



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

Análisis de la participación de TLR-4 y alfa-MSH en la inducción de linfocitos T reguladores CD4+CD25+FOXP3+ en pacientes con conjuntivitis alérgica

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA: Jane Eyre Azucena Nieto Landaverde

TUTOR PRINCIPAL: Dra. María del Carmen Jiménez Martínez
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Enrique Ortega Soto
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO
SEPTIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Jane Eyre Azucena Nieto Landaverde con número de becario 385410 (Núm reg. 330168) agradece el apoyo recibido por parte de CONACYT para la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco la asistencia técnica de Verónica Martínez y Olga Tamayo. A Jesús Esteban Mendoza por su asistencia en el diseño de la representación gráfica de los hallazgos experimentales de esta tesis.

Agradezco a la Dra. María del Carmen por su dirección en la realización de este trabajo, al Dr. Gonzalo Castillo y el Dr. Enrique Ortega por ser parte de mi Comité Tutoral y proveer comentarios que ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

ÍNDICE

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE TLR-4 Y ALFA-MSH EN LA INDUCCIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES CD4+CD25+FOXP3+ EN PACIENTES CON CONJUNTIVITIS ALÉRGICA 1

ÍNDICE	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	7
RESPUESTA INMUNE EN LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS.....	7
RECONOCIMIENTO DE <i>DER P</i> POR TLR-4 Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS	9
MECANISMOS DE TOLERANCIA MEDIADOS POR CÉLULAS T REGULADORAS EN ALERGIA	10
CONJUNTIVITIS ALÉRGICA.....	11
DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	11
SUPERFICIE OCULAR	11
NEUROPEPTIDOS E INFLAMACIÓN.....	14
EFFECTO DE α -MSH EN EL SISTEMA INMUNE.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	18
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
PACIENTES Y DONADORES SANOS	21
EVALUACIÓN CLÍNICA	21
OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC).....	22
DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DE ESTIMULACIÓN ESPECÍFICA PARA α -MSH	22
DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DE ESTIMULACIÓN ESPECÍFICA PARA <i>DER P</i>	23
INMUNOFLUORESCENCIA DE MARCADORES DE SUPERFICIE EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CA Y SUJETOS SANOS.....	23
INMUNOFLUORESCENCIA DE MARCADORES INTRACELULARES DE CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CA Y SUJETOS SANOS.....	23
INMUNOFLUORESCENCIA DE MARCADORES DE SUPERFICIE	24
INMUNOFLUORESCENCIA DE MARCADORES INTRACELULARES	24
CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTE CELULAR	24
ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	25
RESULTADOS	26
α -MSH INDUCE LA DIFERENCIACIÓN IN-VITRO DE CÉLULAS T REGULADORAS A PARTIR DE PBMC POSTERIOR A LA ESTIMULACIÓN CON <i>DER P</i>	32
α -MSH INHIBE LA EXPRESIÓN DE CD69 EN CÉLULAS T CD4+ Y DISMINUYE LA SÍNTESIS DE IL-4 E IL-6 POSTERIOR A LA ESTIMULACIÓN CON <i>DER P</i>	33
DISCUSIÓN.....	35

PERSPECTIVAS	39
PUBLICACIONES	39
ARTÍCULO CENTRAL DE TESIS DOCTORAL	39
OTRAS PUBLICACIONES Y TRABAJOS REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO DOCTORAL	39
REFERENCIAS	41

RESUMEN

La conjuntivitis alérgica (CA) es una enfermedad causada por la inflamación de la superficie ocular y en la que de forma sistémica se ha demostrado una disminución en el porcentaje de células T reguladoras (Tregs) CD4+CD25+FOXP3+ y una desregulación de la respuesta inmune en la que hay una prevalencia de TNF- α sobre IL-10 a nivel ocular. En el presente trabajo se observó un aumento en la expresión de CD69 y TLR-4 en células T CD4+ de sangre periférica de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne (PAC), además de un aumento en la concentración de TNF- α , IL-4 e IL-6 en sobrenadante de cultivos de estas células posterior a la estimulación con *Der p* (ácaro de polvo). La síntesis de estas citocinas es, entre otros estímulos, regulada por mediadores solubles como lo son los neuropéptidos, entre los que destaca la hormona alfa estimulante de melanocitos (α -MSH). Se ha demostrado que este neuropéptido promueve un microambiente antiinflamatorio regulando la expresión de FOXP3, promoviendo la síntesis de IL-10 y TGF- β . En nuestro estudio, encontramos que la estimulación con *Der p* a PBMCs de pacientes con conjuntivitis alérgica en presencia de α -MSH indujo un aumento en el porcentaje de células T regs CD4+CD25+FOXP3+, además de disminuir la expresión de células T CD4+CD69+, CD4+TLR4+ y la concentración de IL-4 e IL-6 en sobrenadante. Mientras encontramos que la concentración de α -MSH en lágrima y suero de pacientes con PAC es mayor a individuos sanos. Estos resultados demuestran por primera vez la participación de α -MSH en la regulación de mecanismos inflamatorios involucrados en el desarrollo de la conjuntivitis alérgica, además de aportar conocimiento sobre mecanismos inflamatorios que en un futuro puedan ser usados como blancos terapéuticos para el tratamiento de conjuntivitis alérgica.

ABSTRACT

Allergic conjunctivitis (AC) is a disease that results from ocular surface inflammation in the presence of a sensitizing antigen. It is well known that patients with AC have a lower percentage of regulatory T cells in peripheral blood and show a local dysregulation of TNF- α and IL-10. On the other hand, melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) has been involved in regulating inflammatory ocular diseases through the induction of Tregs and the secretion of IL-10 and TGF- β . In this work, we observed that PBMC from patients with perennial AC (PAC) showed an increased expression of CD69 and TLR-4 on T CD4+ cells and high concentration of TNF- α , IL-4, and IL-6 in the supernatant after *Der p* stimulation. Interestingly, after treatment with α -MSH and *Der p*, we observed an increased percentage of regulatory T cells CD4+CD25+FOXP3+ and a lower expression of CD69 and TLR-4 on T CD4+ cells with a low concentration of IL-4, IL-6 and TNF- α in the supernatant of culture. In addition, we observed higher α -MSH concentrations in serum and tears from PAC patients than healthy donors. These results demonstrate the involvement of α -MSH in the immunological mechanisms of PAC in vitro and in vivo. Also, the results show the importance of TLR-4 acting synergically with the antigen to induce an inflammatory Th2 immune response. The pathophysiological mechanisms described in this study could be used in developing new therapeutical targets to control allergic conjunctivitis.

INTRODUCCIÓN

Respuesta inmune en las enfermedades alérgicas

Se estima que el 30% de la población mundial padece algún tipo de alergia. De acuerdo con la ISAAC, (Estudio Internacional del Asma y Alergias en la Infancia) Latinoamérica es una de las regiones en donde existe la más alta prevalencia de síntomas de rinoconjuntivitis en niños entre 6 y 7 años de edad, mientras que en Latinoamérica, Norteamérica y África, son los adolescentes entre 13 y 14 años quienes presentan los valores más altos. Además, en este estudio se destaca que los factores geo-climáticos son un factor importante que determina el desarrollo de enfermedades alérgicas, incluso en regiones de la misma ciudad pueden ocurrir grandes variaciones, como lo es en la Ciudad de México (Mallol et al., 2013).

Las enfermedades alérgicas se definen como la manifestación clínica de una respuesta de hipersensibilidad de tipo I, caracterizada por un aumento en la producción de IgE, en respuesta al contacto con alérgenos que lleva la respuesta inmune hacia un perfil Th2. Los alérgenos cuentan con características fisicoquímicas que conducen al desarrollo de alergias, entre las que destacan: capacidad enzimática (cisteína-proteasa), estructura de la proteína y patrón de glicosilación que les permiten irrumpir las barreras epiteliales de las mucosas, conduciendo a la sensibilización al alérgeno, es decir la producción de IgE específica al mismo (Shakib, Ghaemmaghami, & Sewell, 2008).

La actividad de proteasa con la que cuentan los alérgenos les permite degradar las uniones celulares de los epitelios, lo que activa la liberación de IL-25 e IL-33 por parte de las células epiteliales, reclutando eosinófilos, basófilos y mastocitos. IL-33 induce el aumento en la expresión de IL-33R en basófilos y mastocitos y la síntesis de IL-4, IL-9, IL-13, GM-CSF, CCL5, MIP-1 α , MIP-1 β y MCP-1, polarizando la respuesta hacia un perfil Th2. Además, IL-33 induce la migración de células B y células dendríticas (DC). Las células dendríticas reconocen el alérgeno, lo procesan y presentan a células T *naïve* que potencialmente se diferenciarán hacia un perfil Th2 (Reynolds & Finlay, 2017).

Las DC procesan y presentan el alérgeno a células T *naïve*, que posteriormente se activarán y sintetizarán IL-4 e IL-5, citocinas que inducen la diferenciación de células B plasmáticas productoras de IgE y además la activación de mastocitos y basófilos. En una nueva exposición al alérgeno, este es reconocido por la IgE y el complejo IgE-alérgeno se unirá a los receptores FcεRI que se encuentran en la superficie de mastocitos, induciendo su degranulación en la que se libera: histamina, proteasas y prostaglandinas, además de producirse IL-5 que favorece la polarización de la respuesta Th2 (Reynolds & Finlay, 2017).

