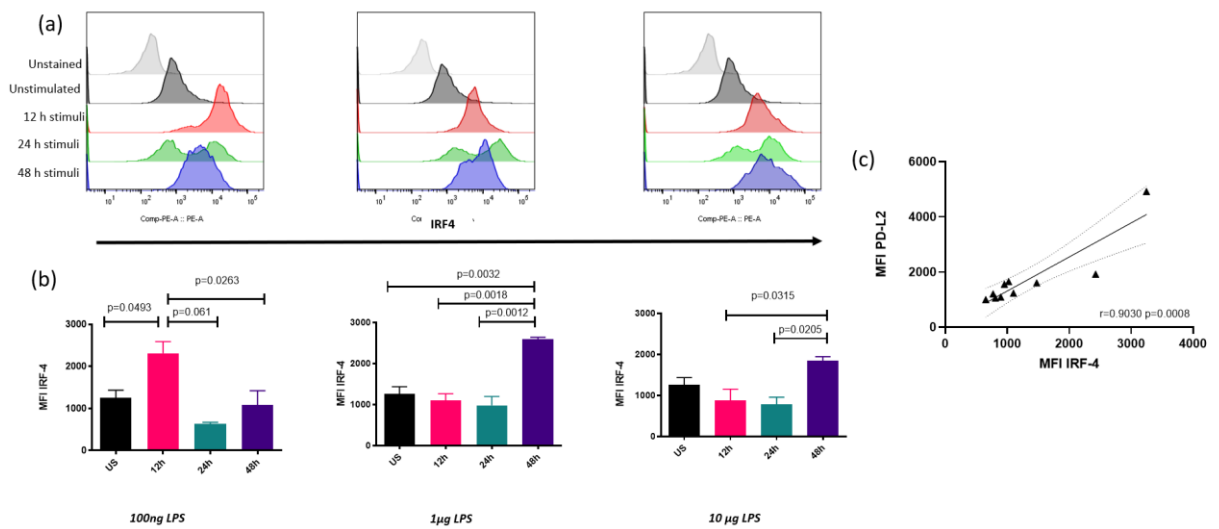


Figura 11. Expresión de IRF4 en Mo-DCs y su correlación con PDL2. Mo-DCs de sujetos sanos fueron estimuladas con LPS durante 12, 24 o 48h con 100ng, 1µg o 10 µg de LPS o sin estimular (US). (a)Histograma representativo de la expresión de IRF4 en las diferentes condiciones experimentales. (b) Media y desviación de 3 ensayos independientes realizados por triplicado. (c) Correlación de Pearson entre IRF4 y PDL2.

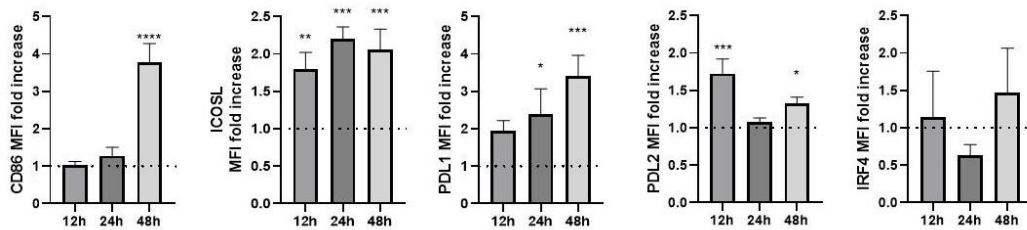


Figura 12. Incremento de la expresión de las moléculas de coestimulación B7 en Mo-DCs. El incremento de expresión de las moléculas de coestimulación se calculó dividiendo el promedio del IMF de la condición experimental entre el promedio de la IMF en células sin estimular. La gráfica representa la media y desviación de 3 ensayos independientes realizados por triplicado. La línea punteada representa la expresión basal de la molécula en cuestión.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$.

12.5. Evaluación de la concentración de formas solubles de las moléculas de coestimulación.

Para determinar las concentraciones de las formas solubles de las moléculas de coestimulación, se recuperó el sobrenadante de células dendríticas estimuladas con LPS, y se determinaron las concentraciones de sCD86, sICOSL, sPDL1 y sPDL2. Nuestros resultados mostraron que sPDL1 y sPDL2 son las moléculas con mayor concentración sin importar la condición de estímulo de las células dendríticas. sPDL1 y sPDL2 se encontraron en una proporción 2:1 en comparación con sCD86 (400ng:200ng). sICOSL no fue detectado en ninguna de las condiciones evaluadas. (Figura 13 y Tabla 3)

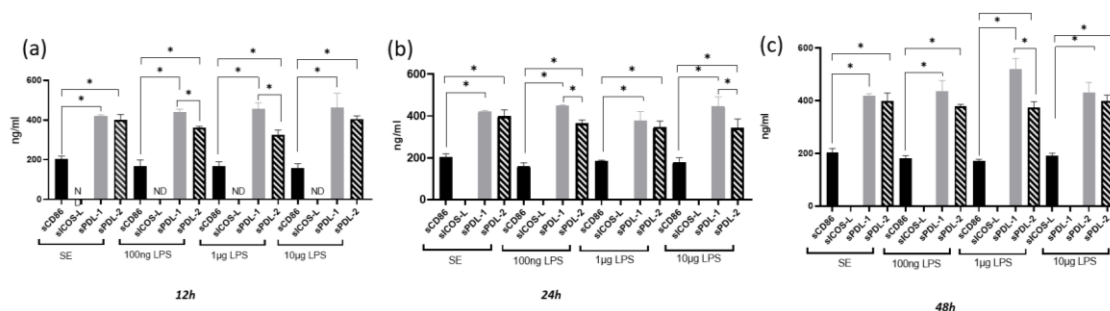


Figura 13. Concentración de las formas solubles de CD86, ICOSL, PDL1 y PDL2.

Mo-DCs de sujetos sanos fueron estimuladas con LPS durante (a)12, (b) 24, o (c) 48h con 100ng, 1µg o 10 µg de LPS o fueron cultivadas sin estimular (SE). La gráfica representa la media y desviación de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Tabla 3. Concentración de sCD86, sICOSL, sPDL1 y sPDL2. MoDCs de donadores sanos se estimularon con 100ng, 1 µg, o 10 µg de LPS por 12, 24 o 48 horas o con medio RPMI (SE). El sobrenadante fue recolectado y se determinaron las formas solubles de las moléculas de coestimulación. (ICOSL no se detectó en ninguna de las condiciones evaluadas. Se muestra la media y desviación estándar. *p<0.05

Concentración de LPS	Molécula coestimuladora soluble en ng/ml			
	sCD86	sICOS-L	sPDL-1	sPDL-2
12h				
SE	203±15.41*	0±0	419.8±6.249*	399.2±29.17*
100 ng	166.5±31.68*	0±0	441.7±12.5*¶	360.4±7.765*¶
1µg	167.6±21.5*	0±0	455.3±32.47*¶	324.5±24.96*¶
10µg	158.2±21.6*	0±0	464.8±70.43*	405.2±16.16*
24h				
SE	203±15.41*	0±0	419.8±6.249*	399.2±29.17*
100 ng	158.2±17.44*	0±0	448.5±4.724*¶	364.8±15.53*¶
1µg	183±5.4*	0±0	376.2±43.74*	346.9±28*
10µg	178.2±21.5*	0±0	445.7±45.06*¶	342.4±42.76*¶

48h	sCD86	sICOS-L	sPDL-1	sPDL-2
SE	203±15.41*	0±0	419.8±6.249*	399.2±29.17*
100 ng	158.2±17.44*	0±0	448.5±4.724*	364.8±15.53*
1µg	183±5.4*	0±0	376.2±43.74*¶	346.9±28*¶
10µg	178.2±21.5*	0±0	445.7±45.06*	342.4±42.76*

12.6. Citocinas en sobrenadante de cultivos.

Se recuperó el sobrenadante de Mo-DCs estimuladas con LPS y se determinaron las concentraciones de las citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-2.

Se identificó que las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 incrementaban su concentración a las 12 h de estímulo mientras que IFN- γ e IL-2 hasta las 48h. Interesantemente, la concentración de IFN- γ incrementaba conforme a la concentración del estímulo con LPS. (Figura 14 y Tabla 3)

La correlación entre citocinas y expresión de moléculas de coestimulación ha sido sugerida por investigaciones previas. A través de pruebas de correlación de Pearson, se encontró una correlación positiva entre IFN- γ e IL-2 con CD86 y PDL1. (Figura 15 y Tabla 5)

Tabla 4. cinética de producción de citocinas solubles. El sobrenadante de los cultivos fue recolectado y se determinó TNF- α , IL-6, IL-10, INF- γ , e IL-2 como se describe en materiales y métodos. Se muestra la media y desviación estándar de 3 ensayos independientes.

Citocinas	Tiempo de estimulación				p
	US	12h	24h	48h	
TNF- α 100 ng	1.93±0.6437*¶	812.2±278.7*¥	547.1±96.17¶	213.1±24.2¥	*0.007,¶0.0085,¥0.0049
TNF- α 1µg	1.93±0.6437*¶	1406±51.6*¥	778.1±262.8¶¶	290±66.37¥	*<0.0001,¶0.0006,¥<0.0001,Φ0.0107
TNF- α 10µg	1.93±0.6437*¶¥	1182±75.75*¶¶	923.8±145	354.1±98.75	*<0.0001,¶<0.0001,¥<0.0085,Φ<0.0001
IL-6 100 ng	0.4833±0.4252*¶¥	1589±389.5*	2122±491.6¶	2038±289.3¥	*0.0022,¶0.003,¥0.004
IL-6 1µg	0.4833±0.4252*¶¥	3468±684.3*	2375±1095¶	2369±484.3¥	*0.0012,¶0.0125,¥0.127
IL-6 10µg	0.4833±0.4252*¶¥	2868±785.6*	2495±693.7¶	3194±907.4¥	*0.0043,¶0.0097,¥0.0022
IL-10 100 ng	0.2067±0.358*	15.31±6.757	23.28±9.245*	15.38±3.913	*0.007
IL-10 1µg	0.2067±0.358*	48±9.982*	26.62±21.29	15.3±8.726	*0.007
IL-10 10µg	0.2067±0.358*	35.06±19.29*	21.76±7.466	24.89±10.34	*0.0253
IFN- γ 100 ng	0±0*	10.91±3.627¶	35.64±27.42¥	140.7±59.75*¶¥	*0.0047,¶0.0065,¥0.0178
IFN- γ 1µg	0±0*	21.17±4.69¶	97.47±39.96¥	572.4±133.5*¶¥	*<0.0001,¶<0.0001,¥0.0001

IFN- γ 10 μ g	0 \pm 0*	21.11 \pm 16.57¶	195 \pm 46.82¥	957.8 \pm 413*¶¥	*0.0022, ¶0.0025, ¥0.0087
IL-2 100 ng	0 \pm 0	0.2033 \pm 0.3522	0.6967 \pm 0.2892	3.817 \pm 3.816	
IL-2 1 μ g	0 \pm 0*	1.127 \pm 0.9981	1.64 \pm 0.6235	2.69 \pm 0.7712*	*0.0068
IL-2 γ 10 μ g	0 \pm 0*¶	1.653 \pm 0.774¥	3.143 \pm 0.7006*	4.323 \pm 1.43¶¥	*0.0105, ¶0.0015, ¥0.0252

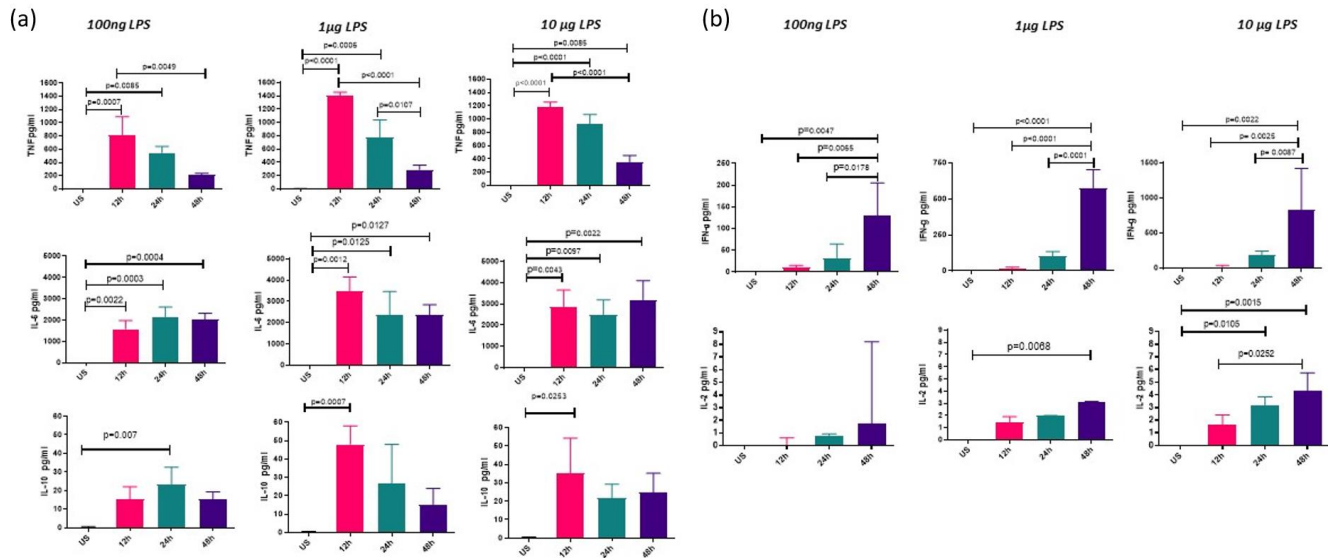


Figura 14. Producción de citocinas solubles en sobrenadante de células dendríticas. Mo-DCs de sujetos sanos fueron estimuladas con LPS durante 12, 24 o 48h con 100ng, 1 μ g o 10 μ g de LPS o fueron cultivadas sin estimular (SE). El sobrenadante fue recolectado y se determinaron las citocinas (a) TNF- α , IL-6 IL-10 y (b) IFN- γ e IL-2. La gráfica representa la media y desviación de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