Estos eventos llevan a la alteración de la homeostasis de las superficies mucosas, como la mucosa nasal, pulmonar, gastrointestinal y ocular, que son generalmente superficies de contacto a alérgenos y otros tipos de antígenos donde de forma basal hay diferentes mecanismos de tolerancia hacia estas moléculas, como los siguientes:

- Células T reguladoras FOXP3+ Tr1, Th3. Las mucosas son sitios de contacto con gran variedad de antígenos, el desarrollo de estas células antígeno específicas, permite que el reconocimiento de antígenos esté mediado por una respuesta reguladora. Estas células además sintetizan citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β que contribuyen a la diferenciación de células T reguladoras.
- Células dendríticas (DC) CD103⁺ CD103⁻CX3CR1⁺. Los antígenos a los que están expuestas las mucosas son reconocidos por este tipo de células dendríticas que favorecen la diferenciación de células T reguladoras.
- Células intraepiteliales Tγδ, estas células T tienen capacidad reguladora y se alojan entre las uniones laterales de las células de los epitelios.
- Células CD8⁺CD103⁺ este tipo de células T CD8⁺ se ubican en las mucosas y tienen la capacidad de inducir citotoxicidad en las células efectoras, también son capaces de sintetizar IL-10 y TGF-β que a su vez favorecen la diferenciación de células reguladoras (Reynolds & Finlay, 2017).

La disrupción de los epitelios favorece además la activación de mecanismos de la respuesta inmune innata, entre ellos la activación de receptores de reconocimiento de patrones como TLR-4 (*Toll Like Receptor 4*). TLR-4 es expresado por células del sistema inmune y células epiteliales, su principal ligando es LPS (Lipopolisacárido) induciendo la activación del factor de transcripción NF- κ B y con ello la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α (Takeuchi et al., 1999).

Reconocimiento de *Der p* por TLR-4 y su participación en el desarrollo de enfermedades alérgicas

TLR-4 ha sido asociado al padecimiento de enfermedades alérgicas, como asma, donde el reconocimiento de LPS por células epiteliales pulmonares lleva a la expresión de moléculas de adhesión, citocinas como TSLP, IL-25 e IL-33 que permiten la polarización de la respuesta a un perfil Th2 (Reynolds & Finlay, 2017), además de facilitar la sensibilización al ácaro de polvo *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*), considerado el principal agente causante de alergias (Reithofer & Jahn-Schmid, 2017).

Der p cuenta con hasta 30 componentes alergénicos, entre ellos *Der p 1* y *Der p 2* que son los más relevantes por inducir los mayores títulos de IgE en pacientes alérgicos (Thomas, Hales, & Smith, 2010). Estos alérgenos tienen actividad enzimática de cisteína-proteasa y serina-proteasa, respectivamente, las cuales tienen diversas funciones, entre ellas, la proteólisis de proteínas que conforman las uniones estrechas de los epitelios como ZO-1 y ocludinas (Shakib et al., 2008).

Der p 2, además de ser inmunogénico por su capacidad enzimática, tiene homología con MD-2, proteína que reconoce LPS, activando la respuesta inmune vía TLR-4. En varios estudios se ha comprobado la participación de TLR-4 en el desarrollo de enfermedades alérgicas. En modelo murino *knockout* para MD-2, los ratones inmunizados con LPS+*Der p 2*, presentaron un aumento en el infiltrado de eosinófilos y linfocitos, además de aumentar la producción de IgE, a diferencia de los ratones *knockout* para TLR-4, donde no se observan alteraciones en la producción de IgE (Küçüksezer et al., 2013) lo cual implica que *Der p 2* mimetiza la función de MD-2. Estas

observaciones, además apuntan a que LPS potencia la actividad alérgica de *Der p* y que ello sea vía TLR-4 (Trompette et al., 2009).

En modelo murino *knockout* para TLR-4 (TLR-4^{-/-}), al inmunizar con *Der p* se observó una disminución significativa de IL-5 e IL-13 en lavado bronqueoalveolar, además de un menor infiltrado inflamatorio en pulmón, con respecto a los ratones *wild type* (Perros, Lambrecht, & Hammad, 2011). Además, se ha comprobado que la sensibilización a ácaro de polvo favorece la posterior sensibilización a otros alérgenos, dado que activa la maduración de células dendríticas MHCII+CD11c+ de pulmón, además de la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-13 (van Rijt et al., 2012), mientras que LPS polariza la respuesta hacia un perfil Th1 o Th2 al momento de la sensibilización a alérgenos.

Estos estudios demuestran que la activación de TLR-4 induce mecanismos inflamatorios que favorecen el desarrollo de enfermedades alérgicas, polarizando la respuesta inmune a un perfil Th2 y alterando el microambiente tolerogénico de las mucosas.

Mecanismos de tolerancia mediados por células T reguladoras en alergia

Múltiples estudios realizados en modelos murino y humanos han reportado que la disminución en porcentaje y función de las células T reguladoras está asociado al desarrollo de alergia y que al restablecer estas células se observa una disminución de los síntomas de alergia (Lee et al., 2007). En pacientes con rinitis alérgica está reportado que existe una disminución de la frecuencia de células T regs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ con respecto a sujetos control, en este mismo estudio, observan que el porcentaje de células T regs está relacionado negativamente con la escala de síntomas de rinitis alérgica (Gajdanowicz et al., 2020). Mientras que en pacientes con conjuntivitis alérgica está reportado que existe una disminución en la frecuencia de células T regs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Galicía-Carreón et al., 2013).

Conjuntivitis alérgica

Definición y clasificación

La conjuntivitis alérgica es una enfermedad que afecta principalmente a la población pediátrica dañando la superficie ocular y en casos graves, la córnea. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018, las conjuntivitis son parte de las principales causas de consulta ambulatoria en México. En el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” es la segunda causa de consulta oftalmológica en edad pediátrica (Galicia-Carreón et al., 2013).

La conjuntivitis alérgica es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, resultado de un proceso de hipersensibilidad de tipo I. Existen cuatro tipos de conjuntivitis alérgica que se diferencian de acuerdo con la gravedad de los signos clínicos. La conjuntivitis alérgica estacional (SAC), conjuntivitis alérgica perenne (PAC), queratoconjuntivitis atópica (AKC) y queratoconjuntivitis primaveral (VKC). La SAC se ubica al inicio de la primavera y el invierno, donde hay picos en la producción de pólen y la PAC es un tipo de conjuntivitis en que los pacientes que reaccionan a alérgenos presentes durante todo el año como el ácaro de polvo *Der p* (*Dermatophagoides pteronyssinus*).

Superficie ocular

La superficie ocular, la conforman la conjuntiva, la córnea y la película lagrimal (Figura 1). La conjuntiva es un epitelio plano estratificado, no escamoso, vascularizado, con un grosor entre dos y tres células. En ella, se encuentran diversos tipos de células del sistema inmune, constituyendo el tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT), como células B, células T CD4, células T CD4 y CD8 reguladoras, células intraepiteliales, NK y $\gamma\delta$, células de Langerhans, células polimorfonucleares y mastocitos; así como, la glándula lagrimal, glándula de Meibomio y células caliciformes que contribuyen a la formación de la lágrima (McDermott et al., 2005). En condiciones de homeostasis, en la mucosa ocular prevalece una respuesta reguladora y Th2 que

mantiene concentraciones fisiológicas de IL-13 e IL-9 que inducen la formación de mucinas por las células caliciformes (Pflugfelder & Stern, 2014).

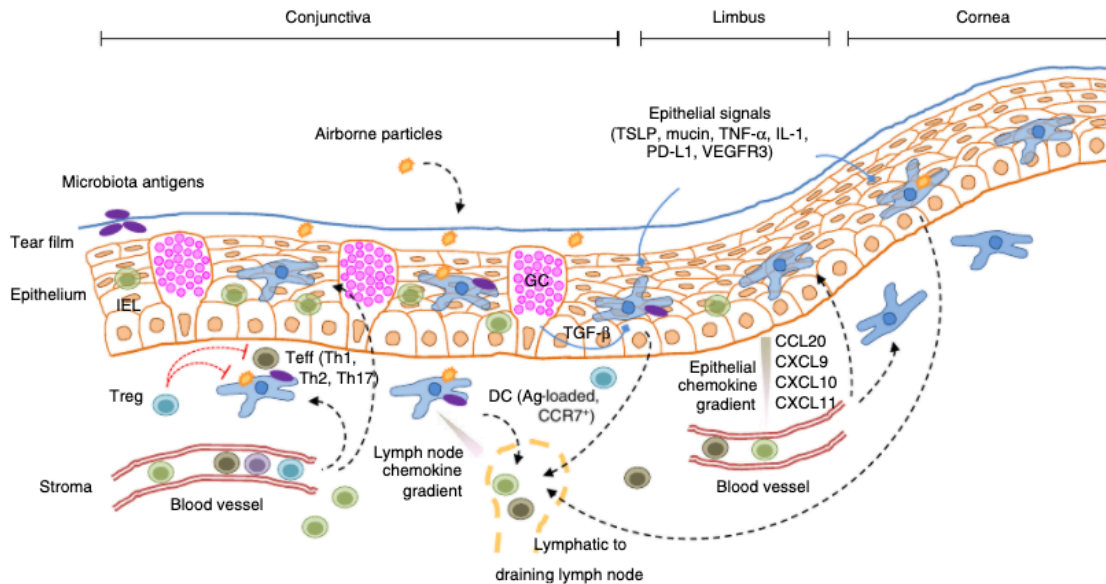


Figura 1. Estructura de la superficie ocular. La interacción entre los diferentes tipos celulares que conforman la superficie ocular y moléculas solubles, permiten crear una barrera que permite el continuo reconocimiento de antígenos por parte de las células dendríticas (DC), las cuales son capaces de migrar hacia nódulos linfáticos cercanos por su expresión de CCR7, donde presentan el antígeno a las células T, mismas que pueden adquirir un fenotipo efector (Th1, Th2, Th17) o regulador (Treg). La película lagrimal no sólo permite la lubricación y protección del epitelio conjuntival y corneal, sino que también permite la solubilización de quimiocinas como CCL20, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 que favorecen procesos de quimioatracción a partir del tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT) hacia la periferia por medio de los vasos sanguíneos. Otros mediadores solubles como TSLP, TNF- α , IL-1, PD-L1 El equilibrio entre estos dos tipos de respuesta determinará el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico o que el microambiente vuelva a la homeostasis. (Galletti, Guzmán, & Giordano, 2017)

La córnea está conformada por una capa transparente de tejido conectivo, recubierta en ambos lados por una capa de epitelio escamoso no queratinizado, de cinco a siete células de grosor. Esta estructura crea una barrera física que impide la entrada de antígenos. Hay presencia de células de Langerhans distribuidas en la periferia de la córnea, no así en la parte central, además de que esta zona es avascular, inhibiendo la migración de células linfoides (Knop & Knop, 2007).

La película lagrimal mantiene la lubricación de la conjuntiva y la córnea. Tiene tres principales componentes: un componente líquido, producido por la glándula lagrimal, que mantiene la osmolaridad de la lágrima y que contiene IgA secretora (sIgA); un componente lipídico, que es producido por las glándulas de Meibomio y que inhibe la evaporación de la lágrima; y una fase mucosa, producida por las células caliciformes que favorece la hidrofiliidad de la lágrima y que se extiende de manera uniforme a lo largo de la superficie ocular.

En la lágrima se encuentran diferentes moléculas que participan en la respuesta inmune de la superficie ocular como: lisozima, IgA secretora (sIgA), proteínas de complemento, lactoferrina y lipocalina. Las cuales tienen como función proteger la superficie ocular de la colonización de microorganismos patógenos y mantener su homeostasis. Además, contiene factores de crecimiento que favorecen la re-epitelización como el factor de crecimiento nervioso (NGF) (McDermott, 2013).

La producción de lágrima se encuentra sujeta a un ritmo circadiano. Durante las horas de sueño disminuye la producción de lágrima, induciendo la activación de mecanismos proinflamatorios, dado que disminuye la oxigenación de la superficie ocular, activando TLRs y mecanismos de complemento. El parpadeo permite la continua exfoliación de las células de la córnea, inhibiéndose este mecanismo en las horas de sueño (Galletti et al., 2017).

Al ocurrir alteraciones en los componentes de lágrima, se desarrolla la enfermedad de ojo seco, que se encuentra asociada a múltiples enfermedades, entre ellas las de origen autoinmune, infecciosas y la conjuntivitis alérgica. La enfermedad de ojo seco es causada por una excesiva evaporación del componente acuoso de la lágrima, al haber alteraciones en la formación de lípidos y mucinas, provocando daño en la superficie ocular (Ru et al., 2015).

Con el desarrollo de la conjuntivitis alérgica, resultan afectados los componentes de la superficie ocular. A nivel de la conjuntiva, altera los mecanismos de regulación de la respuesta inmune, favoreciendo una respuesta efectora, misma respuesta que llega a afectar la córnea al producirse eventos de reparación de tejido, que inducen fibrosis de la córnea y en consecuencia la formación

de queratocono. En cuanto a la lágrima, hay alteraciones en la producción de las moléculas que la componen como producto de la respuesta inflamatoria crónica, lo cual cambia su osmolaridad y la producción de moléculas que de forma fisiológica alberga. Dado que la inflamación genera daño en las células caliciformes, también se altera la producción de mucinas.

En modelo murino posterior a la inducción de ojo seco mediante escopolamina, hay un aumento en la concentración de TNF- α , IFN- γ e IL-1 β (Ru et al., 2015), mientras que en humano se ha determinado una asociación en la producción de IL-4, IL-12, IL-10 e IFN- γ y el desarrollo de ojo seco (Tong, Wong, & Cheng, 2018). La alteración en la concentración de estas citocinas altera los mecanismos de tolerancia que se ubican en la superficie ocular, llevando a un desequilibrio de la respuesta inmune que inhibe la diferenciación de células T reguladoras, como ha sido descrito por Galicia-Carreón J. et al. (Galicia-Carreón et al., 2013) donde se observa en pacientes con CA hay un predominio en la frecuencia de células con fenotipo CD4⁺CCR4⁺CCR9⁺ sobre la frecuencia de células Tregs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺.

Neuropéptidos e inflamación

Además de las citocinas, existen otros péptidos que participan en la regulación de la respuesta inmune a nivel de la superficie ocular, producidas principalmente por fibras nerviosas asociadas a la córnea. Entre ellos está el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido asociado al gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P (SP), neuropéptido Y (NY) y la α -hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) (Sabatino, Di Zazzo, De Simone, & Bonini, 2017). Estos péptidos actúan sobre receptores específicos, asociados a proteínas G, activando la vía de cAMP, misma que conduce a la activación de mecanismos anti-inflamatorios, como la síntesis de IL-10 y TGF- β . Aunque también pueden favorecer la síntesis de moléculas inflamatorias (Gonzalez-Rey, Chorny, & Delgado, 2007).

Se ha descrito que SP favorece procesos inflamatorios, como la síntesis de TNF- α en mastocitos de ratón (Ansel, Brown, Payan, & Brown, 1993), además de estimular la síntesis y liberación de

prostaglandina E₂, tromboxano B₂, así como radicales de oxígeno en macrófagos de cobayos, además de inducir la degranulación de mastocitos de rata y humano (Shanahan, Denburg, Fox, Bienenstock, & Befus, 1985).

Efecto de α -MSH en el sistema inmune

La α -hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) es una hormona peptídica, que pertenece al sistema de melanocortinas, en el que se encuentran: la hormona liberadora de corticotropina (ACTH) y α - β - y γ -MSH. Este sistema participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas, lo que le confiere a α -MSH actividad anti-inflamatoria. Las melanocortinas llevan a cabo su actividad al unirse de forma específica a cinco tipos receptores de melanocortina (MCR1-5), que son receptores dependientes de proteínas G que se encuentran expresados a nivel central, en tejidos periféricos y células del sistema inmune.

α -MSH regula diferentes procesos como la pigmentación de la piel, disminuye el apetito, regula procesos de memoria, movimiento, aprendizaje y también participa en procesos de regulación de la respuesta inmune. Es producida en tejidos periféricos como: queratinocitos, melanocitos, linfocitos, monocitos, entre otras. En el ojo, es producida por las células del epitelio retiniano, glándulas de meibomio, células caliciformes, la córnea y células acinares, ubicadas en la glándula lagrimal (Leiba et al., 1990; Ru et al., 2015; Tinsley, Fridland, Killmar, & Desiderio, 1988).

α -MSH es un derivado de la pro-opiomelanocortina, esta última es liberada por el estímulo de rayos UV, que a su vez inducen la liberación de citocinas pro-inflamatorias, (IL-1, IL-6, y TNF- α), además de neurotransmisores. Estos estímulos activan en el hipotálamo, la síntesis de hormona liberadora de corticotropina (CRH), posteriormente CRH activa la producción de pro-opiomelanocortina (POMC) en la glándula hipófisis o glándula pituitaria, la POMC sufre un corte proteolítico por enzimas convertasas PC1 y PC2. Posteriormente, en la glándula pituitaria anterior, se produce la hormona adreno-corticotropa (ACTH), β -LPH y NT. En un siguiente procesamiento efectuado en el lóbulo intermedio de la glándula pituitaria, a partir de NT, se produce γ -MSH y a

partir de ACTH se produce α -MSH y péptido del lóbulo intermedio tipo corticotropina (CLIP). β -LPH también es cortado para producir a β -endorfina-(1-26) y β -endorfina-(1-27) y β -MSH (Brzoska et al., 2008; Slominski, Wortsman, Luger, Paus, & Solomon, 2000) (Figura 2).

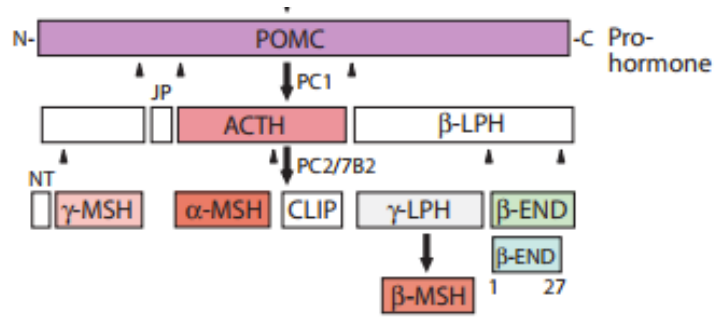


Figura 2. Síntesis de α -MSH. La proopiomelanocortina es el precursor de diferentes hormonas: ACTH, α , γ -MSH y β -endorfina principalmente. Estos derivados resultan del corte proteolítico de enzimas prohormona convertasas (PC). (Brzoska, Luger, Maaser, Abels, & Böhm, 2008)

Cada una de las melancortinas tienen afinidad distinta para cada receptor, el MCR2 es específico para ACTH y su expresión está restringida a la glándula adrenal, donde ACTH lleva a cabo su actividad induciendo la producción de cortisol, mientras que los receptores MCR1, MCR3, MCR4 y MCR5 están distribuidos en diferentes tipos celulares, entre ellos, células del sistema inmune (Brzoska et al., 2008; Slominski et al., 2000).

Los receptores de melanocortina son receptores acoplados a proteínas G, su función anti-inflamatoria es debida a que induce un aumento en la concentración de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), de forma localizada en las células. El cAMP generado activa a proteína cinasa A (PKA), que a su vez activa un factor de transcripción llamado, elemento de respuesta a cAMP (CREB), mismo que inhibe la traslocación de p65 al núcleo inhibiendo la activación de NF- κ B y a su vez es capaz de unirse al promotor de IL-10, activando su expresión (Gonzalez-Rey et al., 2007; Wehbi & Taskén, 2016).

En modelo murino de uveítis autoinmune, se ha descrito que la administración de α -MSH, disminuye la severidad de la enfermedad, inhibiendo la activación de NF- κ B, induciendo la

síntesis de IL-10 y TGF- β y la diferenciación de células T reguladoras Tr1 y Th3, por medio de la activación de MCR-1 y -3 (A. Taylor & Namba, 2001).

Además, en modelo murino de encefalitis autoinmune, en los ratones tratados con α -MSH se observa menor porcentaje de activación de células autoinmunes, donde determinan que la expresión de CD69 y CD134 disminuye (Fang et al., 2014a). Mientras que, en modelo murino de ojo seco, inducido con escopolamina donde hay un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , la administración de α -MSH disminuye la concentración de estas citocinas (Ru et al., 2015).