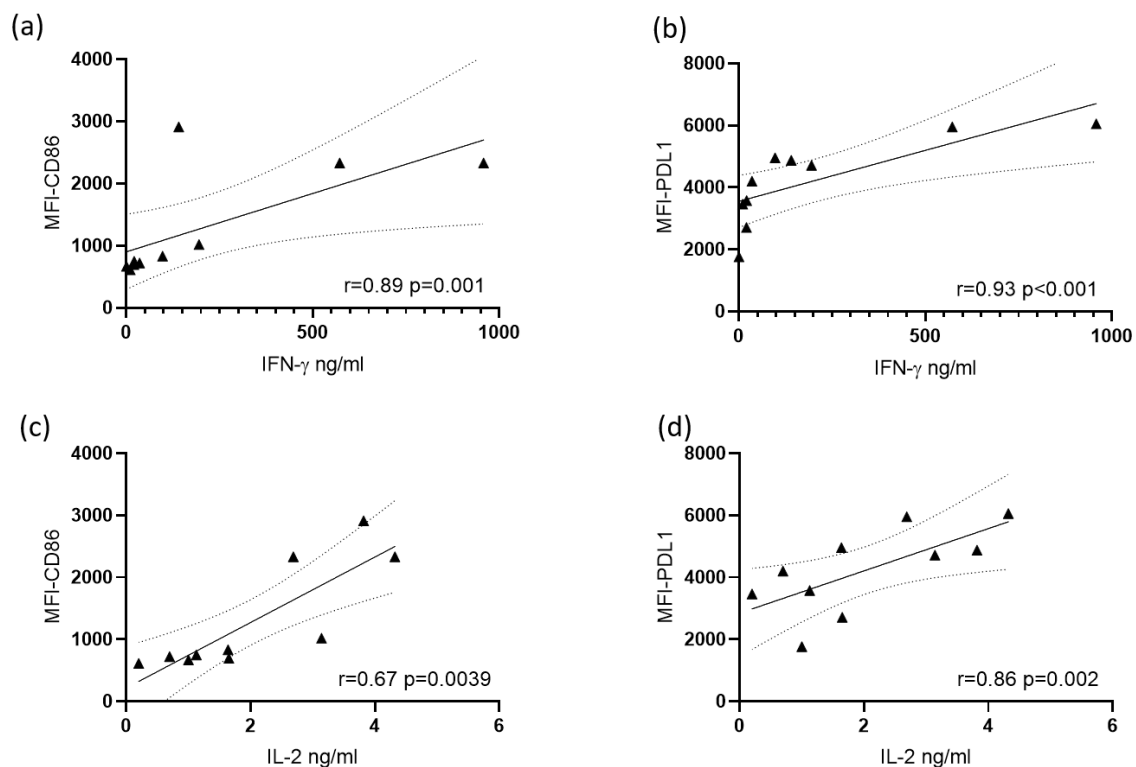


Figura 15. Correlación entre concentración de citocinas y expresión de moléculas de coestimulación.

La prueba de correlación de Pearson se realizó entre las variables de concentración de citocinas y la IFM para las moléculas de coestimulación en las distintas condiciones experimentales. (a) IFN- γ vs. CD86, (b) IFN- γ vs. PDL1, (c) IL-2 vs. CD86, (d) IL-2 vs. PDL1.

Tabla 5. Matriz de correlación entre citocinas vs moléculas de coestimulación e IRF4. Se muestra el valor de r para las diferentes correlaciones evaluadas por la prueba de Spearman. * $p < 0.05$

		Moléculas de coestimulación				
		CD86	ICOSL	PDL1	PDL2	IRF-4
Citocinas	TNF- α	-0.54	0.25	-0.19	0.65	-0.31
	IL-6	0.31	0.32	0.32	0.45	-0.18
	IL-10	0.04	0.54	0.07	0.41	-0.45
	IFN- γ	0.89*	0.47	0.93*	-0.07	0.07
	IL-2	0.86*	0.35	0.67*	0.01	0.03

Los hallazgos de este primer parte del trabajo de investigación se pueden observar de forma resumida en la Figura 16. Modelo integrativo explicativo de la dinámica de expresión de moléculas de coestimulación.

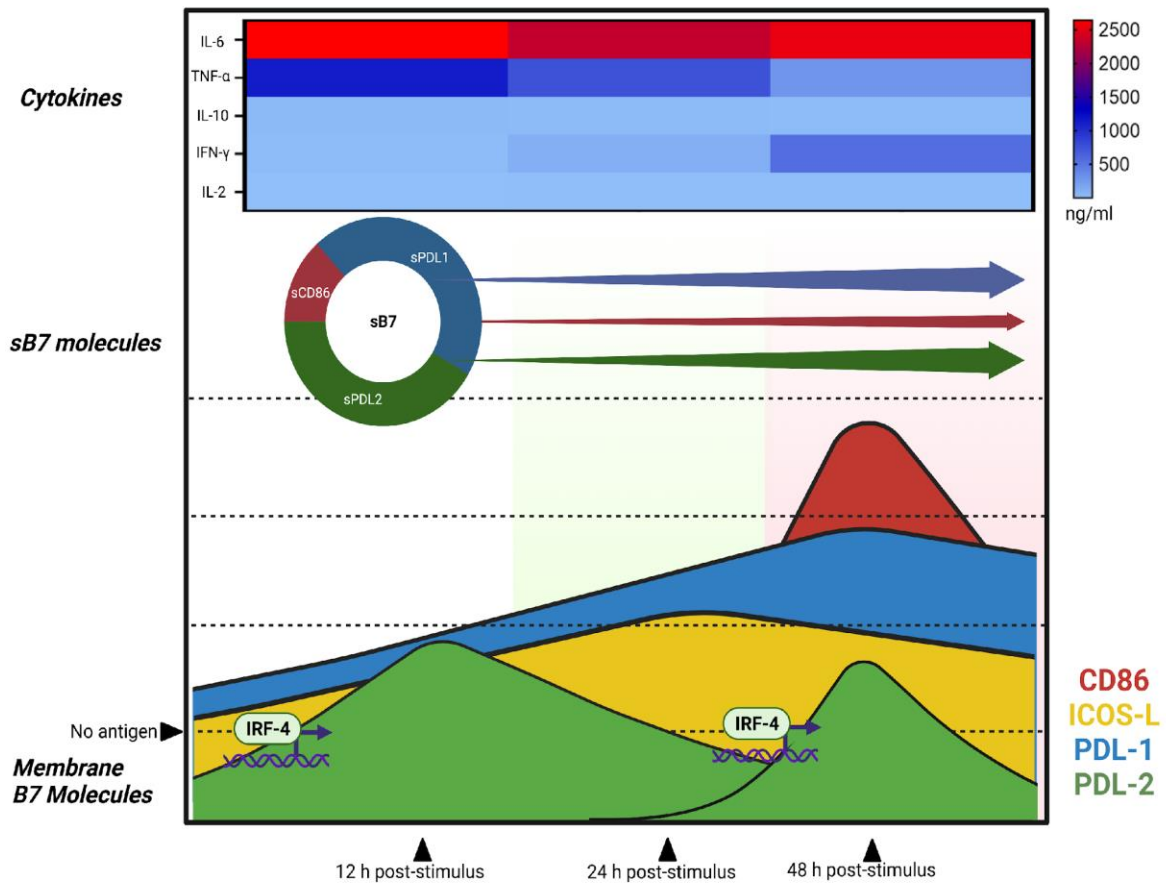


Figura 16. Modelo integrativo explicativo de la dinámica de expresión de moléculas de coestimulación. Las moléculas de coestimulación B7 se expresan de forma diferencial. Mo-DCs incrementan la expresión de PDL1 y PDL2 durante las etapas tempranas de estimulación. IRF4 tiene una dinámica de expresión semejante a PDL2 y se sugiere que favorece su expresión. A 24 h de estimulación la expresión de PDL1 se mantiene y se puede observar el incremento de la expresión de ICOSL. A las 48 de estímulo PDL2 e IRF4 vuelven a tener un incremento en su expresión al igual que PDL1 y CD86. Respecto a las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 muestran un pico de producción a las 12h de estímulo mientras que IFN- γ and IL-2, lo hacen hasta las 48 h. Finalmente, las moléculas solubles mostraron un comportamiento constante sin importar el tiempo o la concentración del estímulo: sPDL1 y sPDL2 se encuentra en una concentración dos veces mayor que CD86.

12.7. Expresión de moléculas de coestimulación en pacientes con conjuntivitis alérgica.

Evaluación de la expresión de las moléculas de coestimulación en sujetos con conjuntivitis alérgica.

Se reclutaron 3 sujetos sanos y 2 pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión descritos en el capítulo 7.4. Se realizó la obtención de Mo-DCs y se realizó la tinción para citometría de flujo descrita en el capítulo 7.6.

Al analizar la expresión de las moléculas de coestimulación B7 en Mo-DCs de sujetos con conjuntivitis alérgica se encontró un incremento en la expresión para CD86 únicamente en la condición de estímulo de LPS+ Der P. (Figura 17)

Para el caso de la molécula de ICOSL, se observó que ninguna condición de estímulo indujo la expresión de esta molécula, a diferencia de los sujetos sanos en quienes su expresión se incrementó con el estímulo de LPS. (Figura18)

Para el caso de las moléculas coinhibidoras PDL1 y PDL2, se encontró un fenómeno semejante; su expresión no se incrementa con ninguno de los estímulos evaluados. (Figura 19 y 20)

Finalmente el factor de transcripción IRF4 mostró una disminución cuando las Mo-DCs de pacientes con conjuntivitis alérgica eran estimuladas con el alérgeno Der p. (Figura 21)

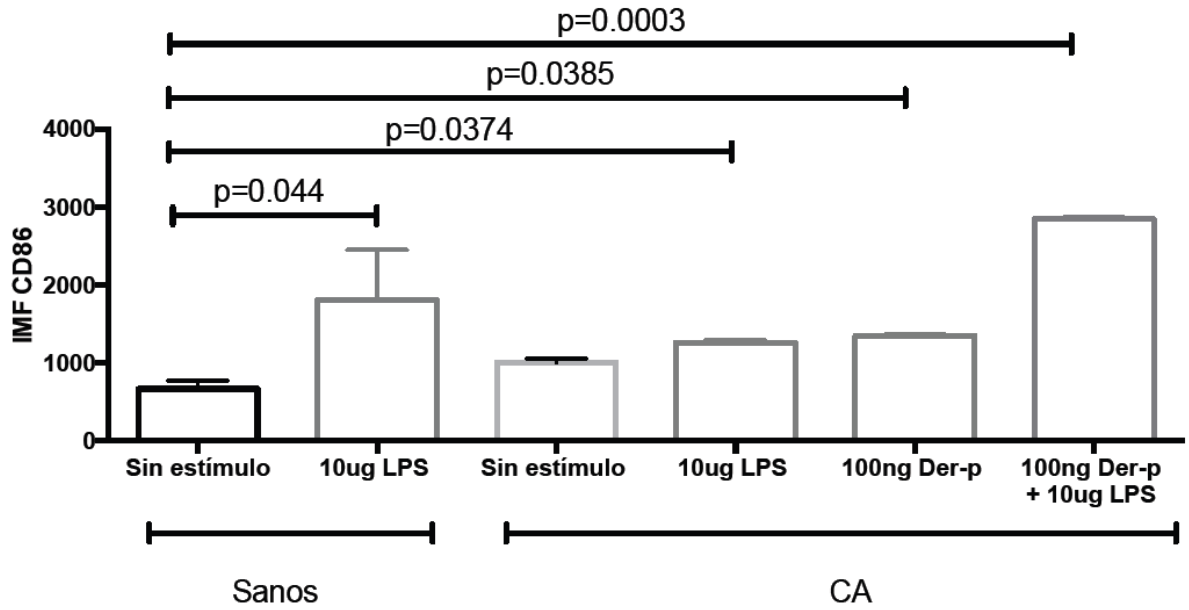


Figura 17. Expresión de CD86 en DCs de pacientes con CA activa. IMF para la expresión de CD86 en sujetos sanos y sujetos con conjuntivitis alérgica (CA). Se representa la media y desviación estándar de 3 sujetos sanos y dos sujetos con conjuntivitis alérgica.