Estos antecedentes demuestran el potencial de α -MSH como un posible inductor de células T reguladoras en nuestro modelo de estudio y además sustentan el efecto anti-inflamatorio que ya ha sido reportado previamente sobre la activación de TLR-4.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se reconoce que una de las principales causas de las enfermedades alérgicas es la pérdida del ambiente regulador. Los pacientes con conjuntivitis alérgica perenne (CAP), muestran una disminución en el porcentaje de células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ en células de sangre periférica, además de un aumento en células CD4+ con capacidad de migración a mucosas asociada a la expresión de CCR4 y CCR9. Investigar los mecanismos inflamatorios involucrados en el mantenimiento del microambiente inflamatorio de manera crónica, permitirá identificar las razones por las cuales ocurre la pérdida de tolerancia en pacientes con conjuntivitis alérgica perenne.

Investigar la participación de TLR-4 y α -MSH en los mecanismos inflamatorios desarrollados en pacientes con CAP permitirá describir su relación a la disminución de células T reguladoras así como aportar al conocimiento de la alergia ocular que pueda contribuir a la mejora de los marcadores de diagnóstico y las terapias actuales.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será el porcentaje de células T CD4+TLR4+ en pacientes con conjuntivitis alérgica perenne (CAP) comparado con donadores sanos (DS)? ¿El estímulo con *Der p* promoverá la inducción de células T CD4+TLR4+ en cultivos de PBMCs de pacientes con PAC? ¿El cultivo con α -MSH tendrá efecto sobre la inducción de células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ a partir de PBMCs de pacientes con PAC? ¿Cuál será la concentración de α -MSH en suero de pacientes con PAC y donadores sanos?

HIPÓTESIS

Der p inducirá la expresión de TLR-4 en linfocitos T CD4+, mientras que α -MSH inducirá la diferenciación de Tregs en condiciones *in-vitro* a partir de PBMCs obtenidas de pacientes con conjuntivitis alérgica

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la estimulación con α -MSH en la inducción de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ en cultivos de PBMCs de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne. Así mismo, determinar los efectos de la estimulación a través de TLR-4 en la inducción de un microambiente inflamatorio; en ambos casos, en presencia del antígeno sensibilizante (*Der p*).

Objetivos particulares

- Determinar el porcentaje de células CD4⁺TLR4⁺ en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne (CAP) y donadores sanos mediante citometría de flujo.
- Determinar la frecuencia de células Tregs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ en pacientes con CAP y donadores sanos mediante citometría de flujo.
- Determinar la expresión de células CD4⁺TLR4⁺ y CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ en cultivos de células mononucleares de pacientes con CAP, posterior a la estimulación con *Der p*, LPS y α -MSH mediante citometría de flujo.
- Determinar el efecto de la estimulación de células mononucleares con *Der p*, LPS y α -MSH en la expresión de citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF-, IL-10 y TGF- β .
- Evaluar la expresión de α -MSH en suero y lágrima de pacientes con CAP y donadores sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y donadores sanos

El presente trabajo fue aprobado por los comités institucionales del Instituto de Oftalmología, “Fundación Conde de Valenciana”. Comité Científico (CC-034-2011, 28 Nov. 2011), de Bioseguridad (CB-034-2011, 9 Dec. 2011) y de Bioética (CEI-034-2011, 1 Dec. 2011). Así mismo, este trabajo se encuentra adherido a las normas estipuladas en la *Declaration of Helsinki and the E11 Statements of the International Conference of Harmonisation* (E11-ICH). Se obtuvo consentimiento y asentimiento informado de 14 pacientes con alergia ocular y nueve donadores sanos. El diagnóstico de conjuntivitis alérgica perenne se realizó por medio de examinación oftalmológica e inmuno-alérgológica.

Evaluación clínica

La determinación de la condición alérgica de los pacientes fue determinada por medio de pruebas cutáneas, realizando una pequeña laceración en la parte posterior del brazo, después se instiló el alérgeno *Der p*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e histamina como control positivo. Posterior a 30 minutos, se determinó el diámetro de la roncha producida, considerándose un resultado positivo, una roncha ≥ 3 mm de diámetro comparando con el control de histamina. Además, se midió la concentración de IgE total en suero de los pacientes.

La evaluación oftalmológica incluyó la prueba de Schirmer, colocando una tira de papel Schirmer (AMCON Tear Flow Test Strips Nomax, Inc, MO, USA) en un tercio del párpado inferior durante 5 minutos para después medir la cantidad de lágrima producida en milímetros. El tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) fue realizada observando la córnea a través de una lámpara de hendidura (Carl Zeiss, Meditec Inc. CA, USA) con filtro de luz de cobalto, aplicando en la superficie ocular del paciente una gota de fluoresceína (Bio Glo Fluorescein Ophthalmic Strips USP, Gujarat, India). El TBUT es el tiempo en aparecer la ruptura de la película de fluoresceína después de su aplicación y posterior al primer parpadeo, reportando el valor del promedio de tres mediciones.

Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Una vez que los pacientes y controles sanos firmaron el consentimiento y asentimiento informado, se obtuvo sangre periférica por medio de punción en vena cefálica o basilica, colocándose en tubos con heparina. Se tomaron 20 uL de sangre periférica total para efectuar las marcas específicas de células Tregs (CD4, CD25 y FOXP3) y la sangre periférica restante fue procesada para obtención de PBMCs. Las PBMCs se separaron por gradiente de densidad en Ficoll-hypaque, centrifugando a 300 G, durante 35 min. a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se colectaron las células en suspensión, se lavaron y se cuantificaron mediante un contador automático de células, Scepter™ 2.0 Cell Counter.

Las PBMC se cultivaron en placas de 96 pozos con fondo plano (Costar, Corning, NY®) con 2×10^5 células/pozo en medio RPMI-1640 suplementado con 1mM de piruvato de sodio, 2mM de L-glutamina y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Después de 24 h de haberse cultivado, el medio de cultivo se reemplazó con medio suplementado con suero fetal bovino al 10% y las células fueron incubadas en presencia de Lipopolisacárido derivado de *E.coli* (LPS) y/o extracto total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*); α -Hormona Estimulante de Melanocitos (α -MSH) y/o *Der p*; α MSH + LPS y/o *Der p*; *p* a dosis óptimas durante 72 h. Posterior a ese tiempo, las células se cosecharon y se lavaron con 500 μ L de *Phosphate Buffered Saline with 10% Bovine Albumin* (PBA) para posteriormente ser centrifugadas a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Después de ello, se llevó a cabo la inmunofluorescencia directa de las células.

Determinación de la dosis óptima de estimulación específica para α -MSH

Se obtuvieron PBMCs de donadores sanos, cultivándose en placas de 96 pozos con fondo plano (Costar, Corning, NY®) con 2×10^5 células/pozo en medio RPMI-1640 suplementado con 1mM de piruvato de sodio, 2mM de L-glutamina y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Después de 24 h de haberse cultivado, el medio de cultivo se reemplazó con medio suplementado con suero fetal bovino al 10% y fueron incubadas en presencia de 1 y 10 μ g de α -MSH, durante 24, 48 y 72 h.

Posterior al tiempo de incubación se determinó la expresión de CD69 por citometría de flujo. Determinando como dosis óptima la de 1 µg durante 72 h.

Determinación de la dosis óptima de estimulación específica para *Der p*

Se obtuvieron PBMCs de pacientes con CA, que fueron positivos a *Der p* por el método de Prick cultivándose en placas de 96 pozos con fondo plano (Costar, Corning, NY®) con 2x10⁵ células/pozo en medio RPMI-1640 suplementado con 1mM de piruvato de sodio, 2mM de L-glutamina y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Después de 24 h de haberse cultivado, el medio de cultivo se reemplazó con medio suplementado con suero fetal bovino al 10% y fueron incubadas en presencia de 0.1 y 1 µg de *Der p*, durante 72 h. Determinando como dosis óptima, la de 0.1 µg.

Inmunofluorescencia de marcadores de superficie en células de sangre periférica de pacientes con CA y sujetos sanos

A partir de la muestra de sangre de pacientes y controles sanos, se tomaron 20 µL de esta para determinar la frecuencia de expresión de marcadores de superficie de células de sangre periférica, mediante inmunofluorescencia directa usando anticuerpos específicos para humano anti-CD4 AmCyan o ficoeritrina-cyanina 5 (PE-Cy5), anti-CD25 PE y anti-TLR-4 APC incubando por 20 min con los respectivos anticuerpos monoclonales durante 30 min a 4° C. Posteriormente, los eritrocitos se lisaron con *buffer* de lisis, incubándose por 10 min Después las células se lavaron con PBA (*Phosphate Buffered Saline with 10% Bovine Albumin*), se fijaron con formaldehído al 1% y se analizaron por citometría de flujo.

Inmunofluorescencia de marcadores intracelulares de células de sangre periférica de pacientes con CA y sujetos sanos

Las células que fueron marcadas con anti-CD4 AmCyan o PE-Cy5 y anti-CD25 PE, se fijaron con 250 µL de BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Bioscience) y se incubaron por 30 min. a 4°C, posteriormente se lavaron con 100 µL de BD Perm/Wash™ *Buffer* (BD Bioscience), y se

centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. a 4°C. Posteriormente se agregaron 50 µL de Perm/Wash™ *Buffer* (BD Bioscience) y se incubó por 30 min a 4°C con anti-FOXP3 humano FITC. Finalmente, las células se analizaron por citometría de flujo.

Inmunofluorescencia de marcadores de superficie

Posterior a la incubación con los estímulos, las células se incubaron con anti-CD4 AmCyan o PE-Cy5, anti-CD25 PE, anti-TLR-4 APC y anti-CD69 FITC o PeCy7 (Phycoerythrin-Cyanin 7) de humano durante 20 min. a 4° C. Después, las células se lavaron y se realizó la inmunofluorescencia de marcadores intracelulares.

Inmunofluorescencia de marcadores intracelulares

Las células que fueron marcadas con anti-CD4 AmCyan o PE-Cy5 y anti-CD25 PE, se fijaron con 250 µL de BD Cytofix/Cytoperm™ (BD Bioscience) y se incubaron por 30 min. a 4°C, posteriormente se lavaron con 100 µL de BD Perm/Wash™ *Buffer* (BD Bioscience), y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. a 4°C. Posteriormente se agregaron 50 µL de Perm/Wash™ *Buffer* (BD Bioscience) y se incubó por 30 min a 4°C con anti-FOXP3 humano FITC. Finalmente, las células se analizaron por citometría de flujo.

Cuantificación de citocinas en sobrenadante celular

Se cuantificó la concentración de citocinas mediante re-arreglos de citocinas acoplados a perlas (CBA) en sobrenadante celulares, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, CA, USA). IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 (BD™ CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit) (BD Bioscience) fue analizado en el software BD™ Cytometric Bead Array (CBA) (BD Bioscience) y la concentración de TGF- β (Human TGF-b1 Single Plex Flex Set) (BD Biosciences, CA, USA). La concentración de analitos fue calculada interpolando los resultados a la curva estándar del CBA determinadas en el software BD FCAP Array, versión 3.0 (BD Biosciences, CA, USA). Los límites de detección (pg/mL) para cada citocina analizada fueron: IL-

2: 2.6; IL-4: 4.9; IL-6: 2.4; IL-10: 4.5; TNF- α : 3.8; IFN: 3.7; IL-17:18.9; TGF- β : 14.9. Estos valores fueron determinados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis por citometría de flujo

Las células se analizaron mediante la expresión de marcadores fenotípicos en el citómetro de flujo FACS Verse Cell Sorter BD Biosciences™ equipado con la aplicación BD FACSuite software® Versión 1.0.5.3841. Inicialmente se estableció una ventana para determinar las características morfológicas (tamaño/granularidad) de las PBMC y posteriormente, se realizaron diferentes ventanas para determinar las características inmunofenotípicas de acuerdo con la molécula que se pretendía identificar y se realizó la determinación del porcentaje, frecuencia y densidad de expresión (intensidad media de fluorescencia, *MFI*).

RESULTADOS

Expresión de células T CD4+TLR-4+ y CD4+CD25+FOXP3+ en sangre periférica de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne

Con la finalidad de identificar la participación de TLR-4 en la función efectora de células T de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne (CAP), medimos su expresión mediante citometría de flujo (Tabla 1), observando un aumento en el porcentaje de células CD4+TLR4+ en PBMC de pacientes diagnosticados con CA, comparado con donadores sanos (DS) (MD 8.3%, RIQ 3.98-25.65 versus MD 2.99%, RIQ 2.35–7.46, respectivamente; $p = 0.0346$). Mientras que como había sido publicado por nuestro grupo de investigación, el porcentaje de células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ es menor en pacientes con CA comparado con donadores sanos. (MD 1.04%, RIQ 0.395–1.515 versus MD 9.89%, RIQ 4.01–10.07, respectivamente; $p = 0.0001$). (Tabla 1)

Subpoblaciones de células T %	CAP (n=15) MD (RIQ)	DS (n=9) MD (RIQ)	<i>p</i>
CD4+	35.65 (27.85-38.8)	33.45 (26.35-39.2)	0.8857
CD4+TLR4+	8.34 (3.98-25.65)	2.99 (2.35-7.48)	*0.0346
CD4+CD25+	16.7 (12.95-23.15)	10.27 (9.31-14.02)	*0.0042
CD4+CD25+TLR4+	12.3 (3-49)	2.7 (1.8-3.4)	*0.0218
CD4+CD25-TLR4+	7 (1.8-31.2)	2.12 (0.7-3.4)	0.1128
CD4+CD25+FOXP3+	1 (0.39-1.5)	9.9 (4-10)	***0.0001

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

Tabla 1. Subpoblaciones de células T analizadas por citometría de flujo a partir de sangre periférica de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne (CAP) y donadores sanos (DS).

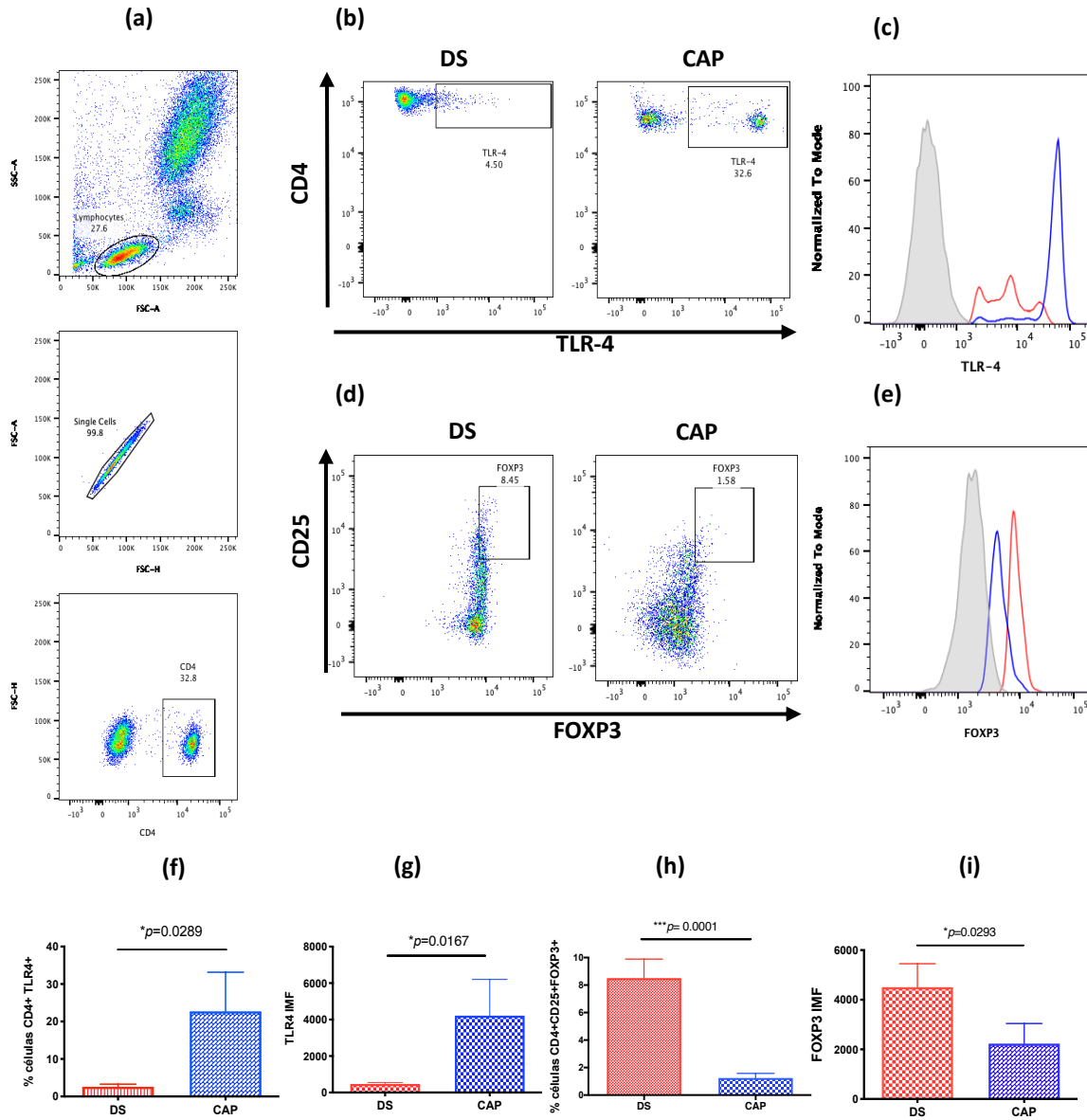


Figura 3. Expresión de TLR4 en células T CD4+ y población de células T CD4+CD25+FOXP3+ **a)** Ambas poblaciones fueron analizadas, seleccionando los linfocitos, posteriormente los *singlets* y a partir de ellos se seleccionaron las células CD4+; **b)** *Dot plots* representativos de la población CD4+TLR4+ de donadores sanos (DS) y pacientes con conjuntivitis alérgica (CAP). **c)** La expresión de TLR4 en células de pacientes con conjuntivitis alérgica (CAP) (línea azul) es mayor que en células de DS (línea roja). **d)** *Dot plots* representativos de la población de células reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ de DS y pacientes con conjuntivitis alérgica (CAP). **e)** La expresión de FOXP3 en células CD4+ es mayor en DS que en pacientes con conjuntivitis alérgica (CAP). **f)** El porcentaje de células CD4+TLR+ es mayor en pacientes con conjuntivitis alérgica (CAP) que en DS; **g)** al igual que la expresión de TLR4 es mayor en células CD4+ de PAC que en células de DS. **h)** El porcentaje de células CD4+CD25+FOXP3+ es mayor en DS que en PAC; al igual que la expresión de FOXP3 en células CD4+CD25+ de DS (línea roja) comparado con pacientes con conjuntivitis alérgica (CAP) (línea azul).

Además, analizamos la expresión de TLR-4 en células CD4+CD25+, donde observamos un aumento 4.5 veces mayor en pacientes con CAP, comparado con donadores sanos (MD 12.3%, RIQ 3–49 vs. MD 2.7%, RIQ 1.8–1.4, respectivamente; $p = 0.0042$) Tabla 1

Inducción de células CD4+TLR-4+ posterior a la estimulación con *Der p*

Con el fin de determinar si las células CD4+TLR-4+ podían ser inducidas mediante la estimulación antigénica con *Der p*, PBMC de pacientes con CAP fueron cultivadas y expuesta a extracto de *Der p* durante 72 h. Después analizamos la expresión de células CD4+TLR-4+ por citometría de flujo y se observó un aumento en el porcentaje de células T CD4+TLR-4+ en células estimuladas con *Der p* comparado con las células estimuladas sólo con medio de cultivo RPMI-1640 (MD 5.4, RIQ 2.7–6.2 vs. MD 1.7%, RIQ 0.41–2.2, respectivamente; $p = 0.0108$) (Figura 4). Aunque no observamos una actividad sinérgica entre LPS y *Der p* (MD 7.5, RIQ 3.7–9.9) (Tabla 2 y Figura 4), al analizar la activación de las células T CD4+ por medio de la expresión de CD69, observamos un aumento significativo de las células estimuladas con *Der p*+LPS (MD 3.8, RIQ 1.8–11.3; $p = 0.041$) (Tabla 2 y Figura 6) comparadas con las células que sólo fueron estimuladas con *Der p*; además de observar un aumento significativo en la expresión de células T CD4+CD69+ estimuladas con *Der p* o LPS comparado con aquellas estimuladas con RPMI-1640 (MD 2.9%, RIQ 2.2–3.8 versus MD 2.6%, RIQ 1.9–5.6, respectivamente; $p=0.0137$ vs. $p=0.0147$, respectivamente) (Tabla 2).