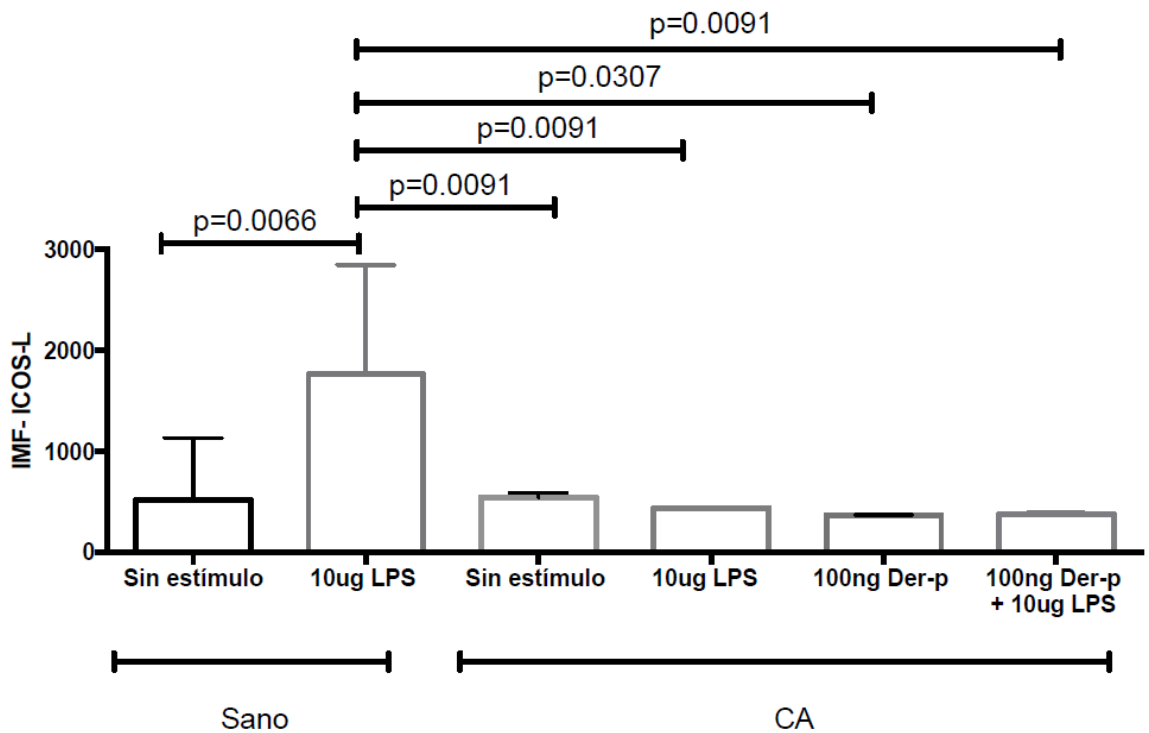


Figura 18. Expresión de ICOSL en DCs de pacientes con CA activa. IMF para la expresión de ICOSL en sujetos sanos y sujetos con conjuntivitis alérgica (CA). Se representa la media y desviación estándar de 3 sujetos sanos y dos sujetos con conjuntivitis alérgica.

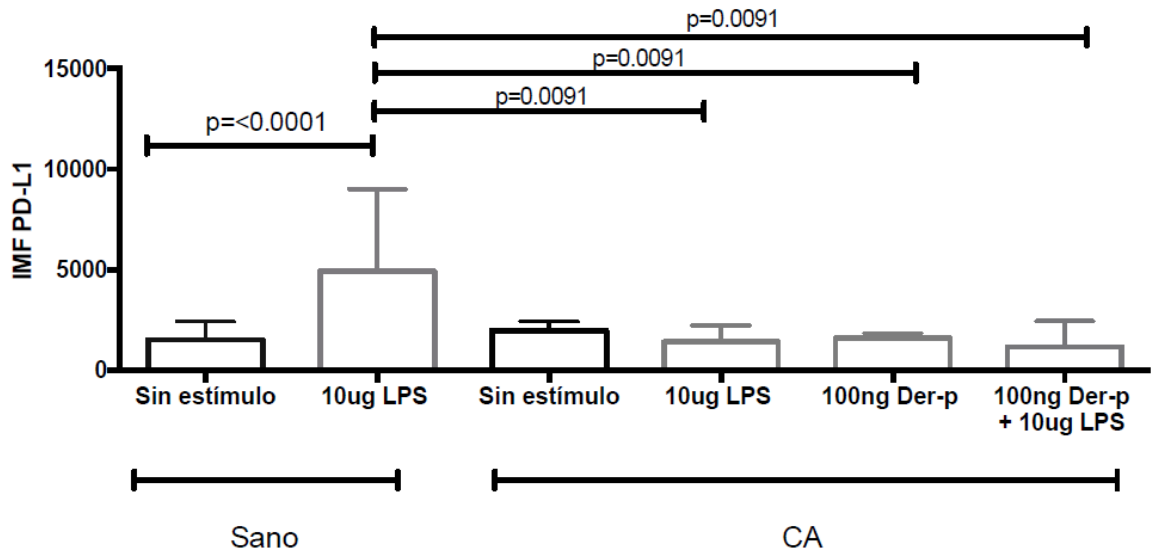


Figura 19. Expresión de PDL1 en DCs de pacientes con CA activa. IMF para la expresión de PDL1 en sujetos sanos y sujetos con conjuntivitis alérgica (CA). Se representa la media y desviación estándar de 3 sujetos sanos y dos sujetos con conjuntivitis alérgica.

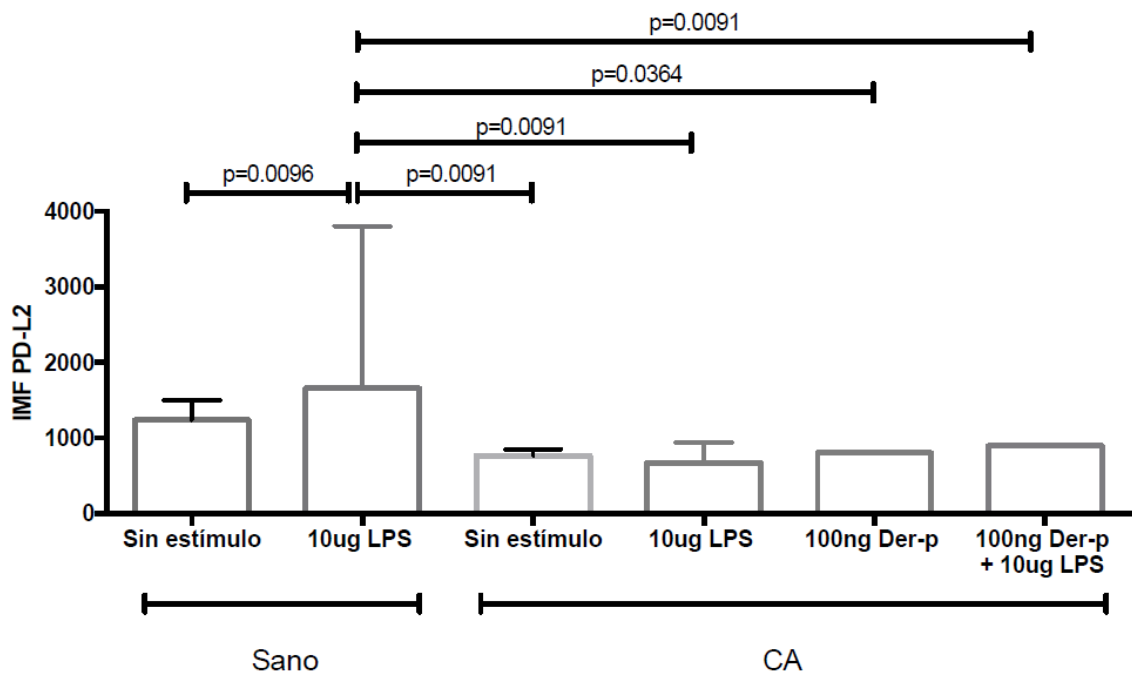


Figura 20. Expresión de PDL2 en DCs de pacientes con CA activa. IMF para la expresión de PDL2 en sujetos sanos y sujetos con conjuntivitis alérgica (CA). Se representa la media y desviación estándar de 3 sujetos sanos y dos sujetos con conjuntivitis alérgica.

IMF de IRF-4 a las 48 horas en MoDCs de sujetos sanos y sujetos con CA

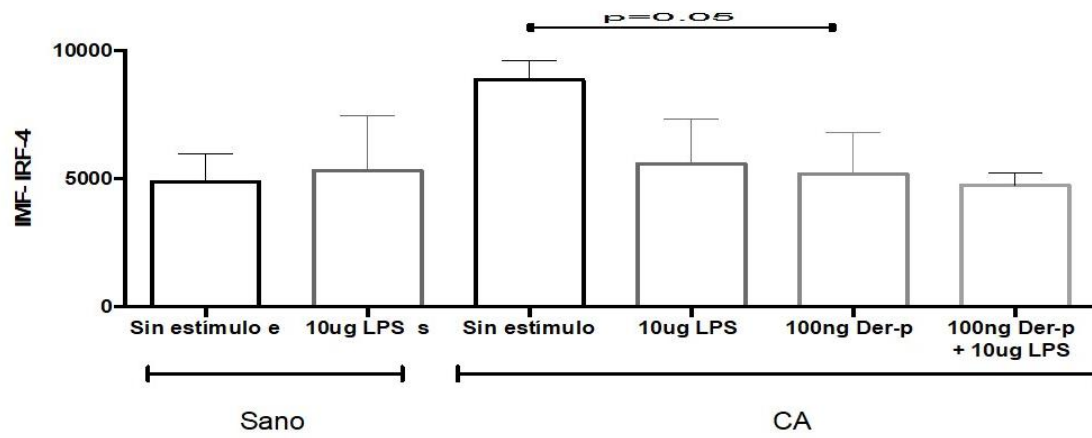


Figura 21. Expresión de IRF4 en DCs de pacientes con CA activa. IMF para la expresión de IRF4 en sujetos sanos y sujetos con conjuntivitis alérgica (CA). Se representa la media y desviación estándar de 3 sujetos sanos y dos sujetos con conjuntivitis alérgica.

13. Discusión

Las células dendríticas tienen una participación crucial en la regulación de los procesos inflamatorios. (Cantrell, et al 2015) Su gran capacidad como células presentadoras de antígeno profesionales y la expresión de las moléculas de coestimulación, así como de citocinas orquestan las funciones de las células T. (Dustin, et al 2014) En este sentido es importante profundizar el conocimiento que se tiene acerca de señales que de forma integral la DC está enviando a las células T.

Si bien; el modelo de las 3 señales durante la sinapsis inmunológica está bien descrito: 1) interacción MHC-péptido/TCR, 2) interacción de moléculas de coestimulación con sus receptores y 3) citocinas y sus receptores (Velazquez-Soto et al, 2022), no se tenía conocimiento sobre la manera en la que las células dendríticas integraban dinámicamente estas señales.

Como lo han descrito otros autores, no es importante únicamente la función si no la interacción espacio temporal de estas moléculas para generar una instrucción idónea hacia la respuesta inmune adaptativa de células T. (García, et al, 2020)

Estudios previos han explorado la participación de estas moléculas en distintos modelos experimentales, diversas enfermedades o diversas líneas celulares estimulando con distintos antígenos y en tiempos no definidos, lo cual no permite tener un conocimiento claro de la expresión de estas moléculas. (Velazquez-Soto et al, 2022) Lo anterior vuelve imperioso poder explorar la dinámica de expresión de estas moléculas en un contexto homogéneo y de condiciones controladas como concentración de antígeno y tiempo de estímulo.

Por lo anterior, el primer objetivo de esta investigación consistió en explorar la dinámica de expresión de las moléculas B7, sus formas solubles, el factor de transcripción IRF4 y las citocinas secretadas en un modelo *in vitro* ante condiciones de tiempo y concentraciones de estímulo en cultivos de células dendríticas derivadas de monocitos. Se seleccionó la molécula LPS como antígeno modelo por sus características inmunogénicas reportadas. Si bien LPS no compone parte activa del alérgeno se ha reportado que puede ser reconocido por TLR4 y activar su vía de señalización al igual que el alérgeno *Der p* (Dixon, et al, 2001; Park, et al, 2015) De

igual manera los tiempos de estimulación se seleccionan con base en lo reportado en la literatura. (Carenza et al 20019; Hoebe et al 2001; Skidmore, et al,1975)

Los hallazgos de estos ensayos nos han permitido observar que las moléculas evaluadas tienen una dinámica de expresión heterogénea. No existe un tiempo o concentración de estímulo que nos permita ver el pico máximo de expresión de todas las moléculas de coestimulación. Nuestros resultados demostraron que la expresión de las moléculas de coestimulación de la familia B7 es diferencial y dependen del tiempo de exposición y concentración del estímulo (LPS) coincidiendo con lo señalado Langenkamp. (Langenkamp, et al 2010)

Nuestro estudio demostró que a tiempos tempranos de estímulo antigénico y desde bajas concentraciones se incrementan las moléculas PDL1, y PDL2 probablemente favorecido por el factor de transcripción IRF4. Mientras que las moléculas CD86 e ICOSL incrementaron su expresión hasta tiempos tardíos de estimulación sin importar la concentración antigénica. Respecto a las formas solubles de las moléculas B7 encontramos un incremento para sPDL1 y sPDL2 dos veces sobre la concentración de CD86 (400ng: 200ng) sin importar la condición experimental evaluada.

Con relación a las citocinas, encontramos que las citocinas TNF- α , IL-6 IL-10 comienzan su producción desde las 12 h posteriores al estímulo mientras que IFN- γ e IL-2 tienen un pico máximo de producción hasta las 48h. Interesantemente, la producción de IFN- γ e IL-2 coinciden con los tiempos de expresión y además muestran una correlación positiva con las moléculas CD86 y PDL1, sugiriendo que las primeras pueden influenciar la expresión de las últimas.