Subpoblaciones de células T %	RPMI MD (RIQ)	Der p MD (RIQ)	LPS MD (RIQ)	Der p+LPS MD (RIQ)	α-MSH MD (RIQ)	Der p+α-MSH MD (RIQ)	LPS+α-MSH MD (RIQ)	Der p+LPS+α-MSH MD (RIQ)	Con A MD (RIQ)	<i>p</i>
CD4+CD69+	1.35 (0.76-2.4)	2.9 (2.2-3.8)	2.6 (1.9-5.6)	3.8 (1.8-11.3)	1.68 (0.52-2.9)	1.6 (0.5-2.3)	3-045 (1.98-4.68)	4 (1.8-11.3)	50.6 (37.8-64.3)	a **0.0057 b *0.0147 c ** 0.0056
CD4+TLR4+	1.7 (0.4-2.24)	5.4 (2.7-6.2)	4.5 (3.2-9.6)	7.5 (3.7-9.9)	2 (1.3-3.4)	4 (2-5.3)	1.4 (0.6-3.5)	6.3 (2-10.7)	35.7 (12.3-62)	a * 0.0108 b ** 0.0087 c 0.5238
CD4+CD25+	5.18 (2.8-5.7)	10.57 (5.9-14.68)	9.2 (7.7-12.9)	8.22 (7.6-14.35)	5.15 (4-6.2)	9.18 (7.3-12)	8 (5.9-10.4)	14.85 (13.5-16.3)	53 (27.8-62.5)	a ** 0.0059 b *** 0.0003 c 0.9038
CD4+CD25+TLR4+	0.05 (0.02-0.35)	1 (0.15-2.4)	10.7 (8-13)	8.2(7.8-15.3)	0.06(0.01-0.51)	0.54 (0.23-1.5)	0.14 (0.06-0.6)	1.4 (1.06-1.8)	44 (3.3-59)	a 0.0303 b 0.0173 c 0.668
CD4+CD25-TLR4+	2.3 (1.2-5.6)	5.8 (4.8-12.8)	4 (2.1-6)	4.2 (3.1-9.6)	5.8 (1.8-10.27)	4.2 (3.1-9.6)	2.8 (1.7-4.1)	1.4 (0.82-7.7)	6.6 (4.2-7.6)	a *0.0325 b 0.5281 c 0.3333
CD4+CD25+FOXP3+	0.32 (0.23-1.32)	3.3 (2.7-3.9)	1.1 (1.05-2.6)	3.75 (1.6-4.3)	0.5 (0.42-2.09)	4.6 (3.02-5.4)	2.08 (0.97-3.5)	4.8 (2.4-9.4)	6.7 (3.4-7.5)	a **0.0013 b 0.0958 c * 0.0478

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

^ap=RPMI vs Der p; ^bp=RPMI vs Der p; ^cp=Der p vs Der p+α-MSH

RIQ: Rango Interquartil

MD: Mediana

Tabla 2. Expresión de subpoblaciones de células T posterior al estímulo con *Der p*, LPS y α -MSH.

Citocinas en sobrenadante (pg/mL)	RPMI MD (RIQ)	<i>Der p</i> MD (RIQ)	LPS MD (RIQ)	LPS+ <i>Der p</i> MD (RIQ)	α -MSH MD (RIQ)	<i>Der p</i> + α -MSH MD (RIQ)	LPS+ α -MSH MD (RIQ)	<i>Der p</i> +LPS+ α -MSH MD (RIQ)	Con A MD (RIQ)	<i>p</i>
IFN-γ	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-17.3)	3.3 (0-9.6)	0 (0-0)	0 (0-0)	12.7 (6.6-24.4)	7.6 (1.4-17.1)	1773 (194-4233)	^a 0.4462 ^b 0.0769 ^c 0.999
IL-2	0 (0-3.2)	39.4 (10-132.5)	0 (0-0.0)	0 (0-0)	1.7 (0-4-6)	44.31 (7.1-107.8)	0.0 (0-3.2)	3.9 (3.4-7.9)	1269 (13.4-8476)	^a *** 0.0002 ^b 0.4256 ^c 0.7023
IL-4	0 (0-0)	3 (2.6 (7.4)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	9.4 (7.8-12.6)	^a ** 0.0020 ^b 0.9999 ^c * 0.0121
IL-6	7.6 (5.5-14.3)	47.2 (26.9-334.2)	28934 (3438-40622)	26584 (9374-46936)	1.1 (0-3.9)	0 (0-3.1)	20177 (1495-46093)	21885 (2764-38468)	344.1 (94.36-704)	^a **0.0095 ^b ** 0.0095 ^c ** 0.0012
IL-17	25.2 (5.2-31.9)	20.44 (4.7-25.2)	39.05 (0-52.8)	24.15 (18.8-32.7)	30 (5.2-49.4)	26.3 (20.1-68.4)	23.6 (2.6-37.1)	21 (5-22.03)	72.4 (25.5-526.5)	^a p=0.2600 ^b p=0.4855 ^c p=0.1430
TNF-α	0 (0-0)	5.4 (3.7-18.6)	20.5 (4.7-51)	31.1 (24.2-63)	0 (0-0)	6.4 (5.3-18.5)	14.6 (4.4-27)	15.3 (13.5-44.7)	638 (274-1589)	^a ***0.0003 ^b ** 0.0026 ^c 0.6026
IL-10	0 (0-0)	15.2 (13.5-20.4)	770 (309.5-962.6)	860.2 (504.4-1181)	2.1 (0-5.1)	10.17 (6.6-22.8)	882 (83.9-990.3)	841 (653-876)	123 (83-315)	^a *** 0.0006 ^b **0.0025 ^c 0.3759
TGF-β	9562 (4711-11110)	12298 (9795-15480)	13915 (11606-32542)	14912 (9324-17720)	8872 (5231-12137)	12933 (9403-16014)	12978 (9598-17603)	8464 (7960-10852)	12298 (9795-15480)	^a NS ^b NS ^c NS

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

^ap=RPMI vs *Der p*; ^bp=RPMI vs *Der p*; ^cp=*Der p* vs *Der p*+ α -MSH

Límite de Detección (pg/mL) (LD): IL-2: 2.6; IL-4: 4.9; IL-6: 2.4; IL-10: 4.5; TNF- α : 3.8; IFN: 3.7; IL-17:18.9; TGF- β : 14.9
RIQ: Rango Interquartil
MD: Mediana

Tabla 3. Expresión de citocinas en sobrenadante de células mononucleares de pacientes con CAP posterior al estímulo con *Der p*, LPS y α -MSH.

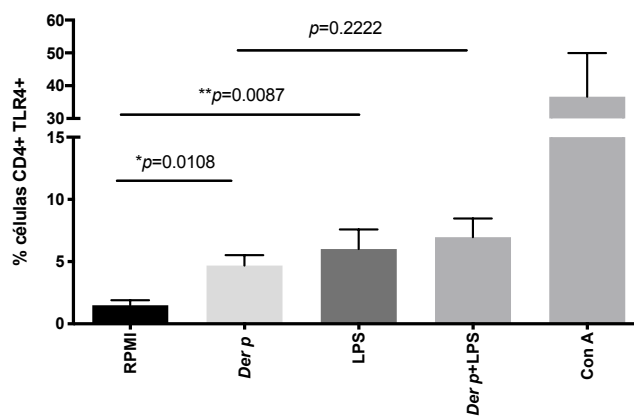


Figura 4. Expresión de células T CD4+TLR4+ posterior a la estimulación con *Der p* y LPS. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

α -MSH induce la diferenciación in-vitro de células T reguladoras a partir de PBMC posterior a la estimulación con *Der p*

Se analizó la inducción de células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ de forma antígeno específica, observando un aumento en la expresión de células T regs CD4+CD25+FOXP3+ posterior a la estimulación con *Der p* (MD 3.29%, RIQ 2.77–3.87), comparando con las células cultivadas sólo con RPMI (MD 0.32%, RIQ 0.23–1.325) ($p = 0.0013$). Sin embargo, el estímulo con LPS no induce un aumento en la frecuencia de T regs. Al explorar la capacidad anteriormente descrita de α -MSH de inducir células T regs, cultivamos células estimulas con *Der p* y en presencia de α -MSH, observando un aumento significativo en el porcentaje de células T CD4+CD25+FOXP3+ (MD 4.6%, RIQ 3.020–5.435) comparado con células cultivadas sólo con RPMI (MD 0.32% RIQ 0.23-1.32) ($p = 0.0437$) (Tabla 2 y Figura 5). No se observaron cambios significativos en el porcentaje de células T regs en las células estimuladas con LPS + *Der p* y α -MSH, así como tampoco en las células estimuladas sólo con α -MSH (Tabla 2 y Figura 5).

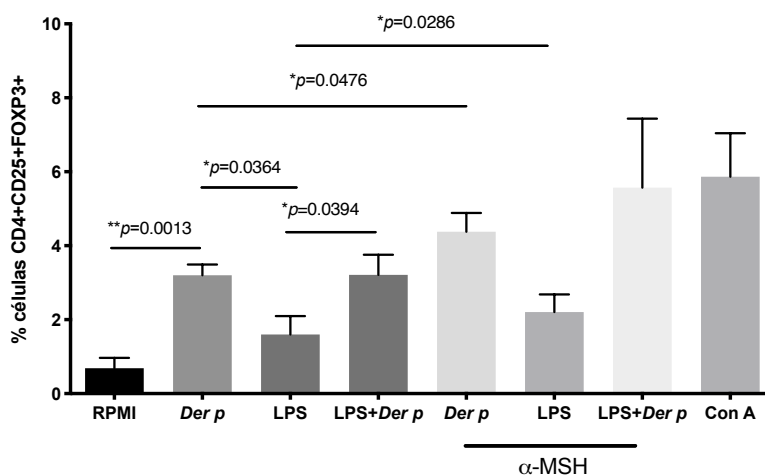


Figura 5. Expresión de células CD4+CD25+FOXP3+ posterior a la estimulación con *Der p*, LPS y α -MSH. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

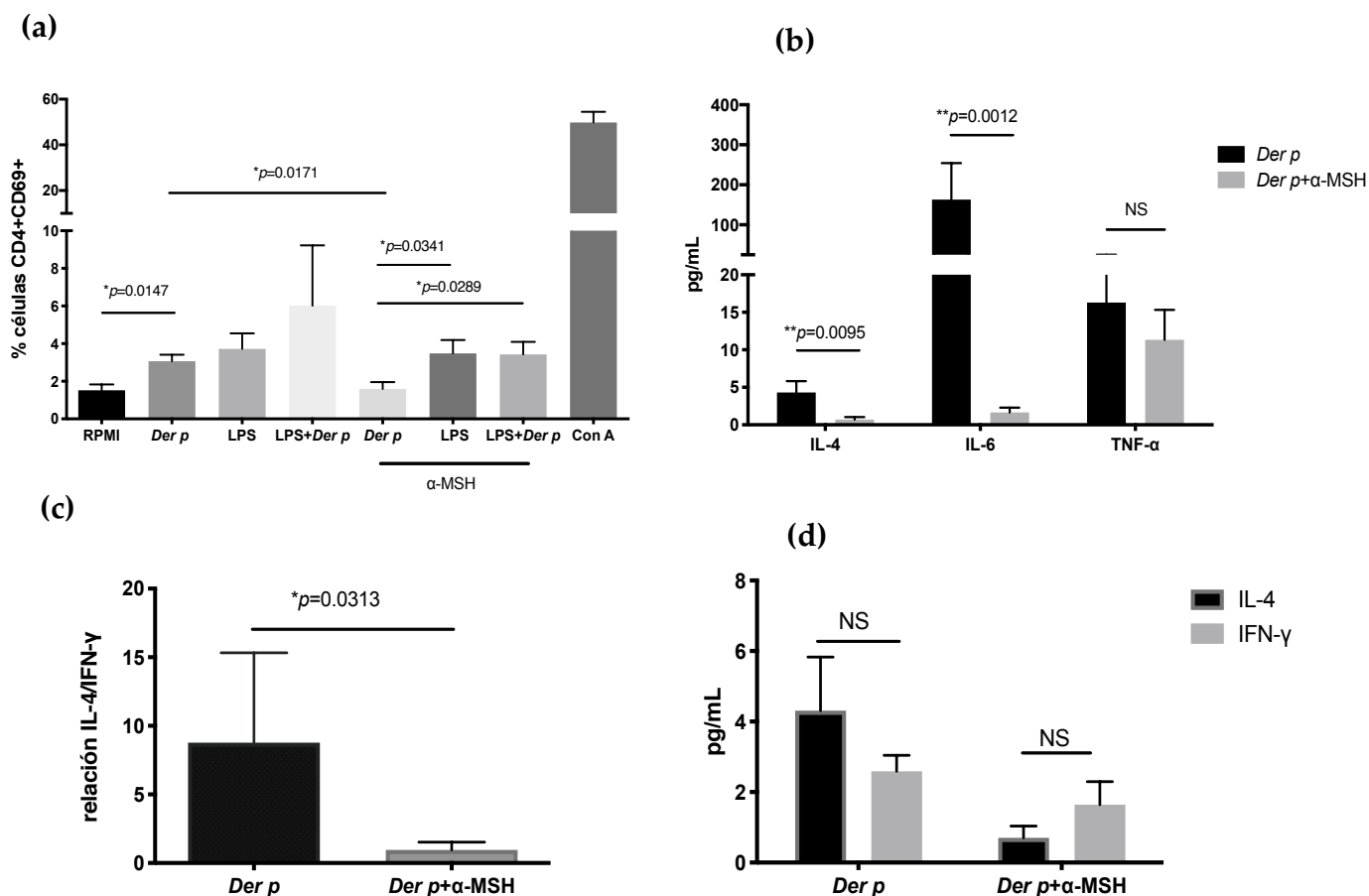


Figura 6. Expresión de células CD69 en células CD4+ y disminución en la concentración de IL-4 e IL-6 posterior a la estimulación con *Der p* y α -MSH. **a)** Expresión de células CD4+CD69+ posterior a la estimulación con *Der p*, LPS y α -MSH. **b)** Concentración de IL-4, IL-6 y TNF- α posterior a la estimulación con *Der p* y α -MSH. **c)** Índice IL-4/IFN- γ . **d)** Comparación entre la síntesis de IL-4 e IFN- γ posterior a la estimulación con *Der p* y *Der p* + α -MSH.
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; NS $p \geq 0.05$.

α -MSH inhibe la expresión de CD69 en células T CD4+ y disminuye la síntesis de IL-4 e IL-6 posterior a la estimulación con *Der p*

La función reguladora de α -MSH además tiene efecto sobre la activación celular, por ello medimos la expresión de CD69 en células T CD4 después de ser incubadas con α -MSH y *Der p*. Observamos

que la expresión de CD69 fue dos veces menor en las células estimuladas con α -MSH y *Der p* (MD 1.61%, RIQ 0.557–2.278) comparado con las células estimuladas con *Der p* (MD 2.73%, RIQ 0.5575–2.278) ($p = 0.0147$) (Figura 6a). Además, analizamos la expresión de citocinas en sobrenadante de estos cultivos y observamos la disminución de 6.7 veces de IL-4 en las células estimuladas con *Der p* en presencia de α -MSH ($p = 0.005$) (Tabla 3). El mismo efecto tuvo α -MSH sobre IL-6 donde disminuyó 100 veces la producción de esta citocina comparado con las células que sólo fueron estimuladas con *Der p*. Mientras que *Der p* induce un aumento de 20 veces en la síntesis de TNF- α ($p = 0.0003$), sin embargo no se observaron cambios significativos en presencia de α -MSH. Aunque no observamos cambios significativos en cuanto a la producción de IFN- γ (Figura 6d), al analizar la relación IL-4/IFN- γ , observamos que α -MSH disminuye significativamente esta relación comparado con las células estimuladas con *Der p* ($p = 0.0313$) (Figura 6c).

Aumento en la concentración de α -MSH en lágrima de pacientes con conjuntivitis alérgica

Al determinar los cambios que ejerce α -MSH sobre los mecanismos inmunológicos de pacientes con CA, analizamos la producción de este neuropéptido en lágrima, observando que los pacientes con CAP producen 2.1 veces más de α -MSH comparado con DS ($p = 0.0218$) (Figura 7). En suero de pacientes con CAP también se encuentra aumentada la concentración de α -MSH comparado con suero de DS ($p = 0.0001$) (Figure 7).

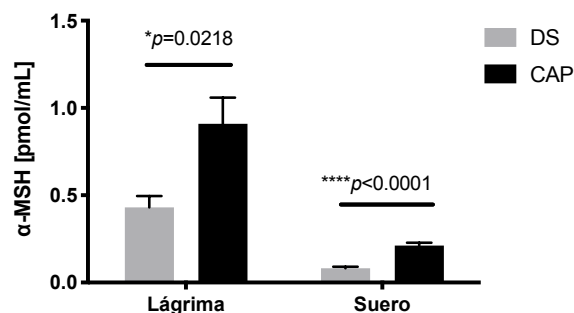


Figura 7. Concentración de α -MSH en suero y lágrima de pacientes con CA y donadores sanos. La concentración de α -MSH fue determinada por medio de ELISA sándwich en muestras de lágrima y suero de donadores sanos y pacientes con CA. * $p \leq 0.05$; **** $p \leq 0.0001$.

DISCUSIÓN

La patología de la CA en sus formas agudas, como la conjuntivitis alérgica perenne (CAP) involucra un aumento en la expresión a nivel sistémico de células T efectoras CD4+CCR4+CCR9+ antígeno específicas, mientras que hay una disminución de células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+. Bonini et al. (Bonini, Micera, Iovieno, Lambiase, & Bonini, 2005) reporta el infiltrado de células T CD4+TLR4+ en conjuntiva en pacientes diagnosticados con VKC, mientras que Taylor demuestra que α -MSH inhibe la estimulación de macrófagos J774 estimulados con LPS (A. W. Taylor, 2005).

En el presente trabajo, observamos que pacientes con PAC expresan una mayor concentración de células T CD4+TLR4+ en sangre periférica. Trompette A. y colaboradores describen que *Der p 2*, uno de los componentes moleculares más inmunogénicos del ácaro de polvo es un análogo de MD-2 lo cual induce la activación de TLR-4 (Trompette et al., 2009). La estimulación de TLR-4 a través de *Der p* induce la síntesis de IgE y la activación de eosinófilos y linfocitos en un modelo experimental de asma. En el presente trabajo, no sólo demostramos la expresión de TLR-4 en células T CD4 en sangre periférica, sino también encontramos que al estimular PBMCs de pacientes con CA hay un aumento en la expresión de TLR-4 y CD69 en células T CD4 y además aumento en la síntesis de IL-4, IL-6 y TNF- α , lo que indica que la activación alérgeno específica también induce la activación de TLR-4. De acuerdo con ello, Sahoo et al. demuestran en modelo murino que al inhibir la activación de TLR-4 mediante un antagonista y estimulando vía CD3, la expresión de CD69 disminuye, lo que indica la relación que existe entre una respuesta aguda mediada por TLR-4 y la activación de células T; mientras que la estimulación de células dendríticas de ratón vía TLR-4 inhibe la actividad reguladora de células T regs a través de IL-6. Para comprobar este proceso en nuestro modelo, son necesarios experimentos posteriores en los que se aislen células T CD4+TLR-4+ de sangre periférica de pacientes con CA, estimularlas con *Der p*, co-cultivarse con células reguladoras y determinar si hay una inhibición de la capacidad reguladora de estas últimas.