Finalmente, integrando todos los hallazgos, nuestro trabajo propone que las células dendríticas se mantendrán en un estado de reposo, transmitiendo preferentemente señales tolerogénicas (PDL1, PDL2, sPDL1, sPDL2 e IL10) hasta que cierto umbral de tiempo o de concentración de antígeno promueva un cambio en la expresión de moléculas que promuevan la activación de células T y la inflamación (CD86, ICOSL, IFN- γ e IL-2). (Figura 16 y Figura 22)

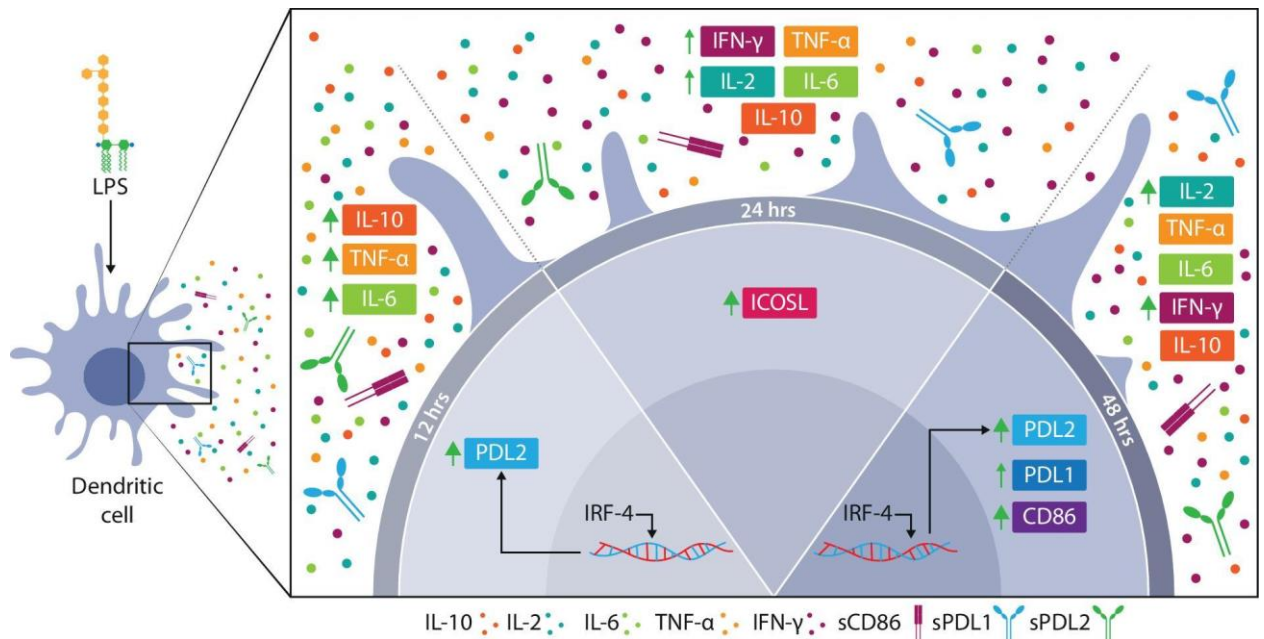


Figura 22. Dinámica de expresión de las moléculas de coestimulación membranales, solubles y citocinas secretadas por Mo-DCs.

Ante un estímulo por LPS, las células dendríticas (12 h) inicia la expresión de PDL2 favorecido por IRF4, citocinas como IL10, TNF- α e IL6 incrementan su concentración. Para las 24h, ICOSL incrementa su expresión y se pueden detectar citocinas como INF- γ e IL-2. Para las 48 h , se alcanza el pico máximo de expresión para CD86, PDL1 y PDL2 e IRF4; INF- γ e IL-2 alcanzan su concentración máxima. Las formas solubles de coestimulación sPDL1 y sPDL2 se producen en concentraciones constantes sin importar el tiempo y estímulo antigénico, siempre conservando una proporción 2:1 en comparación de CD86.

Este trabajo, además de aportar conocimiento relevante a la biología de las células dendríticas y su participación en la modulación de la respuesta inmune nos permitió identificar y seleccionar las condiciones ideales para la visualización de las distintas moléculas de coestimulación en pacientes con conjuntivitis alérgica.

Con relación a lo explorado en los sujetos con CA, si bien, limitados por el número de pacientes evaluados encontramos resultados preliminares interesantes que pueden ayudar a explicar mejor la fisiopatología y la participación de estas moléculas en un contexto de inflamación alérgica.

La evaluación de las moléculas de coestimulación B7 en sujetos con conjuntivitis alérgica demostró que ante estímulos alérgicos a los que el individuo ha sido sensibilizado previamente modifican la expresión de las moléculas de coestimulación.

Es importante mencionar que la población de estudio de nuestro proyecto fueron individuos alérgicos al acaro de polvo *Dermatophagoides pteronyssinus* y que uno de los alérgenos mayores, el *Der p* es reconocido por TLR-4 y es capaz de activar vías semejantes a las que se activan con el LPS de *E. coli*. (Park ,et al ,2015)

Nuestra evaluación demostró que la molécula coestimuladora CD86 muestra un incremento ante el estímulo alérgénico (*Der-p*+LPS) en individuos alérgicos semejante al incremento observado en Mo-DCs estimuladas con LPS de individuos sanos, estos hallazgos coinciden con lo reportado en pacientes con alergia alimentaria por Wang y colaboradores. (Wang, C. M., & Chuang, J. J. 2013)

Por otra parte, las moléculas ICOSL, PDL1 y PDL2 mantuvieron una expresión basal constante en todas las condiciones experimentales, en contraste con las Mo-DCs de sujetos sanos son capaces de incrementar su expresión ante estímulos con LPS. Interesantemente, aunque esto no se ha reportado en conjuntivitis alérgica un fenómeno semejante se ha reportado en pacientes con lupus eritematoso activo en donde se encuentra disminuida la expresión de PDL1 y PD1. (Javan, et al, 2016) (Figura 23)

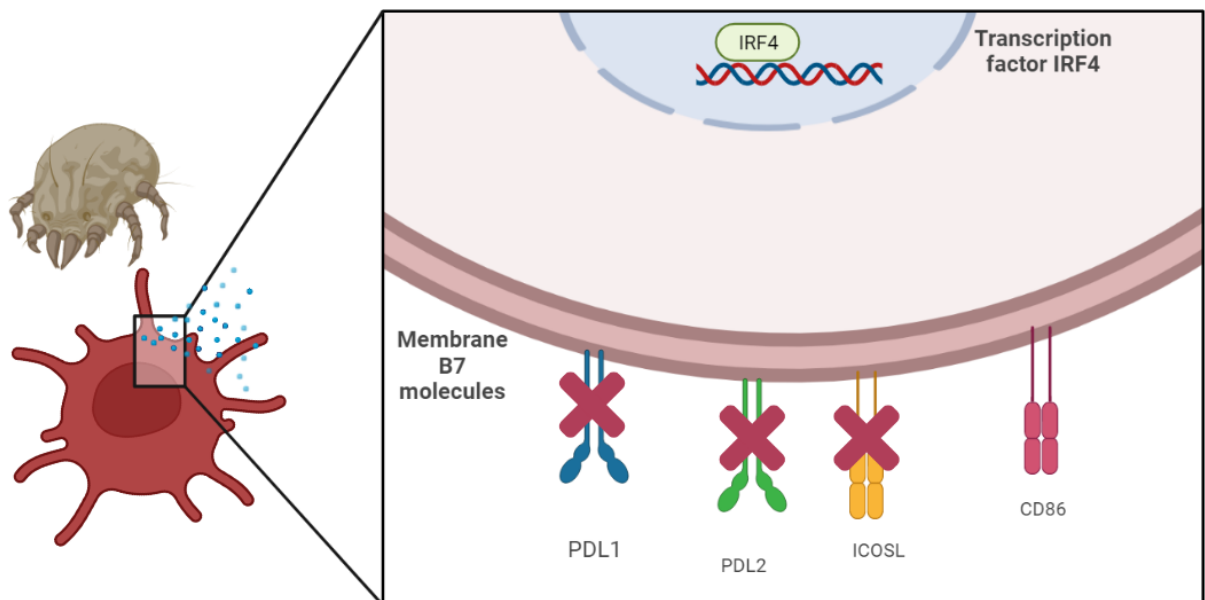


Figura 23. Expresión de moléculas de coestimulación B7 en Mo-DCs de sujetos con Conjuntivitis alérgica. Mo-DCs de pacientes con Conjuntivitis Alérgica muestran una expresión disminuida de las moléculas coinhibidoras PDL1, PDL2 e ICOSL. CD86 se incrementa al estas expuesto al alérgeno Der-p.

14. Conclusiones

El presente trabajo permitió demostrar que la expresión de la molécula de coestimulación CD86 en células dendríticas de pacientes con CA que no han recibido ITSL se incrementa ante estímulos alérgicos, mientras que el factor de transcripción IRF4 disminuye su expresión.

Las moléculas ICOSL, PDL1 y PDL2 no incrementan su expresión y mantienen los niveles basales ante los estímulos con *Der p*.

15. Perspectivas

Uno de los principales hallazgos de las evaluaciones in vitro de este trabajo experimental demostró la relación entre la expresión de PDL2 e IRF4 por lo que planteamos como una perspectiva realizar ensayos de inhibición para el factor de transcripción IRF4 que permitan demostrar de forma contundente esta relación con la expresión de PDL2.

En segundo lugar, es importante reconocer que una de las principales limitantes del trabajo fue el número de pacientes con conjuntivitis alérgica reclutados, por lo que es necesario continuar con el reclutamiento de pacientes y evaluar la expresión de las moléculas estudiadas a lo largo del tratamiento con ITSL.

16. Referencias

Abinav K. Singh, Philippe Stock & Omid Akbari (2011) Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma, *Allergy*. 2011 February; 66(2): 155–162. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02458. x.

Abu-El-Asrar, A. M., Al-Kharashi, S. A., Al-Mansouri, S., Missotten, L., & Geboes, K. (2001). Langerhans' cells in vernal keratoconjunctivitis express the costimulatory molecule B7-2 (CD86), but not B7-1 (CD80). *Eye (London, England)*, 15(Pt 5), 648–654. <https://doi.org/10.1038/eye.2001.202>

Azari A. A., & Barney N. P. (2013). Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA*, 310(16), 1721–1729. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280318>

Bellinghausen I., Klostermann B., Böttcher I., Knop J., & Saloga J. (2004). Importance of the inducible costimulator molecule for the induction of allergic immune responses and its decreased expression on T helper cells after venom immunotherapy. *Immunology*, 112(1), 80–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01845.x>

Bharadwaj AS, Agrawal KD, (2007) Transcription Factors in the Control of Dendritic Cell Life Cycle, *Immunologic Research*;37/1:79–96

Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, van Wijk RG, Ohta K, Zuberbier T, Schünemann HJ; Global Allergy and Asthma European Network; Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation Working Group. (2010) Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Sep;126(3):466-76. doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.047.

Cantrell D. (2015). Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(6), a018788. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018788>

Carenza, C.; Calcaterra, F.; Oriolo, F.; Di Vito, C.; Ubezio, M.; Della Porta, M.G.; Mavilio, D.; Della Bella, S. Costimulatory Molecules and Immune Checkpoints Are

Differentially Expressed on Different Subsets of Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1325.

Celebi Sözüner, Z., Mungan, D., Cevhertas, L., Ogulur, I., Akdis, M., & Akdis, C. (2020). Tolerance mechanisms in allergen immunotherapy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 20(6), 591–601.

Dixon G.L.; Newton P.J.; Chain B.M.; Katz, D.; Andersen S.R.; Wong S.; van der Ley,P.; Klein N & Callard R.E. Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: Interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infect. Immun.* **2001**, 69, 4351–4357.

Dustin M.L. The immunological synapse. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, 2, 1023–1033.

Fukushima, A., Yamaguchi, T., Azuma, M., Yagita, H., & Ueno, H. (2006). Involvement of programmed death-ligand 2 (PD-L2) in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *The British journal of ophthalmology*, 90(8), 1040–1045. <https://doi.org/10.1136/bjo.2006.091314>

Galli S J, Tsai M, Piliponsky Adrian M, (2008) The development of allergic inflammation, *NATURE* 454, 24.

Garcia E.; Ismail, S. Spatiotemporal Regulation of Signaling: Focus on T Cell Activation and the Immunological Synapse. *Int. J.Mol. Sci.* **2020**, 21, 3283.

Hammad H. and Lambrecht B.N. (2006). Dendritic Cells in Asthma. In *Handbook of Dendritic Cells* (eds M.B. Lutz, N. Romani and A. Steinkasserer). <https://doi.org/10.1002/9783527619696.ch50>

Hoebe K.; Janssen E.M.; Kim S.O.; Alexopoulou L.; Flavell R.A.; Han J & Beutler B. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* 2003, 4, 1223–1229.

Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K & Jonuleit, (2013) Costimulatory Molecules Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells, *Front.Immunol.* 4:82

Javan M. R., Aslani S., Zamani M. R., Rostamnejad J., Asadi M., Farhoodi, M., & Nicknam M. H. (2016). Downregulation of Immunosuppressive Molecules, PD-1 and PDL1 but not PD-L2, in the Patients with Multiple Sclerosis. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 15(4), 296–302.

Kadkhoda K., Wang S., Fan Y., Qiu H., Basu S., Halayko A. J., & Yang X. (2011). ICOS ligand expression is essential for allergic airway hyperresponsiveness. *International immunology*, 23(4), 239–249. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq476>

Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A., & Sallusto F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nature immunology*, 1(4), 311–316. <https://doi.org/10.1038/79758>

Larché M., Akdis C. A., & Valenta R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 6(10), 761–771. <https://doi.org/10.1038/nri1934>

Leonardi A, De Dominicis C & Motterle L. Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:429-35

Leonardi A., Curnow S.J., Zhan H. & Calder V.L. (2006), Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clinical & Experimental Allergy*, 36: 777-784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02499.x>

Leticia Tordesillas, Daniel Lozano-Ojalvo, David Dunkin, Lucie Mondoulet, Judith Agudo, Miriam Merad, Hugh A. Sampson & M. Cecilia Berin (2018) PDL2+ CD11b+ dermal dendritic cells capture topical antigen through hair follicles to prime LAP+ Tregs, *Nature Communications* (2019:5238 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07716-7>

Li H., Wang W., Wang G., Hou Y., Xu F., Liu R., Wang F., Xue J., Hu T., & Luan X. (2015). Interferon- γ and tumor necrosis factor- α promote the ability of human placenta-derived mesenchymal stromal cells to express programmed death ligand-2 and induce the differentiation of CD4(+)interleukin-10(+) and CD8(+)interleukin-

10(+)Treg subsets. *Cytotherapy*, 17(11), 1560–1571.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.018>

Liang X. D., Shi H. Z., Qin X. J., & Deng J. M. (2006). Increase in concentration of soluble CD86 after segmental allergen challenge in patients with allergic asthma. *Chest*, 130(4), 1048–1054. <https://doi.org/10.1378/chest.130.4.1048>

Lieping Chen & Dallas B. Flies, Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition, *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(4): 227–242. doi:10.1038/nri3405.

Lombardi V, Singh A & Akbari O, (2010) The Role of Costimulatory Molecules in Allergic Disease and Asthma, *Int Arch Allergy Immunol*;151:179–189

Manzouri B., Ohbayashi M., Leonardi A., Fattah D., Larkin D. F., & Ono S. J. (2010). Characterisation of the phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in allergic conjunctiva. *The British journal of ophthalmology*, 94(12), 1662–1667. <https://doi.org/10.1136/bjo.2009.177774>

Matsuoka T., Shamji M. H., & Durham S. R. (2013). Allergen immunotherapy and tolerance. *Allergology international*, 62(4), 403–413. <https://doi.org/10.2332/allergolint.13-RAI-0650>

Martin V., Chiriaco C., Modica C. et al. Met inhibition revokes IFN γ -induction of PD-1 ligands in MET-amplified tumours. *Br J Cancer* 120, 527–536 (2019) doi:10.1038/s41416-018-0315-3

Nasiri Kalmarzi, R., Fattahi N., Kaviani, Z., Atae, P., Mansouri M., Moradi, G., Yousefzade, A., & Abbassi, J. M. (2017). Inverse correlation of soluble programmed cell death-1 ligand-1 (sPD-L1) with eosinophil count and clinical severity in allergic rhinitis patients. *Allergology international* :, 66(2), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.08.008>

Beom Seok Park, Na Rae Lee, Mun Jeong Kim, Seong Yeol Kim, & In Sik Kim. (2017) Interaction of Der p 2 with Toll-like Receptor 4 and its Effect on Cytokine Secretion. *Biomedical Science Letters* 2015;21:152-159. doi.org/10.15616/BSL.2015.21.3.152

Salazar A., Casanova-Méndez I., Pacheco-Quito M., Velázquez-Soto H., Ayala-Balboa J., Graue-Hernández E. O., Serafín-López J., & Jiménez-Martínez, M. C.

(2019). Low Expression of IL-10 in Circulating Bregs and Inverted IL-10/TNF- α Ratio in Tears of Patients with Perennial Allergic Conjunctivitis: A Preliminary Study. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1035. <https://doi.org/10.3390/ijms20051035>

Sánchez-Hernández MC, Montero J, Rondon C, Del-Castillo BJ, Velázquez E, Herreras JM, et al. Consensus document on allergic conjunctivitis (DECA). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(2):94-106. Disponible en: <http://www.jiaci.org/issues/vol25issue2/2.pdf>

Schlitzer A, McGovern N, Teo P, (2013) IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses, *Immunity* 38, 970–983,

Seung-Oe Lim, Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5, *Cancer Cell*. 2016 Dec 12; 30(6): 925–939.

Shi H. Z., Xie Z. F., Deng J. M., Chen Y. Q., & Xiao C. Q. (2004). Soluble CD86 protein in serum samples of patients with asthma. *Thorax*, 59(10), 870–875. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.021840>

Skidmore B.J.; Chiller J.M.; Morrison D.C.; Weigle, W.O. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): Correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. *J. Immunol*. 1975, 114, 770–775.

Vander B L, Riddell J, Khan A, (2017) Transcriptional determinants of tolerogenic and immunogenic states during dendritic cell maturation, *J. Cell Biol*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512012>

Velazquez-Soto H.; Real F & Jiménez-Martínez M.C. Historical evolution, overview, and therapeutic manipulation of costimulatory molecules. *World J. Immunol*. **2022**, 12, 1–8.

Wang C. M., & Chuang J. J. (2013). Effect of mite allergen immunotherapy on the altered phenotype of dendritic cells in allergic asthmatic children. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 110(2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.11.019>

Walsh K. P., & Mills K. H. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in immunology*, 34(11), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.006>

Williams J W, Tjota M Y, Clay B S, (2013) Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation *Nat Commun.*; 4: 2990

Yashwant Kumar and Alka Bhatia (2013) Immunopathogenesis of allergic disorders: current concepts, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9(3), 211–226 (2013)

Yin X.; Chen S & Eisenbarth S.C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2021, 39, 759–790

17. ANEXOS

17.1. Metodología evaluación clínica

17.1.1. Prueba de Schirmer

Se colocó una tira de papel con escala milimétrica en el párpado inferior de cada ojo. Ambas tiras se colocaron simultáneamente y serán retiradas a los 5 minutos de ser aplicadas. Posteriormente se medirá la cantidad de humedad del papel y se reportó el resultado en milímetros.

17.1.2. Tiempo de ruptura de la película lagrimal

Instilar una gota de tetracaína en el fondo de saco conjuntival inferior de cada ojo, se le solicitó al paciente que cierre el párpado varias veces para repartir el colorante por toda la película lagrimal. Posteriormente el médico oftalmólogo observó por medio de la lámpara de hendidura con filtro azul cobalto la superficie ocular. Se le indicó al paciente que parpadee completo y que mantenga el ojo abierto, y en este momento se empieza a tomar el tiempo hasta que aparezca la primera mancha oscura, que indica el rompimiento de la película lagrimal.

17.1.3. Escala de severidad utilizada en la valoración clínica

Escala de severidad por síntomas

Síntomas evaluados: prurito, lagrimeo, fotofobia, sensación de cuerpo extraño y ardor.

Clasificando como 0=No sucede, 1=Algunas veces, 2=La mitad de las veces, 3=La mayor parte de las veces, 4=Todo el tiempo.⁴

Escala de severidad por signos

Posición y aspecto de la piel del párpado:

0= Sin edema palpebral.

1= Edema localizado en el párpado superior o inferior, sin presencia de líneas de Dennie Morgan

2= Edema palpebral superior e inferior generalizado con ligero pseudoapoptosis y con presencia de líneas de Dennie Morgan

3= Moderada pseudoapoptosis unilateral o bilateral con presencia de líneas de Dennie Morgan

4= Severa pseudoapoptosis unilateral o bilateral con presencia de líneas de Dennie Morgan, con cambios en la textura y pigmentación de la piel con signo de Hertoghe presente.

Margen palpebral:

0= Sin desplazamiento

1=Desplazamiento de 1/3 de la unión mucocutánea

2=Desplazamiento de 2/3 de la unión mucocutánea

3=Desplazamiento generalizado de la unión mucocutánea

4=Cicatrización o cambios de queratinización

Hiperemia y edema conjuntival:

0=Sin hiperemia o edema conjuntival

1= Hiperemia conjuntival +/++, con 1/3 de apariencia de edema en conjuntiva.

2= Hiperemia conjuntival ++/+++, con 2/3 de apariencia de edema en conjuntiva, con una leve formación de plica conjuntival en el fondo de saco.

3= Hiperemia conjuntival mayor a +++, con más de 2/3 de apariencia de edema en conjuntiva, con engrosamiento de los vasos conjuntivales y severa formación de plica conjuntival en el fondo de saco.

Descarga conjuntival

0= Sin descarga

1= Descarga acuosa o con pocos debris

2=Descarga blanca-grisácea en el fondo de saco o localizado adyacente a 1/3 del limbo o conjuntiva tarsal.

3=Descarga grisácea-amarillenta con abundantes filamentos mucosos en el fondo de saco o localizado adyacente a 2/3 del limbo o la conjuntiva tarsal.

4=Secreción abundante de filamentos mucosos adheridos principalmente a la superficie corneal.

Respuesta de la conjuntiva Tarsal

0=Sin hiperplasia o folículos

17.1.4. Tratamiento

Medidas no farmacológicas:

Uso de Lubricante ocular Hyabak (Hialuronato sódico) gotas oftálmicas al 0.15%, aplicar 1 gota en ojo afectado cada 4 horas.

Usar compresas frías en ojo afectado en caso de presentar síntomas leves de alergia.

Medidas farmacológicas: Inmunoterapia desensibilizante sublingual (SLIT)

-Descripción del medicamento y posología:

La presentación de la SLIT consta de una bolsa de aluminio con una etiqueta blanca que contiene el nombre del paciente, número de gotero y fecha de caducidad; dentro contiene un gotero de plástico con etiqueta blanca que contiene el nombre del paciente, número de gotero y fecha de caducidad.

Se administró todos los días por vía sublingual en los sujetos con conjuntivitis alérgica siguiendo un esquema terciado hasta alcanzar la dosis máxima de 5 gotas por día, conforme a la siguiente tabla.

1er día	1 gota
2do día	
3er día	2 gotas
4to día	

5to día	3 gotas
6to día	
8vo día	4 gotas
9no día	
10mo día	5 gotas
Hasta terminar	

-Almacenamiento:

Se deberá almacenar en la puerta del refrigerador o en la caja de verduras.

-Contraindicaciones de uso:

Haya pasado más de 12 horas sin refrigeración.

El paciente presente temperatura de 38°C.

Medidas farmacológicas: Olopatadina (Tratamiento convencional)

-Descripción del medicamento y posología:

La presentación de la olopatadina consta de un gotero de plástico con etiqueta blanca, que contiene el nombre comercial del medicamento, el nombre del principio activo, fecha de caducidad, e indicaciones generales.

Gotas oftálmicas al 0.2%, se aplicó 1 gota en ojo afectado cada 24hrs.

Medidas farmacológicas: Loratadina (Tratamiento de rescate)

Usar en caso de presentar lagrimeo, estornudos en salva, prurito ocular nasal u orofaríngeo, o escurrimiento nasal importante, se deberá administrar bajo el siguiente esquema:

Niños de 6-12 años: loratadina jarabe 10mg/10ml, tomar 5ml en caso de presentar los síntomas previamente mencionados, en caso de que los síntomas persistan continuar cada 12 horas de 1 a 5días.

Niños de 13 años a 17 años: loratadina 10mg 1 tableta vía oral en caso de presentar los síntomas previamente mencionados, en caso de que los síntomas persistan continuar cada 24 horas de 1 a 5días.

17.2. Consentimiento y asentimiento informados

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA CONDE DE VALENCIANA I.A.P
UNIDAD DE INVESTIGACION
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Sujetos con Conjuntivitis Alérgica

Nombre del estudio:

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4 en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con Inmunoterapia Sublingual Antígeno Desensibilizante.

Identificación del participante

Nombre del participante: _____

Número de expediente del participante: _____

Edad del participante _____ años. Fecha de inclusión: _____

Identificación del Investigador.

Nombre del Investigador principal: Henry Velázquez Soto

Sitio de Investigación: Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP.

Domicilio: Chimalpopoca No. 14, Col. Obrera, Del. Cuauhtémoc, C. P. 06800, México D. F. Tel. 5442-1700 Ext. 3725.

Este documento fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Acorde a los lineamientos emitidos en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Este documento tiene la finalidad de explicar en qué consiste y documentar que se encuentra de acuerdo en permitir que su hijo/a participe en un estudio de investigación. Antes de que tome la decisión, debe entender por qué se está realizando este estudio, qué va a involucrar y cuáles son los posibles riesgos y beneficios. La información que se le proporcionará a continuación, le ayudará a tomar una decisión informada. Por favor, tome tu tiempo para leerla cuidadosamente y haga todas las preguntas que tenga. Este documento también le informará sobre cómo se utilizará el expediente médico de su hijo/a y quién podrá tener acceso a él. Una vez que haya leído el documento y no tenga dudas, en caso de decidir que su hijo/a participe en este estudio, se le pedirá que lo firme. De igual forma, se le entregará un original de este documento.

COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN
Número de Registro
CONBIOÉTICA-09-CEI-023-20168830

¿Qué es la conjuntivitis alérgica?

La conjuntivitis alérgica o alergia ocular, es una enfermedad que se produce cuando algo a lo que se es alérgico (el polvo, polen, pelo de animales, etc.) entra en contacto con la conjuntiva, la cual es una delicada membrana que cubre la parte blanca del ojo y la parte interior del párpado (ver Fig. 1)

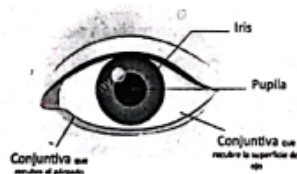


Fig. 1. Componentes del ojo.

Los pacientes con conjuntivitis alérgica presentan ardor, comezón, sensación de cuerpo extraño y ojo rojo. Actualmente existe un tratamiento llamado: Inmunoterapia sublingual desensibilizante, consiste en administrar gotas debajo de la lengua, que contienen cantidades pequeñas de las sustancias a las que se es alérgico, por un periodo de tiempo determinado, para promover que el cuerpo se acostumbre a la sustancia a la que se es alérgico. Nuestro cuerpo está formado por células, en específico existen unas células que forman parte del ojo y también se encuentran en la sangre, llamadas "células dendríticas" y su trabajo es identificar las cosas a las que se es alérgico como el polvo, polen, pelo de animales, etc.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Queremos comparar saber cómo se comportan estas células dendríticas en los niños que tienen alergia ocular antes y durante el tratamiento de la inmunoterapia sublingual desensibilizante

¿En qué consiste el estudio?

A su hijo se le tomará una muestra de sangre del brazo, donde sentirá un suave pellizco por poco tiempo, pero es importante que el brazo de su hijo/a permanezca quieto. Puede suceder que su hijo se sienta sensación de mareo y tenga un moretón en el sitio de toma de muestra de sangre. Después pondremos una gota de agua en cada ojo de su hijo/a, y con ayuda de un tubo delgado, tomaremos un poco de su lagrime, su hijo/a podrá sentir una ligera molestia y/o irritación en el ojo.

Estos dos procesos ocurrirán tres veces:

- A) La primera vez será antes de iniciar con el primer frasco de inmunoterapia sublingual antigénico desensibilizante.
- B) La segunda vez será al terminar el tercer frasco de inmunoterapia sublingual antigénico desensibilizante.
- C) Y la tercera vez será al terminar el sexto frasco de inmunoterapia sublingual antigénico desensibilizante.

Adicionalmente, una vez al mes por seis meses su hijo/a tendrá programada una cita en la Clínica de Alergias del Instituto Conde de Valenciana para revisión, estas consultas médicas no tendrán costo.

¿Quiénes son los pacientes que pueden participar en este estudio?

- Pacientes con conjuntivitis alérgica activa.
 - En el rango de edad de 7 a 17 años.
 - Pacientes que estén por iniciar la inmunoterapia sublingual desensibilizante
 - Que no tengan alguna enfermedad que afecte algún órgano del cuerpo, que no estén embarazadas o lactando, y que no estén tomando algún medicamento que afecte al sistema inmunológico
- En caso de haber cumplido con estos criterios podrá ser incluido en el estudio.

¿Cuáles son los posibles beneficios de que su hijo/a participe en este estudio?

1. Ayudarnos a conocer más sobre la conjuntivitis alérgica y poder crear nuevos y mejores tratamientos.
2. Las consultas médicas en la Clínica de Alergias del Instituto Conde de Valenciana, durante el estudio de investigación, no tendrán ningún costo para los padres o responsables durante el periodo de estudio.

En caso de que durante su valoración se determine que es necesario hacer estudios complementarios que no están descritos en este consentimiento informado, los padres o responsables deberán cubrir su costo ya que no tienen relación con este protocolo y son parte de su seguimiento. También el costo de la vacuna sublingual tendrá que ser cubierto por los padres y/o responsables.

**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**
Número de Registro
CONBIOÉTICA-19-CEI-023-20160830

¿Tiene su hijo/a que participar en este estudio? ¿Cuáles son las alternativas?

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Si aceptaron, pero después no desean que su hijo continúe participando en el mismo, podrán retirarse del estudio en cualquier momento y no tendrá ninguna repercusión en su atención brindada en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. No recibirán ningún pago por participar en el estudio.

Se les pedirá que abandonen el proceso del estudio en caso de su hija se embarace, o que su hijo/a no siga el tratamiento como se solicita, o que no acudan a las citas o que la muestra de sangre y/o lagrime no sea suficiente para realizar los experimentos.

Al ya no formar parte de este estudio, las consultas médicas tendrán el costo habitual.

¿Cómo será guardada la información? ¿Tendrá acceso a ella?

Solo personal autorizado tiene acceso a su información. La información que se obtenga será estrictamente confidencial y anónima y será utilizada exclusivamente para fines de investigación. De obtener algún resultado favorable para la investigación, éste será publicado en foros médicos, resguardando la confidencialidad de todos sus datos. Todos los resultados se le darán a conocer si usted lo solicita.

¿Qué sucede si surge alguna duda?

En caso de cualquier duda favor de comunicarse con el Maestro Henry Velázquez Soto, Investigador Principal, al teléfono: 5442-1700 Ext. 3210, de lunes a viernes de 08:00 a 14:00hrs

También con la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, Jefa del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono 5442-1700 Ext. 3207. O puede consultar con el Dr. Yonathan Garfias Becerra, Presidente del Comité de Ética del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono: 5442-1700 Ext. 3212. O con la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, Jefa del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono 5442-1700 Ext. 3207.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del Investigador: _____

Firma del Investigador: _____

**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**

Número de Registro

CONBIOÉTICA-09-CEI-023-20160830

AL FIRMAR A CONTINUACIÓN USTED DECLARA QUE:

1. He leído cuidadosamente (o me ha leído mi representante legal) y he entendido el consentimiento informado.
2. Se me ha brindado información clara y tiempo suficiente para leer el consentimiento informado y he aclarado todas mis dudas.
3. Mi participación es voluntaria y entiendo que mi hijo/a es libre de retirarme del estudio en cualquier momento que lo decida.
4. No he sido sometido a ningún tipo de presión para que mi hijo/a participe en el estudio.
5. Libremente otorgo mi consentimiento para que mi hijo/a participe en este estudio.
6. Es de mi conocimiento que mi hijo/a acudirá a valoraciones médicas en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.
7. Entiendo que la atención médica y los estudios clínicos que forman parte del protocolo especificados en esta forma de consentimiento informado durante el estudio serán de manera gratuita.
8. Confirmando que he recibido un original de este documento firmado y fechado, y el otro original es resguardado por el Investigador.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

Dirección: _____

¿Tiene su hijo/a que participar en este estudio? ¿Cuáles son las alternativas?

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Si aceptaron, pero después no desean que su hijo continúe participando en el mismo, podrán retirarse del estudio en cualquier momento y no tendrá ninguna repercusión en su atención brindada en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. No recibirán ningún pago por participar en el estudio.

Se les pedirá que abandonen el proceso del estudio en caso de su hija se embarace, o que su hijo/a no siga el tratamiento como se solicita, o que no acudan a las citas o que la muestra de sangre y/o lagrime no sea suficiente para realizar los experimentos.

Al ya no formar parte de este estudio, las consultas médicas tendrán el costo habitual.

¿Cómo será guardada la información? ¿Tendrá acceso a ella?

Solo personal autorizado tiene acceso a su información. La información que se obtenga será estrictamente confidencial y anónima y será utilizada exclusivamente para fines de investigación. De obtener algún resultado favorable para la investigación, éste será publicado en foros médicos, resguardando la confidencialidad de todos sus datos. Todos los resultados se le darán a conocer si usted lo solicita.

¿Qué sucede si surge alguna duda?

En caso de cualquier duda favor de comunicarse con el Maestro Henry Velázquez Soto, Investigador Principal, al teléfono: 5442-1700 Ext. 3210, de lunes a viernes de 08:00 a 14:00hrs

También con la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, Jefa del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono 5442-1700 Ext. 3207. O puede consultar con el Dr. Yonathan Garfias Becerra, Presidente del Comité de Ética del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono: 5442-1700 Ext. 3212. O con la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, Jefa del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono 5442-1700 Ext. 3207.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del Investigador: _____

Firma del Investigador: _____

**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**

Número de Registro

CONBIOÉTICA-09-CEI-023-20160830

AL FIRMAR A CONTINUACIÓN USTED DECLARA QUE:

1. He leído cuidadosamente (o me ha leído mi representante legal) y he entendido el consentimiento informado.
2. Se me ha brindado información clara y tiempo suficiente para leer el consentimiento informado y he aclarado todas mis dudas.
3. Mi participación es voluntaria y entiendo que mi hijo/a es libre de retirarme del estudio en cualquier momento que lo decida.
4. No he sido sometido a ningún tipo de presión para que mi hijo/a participe en el estudio.
5. Libremente otorgo mi consentimiento para que mi hijo/a participe en este estudio.
6. Es de mi conocimiento que mi hijo/a acudirá a valoraciones médicas en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.
7. Entiendo que la atención médica y los estudios clínicos que forman parte del protocolo especificados en esta forma de consentimiento informado durante el estudio serán de manera gratuita.
8. Confirmando que he recibido un original de este documento firmado y fechado, y el otro original es resguardado por el Investigador.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

Dirección: _____

Representante legal o tutor del paciente:

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del Padre o Tutor: _____

Firma: _____

Relación con el participante: _____

Dirección: _____

Huella digital del dedo índice derecho (en caso de no saber leer y escribir u otra situación que lo amerita).

Nombre del Madre: _____

Firma: _____

Relación con el participante: _____

Dirección: _____

Huella digital del dedo índice derecho (en caso de no saber leer y escribir u otra situación que lo amerita).

*La madre, padre o tutor del participante, deberá presentar copia de identificación oficial.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Testigo 1:

Nombre _____

Firma: _____

Relación con el participante: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

*Testigo 1, deberá presentar copia de identificación oficial.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Testigo 2:

Nombre _____

Firma: _____

Relación con el participante: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

*Testigo 2, deberá presentar copia de identificación oficial.

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA CONDE DE VALENCIANA I.A.P
UNIDAD DE INVESTIGACION. DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA

ASENTIMIENTO INFORMADO
Sujetos con Conjuntivitis alérgica

Nombre del estudio:

Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4 en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual Antígeno Desensibilizante.

Identificación del paciente

Nombre del participante: _____

Número de expediente del participante: _____

Edad del participante: _____ años. Fecha de inclusión: _____

Identificación del Investigador.

Nombre del investigador principal: Henry Velázquez Soto

Sitio de Investigación: Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP.

Domicilio: Chimalpopoca No. 14, Col. Obrera, Del. Cuauhtémoc, C. P. 06800, México D. F. Tel. 5442-1700 Ext. 3725.

Este documento fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Acorde a los lineamientos emitidos en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Este documento tiene la finalidad de explicar y documentar que estás de acuerdo en participar en un estudio de investigación. Antes de que decidas participar, debes entender por qué se está realizando este estudio, qué va a involucrar y cuáles son los posibles riesgos y beneficios. La información que se proporciona a continuación, te ayudará a tomar una decisión informada. Por favor, toma tu tiempo para leerla cuidadosamente y haz todas las preguntas que tengas. Este documento también te informará sobre cómo se utilizará tu expediente médico y quién podrá tener acceso a él. Una vez que hayas leído el documento y no tengas dudas, se te pedirá que lo firmes si decides participar en el estudio. De igual forma, se te entregará un original de este documento.

¿Qué es la alergia en los ojos?

La alergia ocular o conjuntivitis alérgica, es una enfermedad que ocurre cuando tu ojo entra en contacto con cosas como el polvo, el polen o pelo de los animales, lo que te causa comezón, sensación de una basurita en el ojo, que te lastime la luz, que tengas lagañas, veas borroso, tengas los ojos llorosos y rojos.



**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**

Número de Registro

Actualmente existe un tratamiento llamado: inmunoterapia sublingual desensibilizante, son unas gotas que se ponen debajo de la lengua, que contienen una pequeña cantidad de lo que eres alérgico. Para que, con el tiempo, tu cuerpo se acostumbre y ya no tengas tantas molestias como ahora.

¿Qué son las células dendríticas?

Una célula es la parte más pequeña de los seres vivos, son como los ladrillos que construyen un edificio, todo nuestro cuerpo está formado por células. Existen unas células que se encuentran en la sangre y en los ojos llamadas "células dendríticas" y su trabajo es atrapar las cosas a las que eres alérgico (polvo, polen, pelo de animales y otros) y enseñárselas al sistema inmune.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Queremos saber cómo se comportan estas células dendríticas en la alergia ocular cuando los pacientes están tomando el tratamiento de la inmunoterapia sublingual desensibilizante.

¿En qué consiste el estudio?

Se te tomarán muestras de sangre del brazo, cuando esto ocurra, sentirás un suave pellizco por poco tiempo, pero es importante que tu brazo permanezca quieto. Te puede salir un pequeño moretón y te puedes sentir mareado, pero después se te quitará.

Después te pondremos una gota de agua en tu ojo, y por medio de un tubo tomaremos un poco de tu lagrimea. Puedes sentir una ligera molestia o comezón en el ojo.

Estos dos procesos ocurrirán tres veces:

- A) La primera vez será antes de iniciar con el primer frasco inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante.
- B) La segunda vez será al terminar el tercer frasco inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante.
- C) Y la tercera vez será al terminar el sexto frasco de inmunoterapia sublingual antígeno desensibilizante.

Adicionalmente, una vez al mes por seis meses tendrán una cita en la Clínica de alergias el Instituto Conde de Valenciana para revisarte, estas consultas médicas no tendrán costo.

¿Quiénes pueden participar en este estudio?

Sí tienes entre 7 a 17 años y tienes conjuntivitis alérgica.

Sí el médico considera que vas a iniciar el tratamiento con inmunoterapia sublingual desensibilizante

¿Cuáles son los posibles beneficios de que participes en este estudio?

- 1. Ayudarnos a conocer más sobre tu enfermedad y poder crear nuevos y mejores tratamientos.
- 2. Las consultas médicas realizadas no tendrán ningún costo para tus padres o responsables.

En caso de que, durante la consulta médica, se determine que es necesario hacer estudios complementarios que no están descritos en este documento, tus padres o responsables deberán cubrir su costo ya que no tienen relación con este protocolo y son parte de tu seguimiento médico. También el costo de la vacuna sublingual tendrá que ser cubierto por tus padres y o responsables.

¿Tienes que participar en este estudio? ¿Cuáles son las alternativas?

Eres libre de decidir si quieres participar o no participar en este estudio. En caso aceptes y después ya no quieras seguir participando en el estudio, podrás decirlo en el momento que lo desees y esto no tendrá ningún problema para continuar con tus citas en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**

Número de Registro

ONBIOÉTICA-09-CEI-023-20160830

Existen varios motivos por los cuales nosotros te pediremos que ya no continúes en este estudio:

- No sigas el tratamiento como se solicita
- No acudas a las citas
- No tengamos muestra de sangre suficiente.

Y si eres mujer y te embarazas, también te pediremos que ya no continúes en el estudio.

¿Cómo será guardada tu Información? ¿Tendrás acceso a ella?

No le diremos a otras personas que estas en este estudio, y no compartiremos información sobre ti a nadie que no trabaje en el estudio de Investigación.

¿Qué sucede si tienes alguna duda?

Puedes hacerme preguntas ahora o más tarde.

En caso de cualquier duda favor de comunicate con el Maestro Henry Velázquez Soto, Investigador Principal, al teléfono: 5442-1700 Ext. 3210, de lunes a viernes de 08:00 a 14:00hrs

También con la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, Jefa del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono 5442-1700 Ext. 3207. O puede consultar con el Dr. Yonathan Garfias Becerra, Presidente del Comité de Ética del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono: 5442-1700 Ext. 3212. O con la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, Jefa del Departamento de Inmunología de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" al teléfono 5442-1700 Ext. 3207.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del Investigador: _____.

Firma del investigador: _____.

AL FIRMAR A CONTINUACIÓN USTED DECLARA QUE:

1. He leído cuidadosamente (o me han leído mí padres o tutor) y he entendido el asentimiento informado.
2. La información es clara y he tenido tiempo suficiente para leer el asentimiento informado y ya no tengo dudas.
3. Mi participación es libre y puedo salir del estudio en cualquier momento que yo quiera.
4. No me han presionado para participar en el estudio.
5. Libremente otorgo mí asentimiento para participar en este estudio.
6. Acudiré a valoraciones médicas en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.
7. Entiendo que las consultas especificadas en este asentimiento informado durante el estudio serán de manera gratuita.
8. Confirmando que he recibido un original de este documento firmado con fecha, y el otro original será guardado por el Investigador.

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del participante: _____.

Firma del participante: _____.

Dirección: _____.

**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**

Número de Registro

ONBIOÉTICA-09-CE-123-20160830

Representante legal o tutor del paciente:

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del Padre o Tutor: _____.

Firma: _____.

Relación con el participante: _____.

Dirección: _____.

Huella digital del dedo índice derecho (en caso de no saber leer y escribir u otra situación que lo amerita).



México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre del Madre: _____.

Firma: _____.

Relación con el participante: _____.

Dirección: _____.

Huella digital del dedo índice derecho (en caso de no saber leer y escribir u otra situación que lo amerita).



*La madre, padre o tutor del participante, deberá presentar copia de identificación oficial.

Testigo 1:

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre: _____.

Firma: _____.

Relación con el participante: _____.

Dirección: _____.

Teléfono: _____.

*Testigo 1, deberá presentar copia de identificación oficial.

Testigo 2:

México, D.F. a ____ de _____ del 20 ____.

Nombre: _____.

Firma: _____.

Relación con el participante: _____.

Dirección: _____.

Teléfono: _____.

*Testigo 2, deberá presentar copia de identificación oficial.

**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**

Número de Registro

ONBIOÉTICA-09-CEI-023-20160830

17.3. Cartas de aprobación del protocolo de investigación por los comités de Investigación, Bioseguridad y Ética en investigación.



Instituto de Oftalmología
"Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP" ®

Ciudad de México, a 6 de febrero del 2018

Dra. María C. Jiménez Martínez
Alumno M. en C. Henry Velázquez Soto
Alumna María Fernanda Real San Miguel

Departamento: Inmunología

Presente:

Con respecto al protocolo "Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4 en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia Sublingual Antígeno Desensibilizante" (CI-050-2018), me permito informarle que el Comité de Investigación APROBÓ su realización en la versión actual.

A fin de cumplir la normatividad de la institución, es necesario que obtenga las cartas de aprobación de los Comités de Ética en Investigación y Bioseguridad. Agradeciendo su valiosa labor en las actividades de investigación de nuestra institución, me reitero a sus órdenes para cualquier aclaración.

Atentamente,

Dr. Juan Carlos Zenteno-Ruiz
Presidente, Comité de Investigación
Instituto de Oftalmología
Fundación de Asistencia Privada
Conde Valenciana I.A.P.

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
No. de registro ante la Cofepris
17 CI 09 015 008



Chimalpopoca 14 Colonia Obrera, Delegación Cuauhtémoc. C.P. 06800. México, Distrito Federal. Teléfono: 5442-1700.
Web: www.institutodeoftalmologia.org Correo: buzon@institutodeoftalmologia.org



Instituto de Oftalmología
"Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP" ®

Ciudad de México, a 22 de noviembre del 2018

Dra. María C. Jiménez Martínez
Alumno M. en C. Henry Velázquez Soto
Alumna María Fernanda Real San Miguel

Departamento: Inmunología

Presente,

Mediante este conducto me permito informarle que el protocolo sometido por Usted a revisión por el Comité de Bioseguridad de esta Institución titulado: "**Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4 en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia Sublingual Antígeno Desensibilizante**" (CB-049-2018), se **APROBÓ**, en su versión actual.

A fin de cumplir la normatividad de la institución, es necesario que obtenga las cartas de aprobación de los Comités de Investigación y Ética en Investigación. Asimismo, se le solicita que realice y entregue un reporte anual a este comité.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

Dra. Beatriz Buentello Volante
Secretaria, Comité de Bioseguridad
Instituto de Oftalmología
"Fundación de Asistencia Privada
Conde Valenciana IAP".

COMITÉ DE BIOSEGURIDAD
No. de registro ante la Cofepris
17 CB 09 015 007

**Institución de
Asistencia
Privada**

Chimalpopoca 14 Colonia Obrera, Delegación Cuauhtemoc. C.P. 06800, México, Distrito Federal. Teléfono: 5442-1700.
Web: www.institutodeoftalmologia.org Correo: buzon@institutodeoftalmologia.org



Instituto de Oftalmología
"Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP" ®

Ciudad de México, a 6 de febrero de 2019

Dra. María C. Jiménez Martínez
M. en C. Henry Velázquez Solo
Med. Cir. María Fernanda Real San Miguel

Departamento: Inmunología

Presente


Mediante este conducto me permito informarles que el protocolo sometido por Ustedes a revisión por el Comité de Ética en Investigación de esta institución con nombre: *"Análisis de la expresión de moléculas de coestimulación de la familia B7 y factor de transcripción IRF-4 en células dendríticas de pacientes con conjuntivitis alérgica durante el tratamiento con inmunoterapia sublingual Antígeno Desensibilizante"* (CEI-2018/11/01), se APROBÓ, en su versión actual.

De acuerdo a los lineamientos establecidos por este comité le notifico que la vigencia de esta carta es por un año. Asimismo, se le solicita que realice y entregue un reporte a los seis meses y así mismo informar cuando sea concluido.

(Subir información en la liga <http://www.unidaddeinvestigacion.org/comites/reporte-de-avances/>).

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,


Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra
Presidente, Comité de Ética en Investigación
Instituto de Oftalmología
"Fundación de Asistencia Privada
Conde Valenciana IAP"

**COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN**
Número de Registro
CONBIOÉTICA-09-CEI-023-20160830

**Institución de
Asistencia
Privada**

Chimalpocopa 14 Colonia Obrera, Delegación Cuauhtémoc, C.P. 06800, México, Distrito Federal. Teléfono: 5442-1700.
Web: www.institutodeoftalmologia.org Correo: buzon@institutodeoftalmologia.org

FCV-023-180915

16.4. Productos de investigación derivados del proyecto de doctorado

16.4.1. Artículo Original

Velazquez-Soto, H., Real-San Miguel, F., Pérez-Tapia, S. M., & Jiménez-Martínez, M. C. (2022). Kinetic Changes in B7 Costimulatory Molecules and IRF4 Expression in Human Dendritic Cells during LPS Exposure. *Biomolecules*, 12(7), 955. <https://doi.org/10.3390/biom12070955>

Enlace de acceso: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/7/955>



biomolecules



Article

Kinetic Changes in B7 Costimulatory Molecules and IRF4 Expression in Human Dendritic Cells during LPS Exposure

Henry Velazquez-Soto ¹ , Fernanda Real-San Miguel ¹, Sonia Mayra Pérez-Tapia ² and María C. Jiménez-Martínez ^{1,3,*} 

¹ Department of Immunology and Research Unit, Institute of Ophthalmology "Conde de Valencia Foundation", Mexico City 06800, Mexico; henry.velazquez@institutoofoftalmologia.org (H.V.-S.); fernal92@gmail.com (F.R.-S.M.)

² Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City 11340, Mexico; spenz@udibi.com.mx

³ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

* Correspondence: mcjimenezm@bq.unam.mx or mcjimenezm@institutoofoftalmologia.org

Abstract: A key aspect of the inflammatory phenomenon is the involvement of costimulatory molecules expressed by antigen-presenting cells (APCs) and their ability to secrete cytokines to set instructions for an adaptive immune response and to generate tolerance or inflammation. In a novel integrative approach, we aimed to evaluate the kinetic expression of the membrane and soluble B7 costimulatory molecules CD86, ICOS-L, PDL1, PDL2, the transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), and the cytokines produced by monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs) after challenging them with different concentrations of stimulation with *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) for different lengths of time. Our results showed that the stimuli concentration and time of exposure to an antigen are key factors in modulating the dynamic expression pattern of membrane and soluble B7 molecules and cytokines.

Keywords: LPS; costimulatory molecules; dendritic cells; cytokines; PDL1; PDL2; CD86; ICOS-L; B7; soluble costimulatory molecules; IRF4



Citation: Velazquez-Soto, H.; Real-San Miguel, F.; Pérez-Tapia, S.M.; Jiménez-Martínez, M.C. Kinetic Changes in B7 Costimulatory Molecules and IRF4 Expression in Human Dendritic Cells during LPS Exposure. *Biomolecules* 2022, 12, 955. <https://doi.org/10.3390/biom12070955>

Academic Editor: Paolo Fagnone

Received: 10 June 2022

Accepted: 4 July 2022

Published: 8 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

16.4.2. Artículo de revisión

Historical evolution, overview, and therapeutic manipulation of co-stimulatory molecules

Velazquez-Soto H, Real F, Jiménez-Martínez MC. Historical evolution, overview, and therapeutic manipulation of co-stimulatory molecules. *World J Immunol* 2022; 12(1): 1-8 [DOI: [10.5411/wji.v12.i1.1](https://doi.org/10.5411/wji.v12.i1.1)]

Enlace de acceso: <https://www.wjnet.com/2219-2824/full/v12/i1/1.htm>



World Journal of
Immunology

Submit a Manuscript: <https://www.fapublishing.com> *World J Immunol* 2022 January 24; 12(1): 1-8
DOI: 10.5411/wji.v12.i1.1 ISSN 2219-2824 (online)

MINIREVIEWS

Historical evolution, overview, and therapeutic manipulation of co-stimulatory molecules

Henry Velazquez-Soto, Fernanda Real, María C Jiménez-Martínez

ORCID number: Henry Velazquez-Soto 0000-0002-7405-4875; Fernanda Real 0000-0001-9839-0788; María C Jiménez-Martínez 0000-0003-3982-9097.

Author contributions: Velazquez-Soto H drafted the paper and designed the outline; Real F prepared the figures and tables, and reviewed the paper; Jiménez-Martínez MC reviewed the paper, figures and tables, coordinated the paper's preparation, and approved the final version.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that they have no conflicting interests.

Supported by Institute of Ophthalmology "Fundación Conde de Valenciana"; Velazquez-Soto H received fellowship 294674 from CONACYT during his doctoral studies in Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud (Farmacología Clínica), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); Real F with CVU 917729, received fellowship from CONACYT during his master studies in Programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud (Farmacología Clínica), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Country/Territory of origin: Mexico

Henry Velazquez-Soto, Fernanda Real, María C Jiménez-Martínez, Department of Immunology and Research Unit, Institute of Ophthalmology "Conde de Valenciana", Mexico City 06800, Mexico

María C Jiménez-Martínez, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

Corresponding author: María C Jiménez-Martínez, MD, PhD, Chief Doctor, Department of Immunology and Research Unit, Institute of Ophthalmology "Conde de Valenciana", Chimalpopoca 14, Col. Obrera, Del. Cuauhtemoc, Mexico City 06800, Mexico.
mjimenezm@institutoodeofalmologia.org

Abstract

Co-stimulatory molecules are key mediators in the regulation of immune responses and knowledge of its different families, structure, and functions has improved in recent decades. Understanding the role of co-stimulatory molecules in pathological processes has allowed the development of strategies to modulate cellular functions. Currently, modulation of co-stimulatory and co-inhibitory molecules has been applied in clinical applications as therapeutic targets in diseases and promising results have been achieved.

Key Words: Co-stimulatory molecules; Immune modulation; Monoclonal antibodies; Biological therapy; Autoimmune diseases; Oncological diseases

©The Author(s) 2022. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core Tip: Several reviews of co-stimulatory molecules have been published, however, this review summarizes the historical aspects, the cellular and molecular mechanisms of the different families of costimulatory molecules implied in processes of health and disease. All of this knowledge has been applied to develop different drugs targeting costimulatory molecules in different diseases like cancer and autoimmune diseases.

Citation: Velazquez-Soto H, Real F, Jiménez-Martínez MC. Historical evolution, overview, and therapeutic manipulation of co-stimulatory molecules. *World J Immunol* 2022; 12(1): 1-8
URL: <https://www.wjnet.com/2219-2824/full/v12/i1/1.htm>

16.4.3. Presentación en congreso internacional

Toll like receptor 4 ligation promotes B7 family costimulatory molecules expression in a time and cytokine dependent fashion Henry Velazquez Soto, Fernanda Real, Alberto Salazar and Maria C Jiménez Martínez J Immunol May 1, 2020, 204 (1 Supplement) 150.28;

Enlace de acceso: https://www.jimmunol.org/content/204/1_supplement/150.28.abstract

The screenshot shows the article page for "Toll like receptor 4 ligation promotes B7 family costimulatory molecules expression in a time and cytokine dependent fashion" on The Journal of Immunology website. The page includes a search bar, navigation menu, article title, authors, abstract, and various utility buttons.

The Journal of Immunology

Home Articles COVID-19/SARS/MERS Articles Info Editors Submit Subscribe More

Toll like receptor 4 ligation promotes B7 family costimulatory molecules expression in a time and cytokine dependent fashion

Henry Velazquez Soto, Fernanda Real, Alberto Salazar and Maria C Jiménez Martínez
J Immunol May 1, 2020, 204 (1 Supplement) 150.28;

Article Info & Metrics

Abstract

Introduction The interplay between costimulatory and coinhibitory molecules allows adequate integration of instructions for T cell fate. In this study, we explored how antigen concentration and time exposition to a pathogen associated molecule pattern may modulate the expression of B7 family costimulatory molecules CD86, ICOSL, PDL1, PDL2 and the Interferon Regulatory Factor 4 in human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs).

Methods MoDCs were obtained from healthy donors. MoDCs were stimulated with different concentrations of *E. coli* lipopolysaccharide and stimulated for 12, 24 or 48 h. Supernatant from stimulated MoDCs were collected for soluble cytokines determination using cytometric bead arrays. Cells were collected and membrane stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies to evaluate PDL1, PDL2, CD86 and ICOSL through flow cytometry. Intracellular staining was performed for IRF4 after cell permeabilization.

Results TNF α and IL-6 were significantly increased at 12 h, while IFN- γ and IL-2 were increased at 48 h. Costimulatory molecules showed a differential expression pattern. ICOSL was preferentially incremented at 48 h post stimuli independently of concentration used. PDL1 was induced at low concentrations and short stimulation periods, maintaining their expression all along with the stimulation kinetic. PDL2 increased its expression at short time of stimulation. CD86 and IRF4 did not show statistically significant differences.

Conclusion Our results suggest that costimulatory molecules have time-dependent expression profile, possibly influenced by the cytokines contained in the microenvironment and a lesser by the antigen concentration.

Copyright © 2020 by The American Association of Immunologists, Inc.

In this issue
The Journal of Immunology
Vol. 204, Issue 1 Supplement
1 May 2020
Table of Contents

Article Alerts | Email Article | Citation Tools | Share | Tweet | Me gusta 1

Jump to section
Article | Info & Metrics

Related Articles
No related articles found.
Google Scholar

Cited By...
More in this TOC Section
Similar Articles

RARE DISEASES | NIDDK

16.4.4. Difusión en página web

B7 Molecules on Dendritic Cells after LPS Stimulation

Velázquez-Soto, H.; Jiménez-Martínez, M.C. B7 Molecules on Dendritic Cells after LPS Stimulation. Encyclopedia. Available online: <https://encyclopedia.pub/entry/25836> (accessed on 15 August 2022).

Enlace de acceso: <https://encyclopedia.pub/entry/25836>

B7 Molecules on Dendritic Cells after LPS Stimulation

Subjects: Immunology

Contributor: Henry Velázquez-Soto, Maria C Jiménez-Martínez

A key aspect of the inflammatory phenomenon is the involvement of costimulatory molecules expressed by antigen-presenting cells (APCs) and their ability to secrete cytokines to set instructions for adaptive immune response and to generate tolerance or inflammation. In a novel integrative approach, the evaluation of the kinetic expression of the membrane and soluble B7 costimulatory molecules CD86, ICOS-L, PDL1, PDL2 was presented, the transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), and the cytokines produced by monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs) after challenging them with different concentrations of stimulation with *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) for various lengths of time. The evaluation showed that the stimuli concentration and time of exposure to LPS are critical factors in modulating the dynamic expression pattern of membrane and soluble B7 molecules and cytokines.

B7 molecules Dendritic cells Cytokines IRF4 PDL1 PDL2 CD86 ICOSL LPS

1. Introduction

Whether an inflammatory response is evoked depends on different extrinsic and intrinsic characteristics of the antigen and the host, which together define immunogenicity^[1]. One key aspect of the inflammatory response is the initiation of the adaptive immune response, which depends on the intertwined interaction between APCs and T cells^[2].

Dendritic cells (DCs) are the primary antigen-presenting cells (APCs) due to their ability to sense, capture, process, and present antigens to T cells. The initiation and polarization of adaptive immune responses are well orchestrated by a display of signals, including the expression of membrane-bound costimulatory molecules, soluble costimulatory molecules, and the secretion of cytokines by DCs.^{[3][4]} MHC/peptide-TCR interaction, costimulatory molecules' ligation with receptors, and cytokine production are the main phenomenon occurring in the immunological synapse^[5].

The best known is the B7 costimulatory family, belonging to the immunoglobulin superfamily (IgSF).^[6] This family comprises costimulatory molecules that promote activation, polarization, and proliferation in T cells, such as CD86 and ICOS-L (inducible T cell costimulator ligand), and coinhibitory molecules that regulate the tolerance, suppression, and cellular death, such as PDL1 (programmed death ligand 1) and PDL2 (programmed death ligand 2).^[2] Interestingly, previous studies have proven that soluble forms of B7 molecules (sB7) can be detected in different tissues and supernatants of cell cultures.^{[8][9][10][11]} This finding improves our understanding of the mechanism of action independently of cell contact interactions. However, it is still unclear whether a costimulatory or coinhibitory profile of sB7 molecules prevails under the steady or activation states of dendritic cells and what signals are conveyed to the T cells.

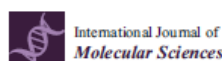
Critical regulators at the transcriptional level for B7 molecules expression have been reported. For example, CD80, CD86, and ICOS-L transcription factors include NF- κ B and PU.1.^{[12][13][14]} Recently, a novel transcription factor, the Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), was reported to be related to the expression of PDL1 and PDL2.^{[15][16][17]}

16.5 Otros productos de investigación logrados durante el doctorado

16.5.1. Artículo original (coautor)


Salazar, A., Casanova-Méndez, I., Pacheco-Quito, M., Velázquez-Soto, H., Ayala-Balboa, J., Graue-Hernández, E., Serafín-López, J., & Jiménez-Martínez, M. (2019). Low Expression of IL-10 in Circulating Bregs and Inverted IL-10/TNF- α Ratio in Tears of Patients with Perennial Allergic Conjunctivitis: A Preliminary Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1035. <https://doi.org/10.3390/ijms20051035>

Enlace de acceso: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1035/htm>



Article

Low Expression of IL-10 in Circulating Bregs and Inverted IL-10/TNF- α Ratio in Tears of Patients with Perennial Allergic Conjunctivitis: A Preliminary Study

Alberto Salazar ^{1,2}, Israel Casanova-Méndez ², Michele Pacheco-Quito ³, Henry Velázquez-Soto ², Julio Ayala-Balboa ², Enrique O. Graue-Hernández ³, Jeanet Serafín-López ¹ and María C. Jiménez-Martínez ^{2,4,*} 

¹ Departamento de Inmunología, ENCB, Instituto Politécnico Nacional, 11340 Ciudad de México, Mexico; alberto.salazar@institutoodeoftalmologia.org (A.S.); jeaserafin@hotmail.com (J.S.-L.)

² Department of Immunology and Research Unit, Institute of Ophthalmology "Conde de Valenciana Foundation", 06800 Mexico City, Mexico; israel.casanova@elconde.org (I.C.-M.); henry.velazquez@institutoodeoftalmologia.org (H.V.-S.); julbalboa@gmail.com (J.A.-B.)

³ Cornea and Refractive Surgery Department, Institute of Ophthalmology "Conde de Valenciana Foundation", 06800 Mexico City, Mexico; michelepacheco86@hotmail.com (M.P.-Q.); egraueh@gmail.com (E.O.G.-H.)

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico. P.O. Box 70159, 04510 Mexico City, Mexico

* Correspondence: mcjimenezm@bq.unam.mx; Tel.: +52-55-54-42-17-00 (ext. 3212)

Received: 6 January 2019; Accepted: 22 February 2019; Published: 27 February 2019



Abstract: Allergic conjunctivitis (AC) is one of the most common ophthalmological disorders seen in clinical practice. Growing evidence from recent years suggests that a subset of IL-10-expressing B cells is involved in inflammatory allergic diseases. In this study, we aimed to evaluate the potential involvement of blood Bregs cells in perennial allergic conjunctivitis (PAC), and interleukins (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12, and tumor necrosis factor (TNF)- α , were measured in tear samples and compared with healthy controls (HC) using flow cytometry. Non-significant differences in CD19⁺IL-10⁺ cell frequency between PAC patients and healthy controls (HC) were observed. Nevertheless, when we analyzed the mean fluorescence intensity (MFI) of IL-10 on CD19⁺CD38^{Lo}/Med⁺/Hi⁻ gated cells, we observed a significant decrease in MFI in all Bregs subsets in PAC patients. Additionally, tear cytokines showed 2.8 times lower levels of IL-10 than TNF- α in PAC patients when compared to HC. Our findings demonstrate an immunological dysregulation in patients with allergic conjunctivitis, characterized by the low expression of IL-10 in circulating CD19⁺CD38⁺ Bregs subsets and an inverted tear IL-10/TNF- α ratio, promoting a local pro-inflammatory microenvironment. These findings highlight the novel pathologic changes involved in ocular allergic diseases. Understanding systemic and local mechanisms will aid the design of immunomodulating therapeutics at different levels.

Keywords: IL-10; TNF- α ; tears; Bregs; allergic conjunctivitis

1. Introduction

Allergic conjunctivitis (AC) is one of the most common ophthalmological conditions seen in clinical practice [1]. The prevalence varies from country to country, with rates between 15% and 40% [2], and children being the most affected population [3]. Clinically, it is characterized by bilateral injection of the conjunctiva with itching as the predominant symptom, and it is often also associated with nasal symptoms [4]. Ocular allergy may present as severe forms of chronic inflammation affecting

16.5.2. Artículo original (coautor)


Salazar, A., Nieto, J. E., Velazquez-Soto, H., & Jiménez-Martínez, M. C. (2020). Activation of IL-10+ B cells: A novel immunomodulatory mechanism for therapeutic bacterial suspensions. *SAGE open medicine*, 8, 2050312120901547. <https://doi.org/10.1177/2050312120901547>

Enlace de acceso : <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2050312120901547>

Original Article

SAGE Open Medicine

Activation of IL-10+ B cells: A novel immunomodulatory mechanism for therapeutic bacterial suspensions

SAGE Open Medicine
Volume 8: 1–10
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2050312120901547
journals.sagepub.com/home/smo


Alberto Salazar^{1,2}, Jane E Nieto², Henry Velazquez-Soto²
and Maria C Jiménez-Martínez^{1,2} 

Abstract

Objectives: Bacterial components are used to improve immune responses in patients with respiratory infections. Pharmacological formulations of bacterial components include a mixture of bacterial antigens, some of which are complete inactivated bacteria, that is, named bacterial suspensions; while others are fragments of bacteria, which are presented as bacterial lysates. Although bacterial lysates have been broadly used as immune-stimulators, the biological support for the therapeutic effectiveness of bacterial suspension has not yet been studied. Thus, the aim of our study was to investigate the immunological activity induced by bacterial suspension.

Methods: This work was an exploratory translational study. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from healthy donors and cultured in time–dose dependent assays with a commercial bacterial suspension. Flow cytometry was used for phenotypic analysis and for determining soluble cytokines in culture supernatants.

Results: We observed that bacterial suspension activates B cells in a dose-dependent manner. Peripheral blood mononuclear cells were able to secrete IL-6 and IL-10 after 24 h of bacterial suspension stimulation. TLR2 expression was observed mainly on CD19+ CD38^{lo} B cells after 72 h of culture; remarkably, most of the TLR2+ CD19+ cells were also IL-10+.

Conclusion: Our findings suggest that bacterial suspension induces the activation of B cell subsets as well as the secretion of IL-6 and IL-10. Expression of TLR2 on CD19+ cells could act as an activation loop of IL-10+ B regulatory cells. The clinical implications of these findings are discussed at the end of this article.

Keywords

B cells, Bregs, IL-6, IL-10, bacterial suspension, immunomodulation

Date received: 21 May 2019; accepted: 23 December 2019

Introduction

Bacterial antigens or inactivated bacteria from different species are widely used to prevent recurrent respiratory infections in children and to improve immune responses in elderly patients.^{1,2} Commercially differing in their pharmaceutical formulations, the complete inactivated bacteria are referred to as bacterial suspensions (BSs), while fragments of bacteria are referred to as bacterial lysates (BLs). BS and BL vary in the number and type of bacteria they contain, and depending on whether they are lysates or suspensions, their biological effects are different. Some BL preparations can induce IL-1b, IL-6, and TNF- α in vitro³ while others activate in vivo T and NK cells⁴ and produce a protective Th1/Th17 memory immune response,⁵ induce nasal human beta-defensins,⁶ or increase the percentage of circulating B cells.⁷

Although BL are broadly used as immune-stimulators, the biological argument about the therapeutic effectiveness of BS has not been studied yet. Recently, some strains of bacteria were reportedly able to enhance the therapeutic effects of antigen-specific immunotherapy in asthma by the

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

²Department of Immunology and Research Unit, Institute of Ophthalmology “Conde de Valenciana,” Mexico City, Mexico

Corresponding author:

Maria C Jiménez-Martínez, Department of Immunology and Research Unit, Institute of Ophthalmology “Conde de Valenciana,” Chimalpopoca 14, Col. Obrera, Del. Cuauhtemoc, 06800 Mexico City, Mexico.
Emails: mcjimenezm@institutoodeoftalmologia.org; mcjimenezm@bq.unam.mx



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).