La diferenciación de células T regs en timo es por medio del reconocimiento del complejo MHC-antígenos propios, además de la presencia de linfopoyetina estromal tímica (TSL), mientras que

en periferia depende de la presencia de TGF- β , IL-10 e IL-2 principalmente (Sakaguchi et al., 2006). Otros factores solubles como α -MSH han demostrado tener actividad inmunomoduladora induciendo la diferenciación de células T regs en modelo murino (A. Taylor & Namba, 2001). En el presente trabajo pudimos observar que la presencia de α -MSH en células mononucleares estimuladas con *Der p* favorece la expresión de células T regs CD4+CD25+FOXP3+ así como disminuye la expresión de CD69 en células T CD4+. CD69 es un marcador temprano y transitorio de activación de linfocitos, Fang, et al. (Fang et al., 2014b) demuestran en modelo murino de encefalomiелitis, que SV α -MSH, una molécula análoga de α -MSH inhibe la expresión de CD69 en células T autorreactivas, además de inducir la expresión de células T CD4+CD25+FOXP3+. Raap, U. et al. (Raap et al., 2003) reportan en modelo murino de asma que α -MSH disminuye la expresión de IL-4 e IL-13 en lavado bronqueoalveolar. En este trabajo demostramos que la presencia de α -MSH en células estimuladas con *Der p* disminuye la síntesis de IL-4 e IL-6, no observando cambios significativos en la producción de IL-10 y TGF- β , lo que indica que en este modelo la actividad inmunomoduladora de α -MSH sea favoreciendo condiciones intracelulares que llevan hacia un perfil regulador más que efector, para demostrarlo sería necesario determinar la expresión de receptores de melanocortina en células Tregs inducidas por α -MSH en presencia de *Der p* y además determinar la expresión cAMP, CREB y ERK en estas mismas.

α -MSH se expresa en el hipotálamo, formando parte del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas, además de expresarse en queratinocitos, glándula lagrimal, entre otros órganos. A nivel de la superficie ocular se ha explorado como otros neuropéptidos como péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P (SP), péptido asociado al gen de la calcitonina (CGRP) aumentan posteriormente a retos antigénicos a nivel ocular, lo que indica su función inmunomoduladora. Sin embargo, α -MSH no ha sido evaluado en la superficie ocular en estas condiciones, ni en condiciones basales. En este trabajo, reportamos que la concentración de α -MSH en suero y lágrima en pacientes con CA es mayor que en donadores sanos, siendo un resultado esperado, pues la expresión de α -MSH es inducida por la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Slominski et al., 2000). De acuerdo con Kathleen C. Robinson, 2021 (Collaborative Group for the Meta-Analysis of Individual Patient Data in et al., 2018), donde analizan la expresión de MCR4, uno de los 5 receptores de melanocortina, observan que, en ratones con el receptor de melanocortina mutado,

aumenta significativamente el umbral y latencia del dolor, creando un estado de analgesia. El mecanismo propuesto de acuerdo con nuestro modelo de estudio es que, aunque los pacientes expresan sistémica y localmente una concentración significativa de α -MSH este no está activando los receptores de forma efectiva en las células T o tal vez no en la ventana de tiempo adecuada y por ello estos se diferencian hacia un fenotipo efector o inflamatorio. Para comprobar esto, es necesario determinar la expresión de receptores de melanocortina en las T regs antígeno específicas y medir la respuesta generada posterior a la incubación con α -MSH.

La calidad de la lágrima producida en pacientes con CA se ve afectada y por ello estos pacientes desarrollan ojo seco, esto se evalúa con dos pruebas oftalmológicas: el tiempo de ruptura lagrimal (TBUT), en la que se evalúa el tiempo de recuperación de la película lagrimal en la superficie ocular después del parpadeo; y la prueba de Schirmer, en la se mide la cantidad de lágrima producida. En modelo murino de ojo seco inducido por escopolamina, α -MSH mejora los resultados de estas pruebas, además de disminuir la síntesis de TNF- α en córneas de ratones con ojo seco (Ru et al., 2015). Para determinar el efecto del aumento de α -MSH en lágrima y suero que observamos en nuestros resultados sobre la función lagrimal en pacientes con CA se requieren realizar experimentos posteriores. Por lo que es importante continuar el presente trabajo, analizando la expresión de los receptores de melanocortina en células T CD4+ de pacientes con CA y evaluar el perfil de expresión de estos receptores en células T CD4+ y CD4+CD25+FOXP3+, además de analizar la expresión de CREB como factor de transcripción asociado a la función de α -MSH y que se ha visto induce la expresión de FOXP3.

En conclusión, identificamos que en pacientes con CA existe una subpoblación de células T CD4+TLR4+ que responden a la estimulación con *Der p*, el cual además promueve la síntesis de TNF- α , IL-6 e IL-4 y un aumento en la expresión de CD69. Además, se demostró que α -MSH es capaz de inducir la expresión de células CD4+CD25+FOXP3+ e inhibir la expresión de células T CD4+CD69+, IL-4, IL-6 y TNF- α (Figura 8).

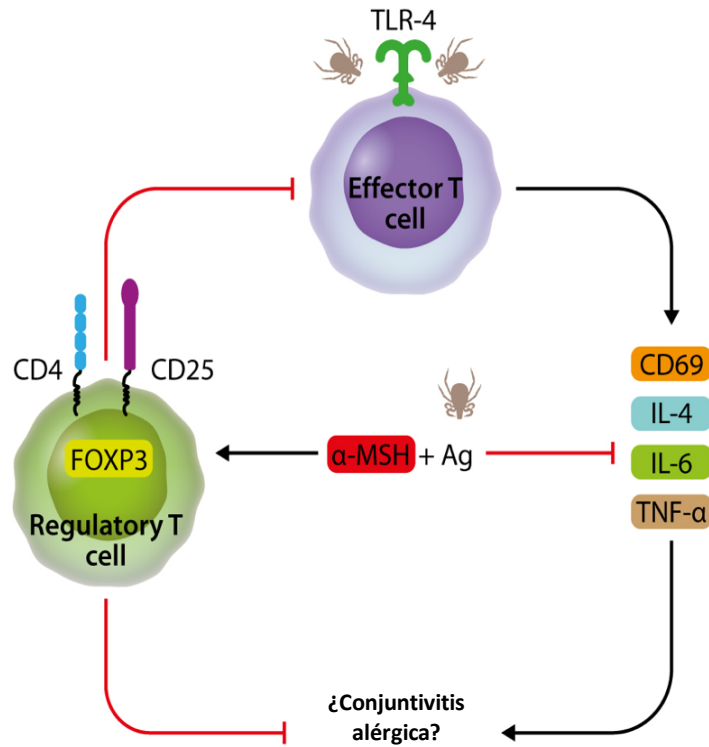


Figura 8. Representación gráfica de los hallazgos experimentales de esta tesis. Participación de TLR-4 y α -MSH en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne. El contacto con *Der p*, conduce a la activación de células T CD4+ mediada por CD69, llevando a la síntesis de IL-4, IL-6, TNF- α que en conjunto podrían estar llevando a la inflamación de la conjuntiva. Este mecanismo puede estar mediado por la expresión de TLR-4 en células CD4+ y en conjunto participar en la inhibición de la expresión de células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+.

PERSPECTIVAS

- Determinar la expresión de CD69 y TLR-4 en células CD4+ posterior al estímulo con *Der p*.
- Determinar la expresión de receptores MC1r, MC3r y MC5r en células Tregs CD4+CD25+FOXP3+ de cultivos de PBMCs de pacientes con CAP activa posterior al estímulo con α -MSH y/o *Der p* por citometría de flujo.
- Determinar la frecuencia de células Tregs CD4+CD25+FOXP3+ en cultivos de PBMCs de pacientes con CA activa posterior al estímulo con el antagonista de los receptores de α -MSH por citometría de flujo.

PUBLICACIONES

Artículo central de tesis doctoral

Nieto, J. E., Casanova, I., Serna-Ojeda, J. C., Graue-Hernández, E. O., Quintana, G., Salazar, A., & Jiménez-Martínez, M. C. (2020). Increased Expression of TLR4 in Circulating CD4+T Cells in Patients with Allergic Conjunctivitis and In Vitro Attenuation of Th2 Inflammatory Response by Alpha-MSH. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 7861. <https://doi.org/10.3390/ijms21217861>

Otras publicaciones y trabajos realizadas durante el periodo de estudio doctoral

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>

Congresos

- Presentación del cartel: α -MSH Induces CD4+CD25+FOXP3+ Cells and Suppress Activation of PBMCs from Pediatric Patients with Allergic Conjunctivitis. IMMUNOLOGY 2019 TM. San Diego, California.
- Presentación del cartel: La activación inducida por el Ag específica (*Der p*) es regulada positivamente por la señalización vía TLR4 y negativamente por
- α -MSH en células mononucleadas de pacientes con alergia ocular: propuesta de un nuevo eje neuroinmune. Congreso Mexicano de Inmunología Clínica y Alergia. Ciudad de México.

- Participación como ponente con el tema: efecto modulador de α -MSH en alergia ocular. Congreso Nacional de Neuroinmunoendocrinología. Mazatlán, Sinaloa.
- Presentación oral: Incremento de linfocitos CD4+TLR4+asociado a daño ocular en pacientes con conjuntivitis alérgica. Congreso Latinoamericano de Alergia, Asma e Inmunología. Premiado con el primer lugar en el concurso de Investigación. Cancún, Quintana Roo.
- Presentación oral: α -MSH incrementa la frecuencia de células Tregs CD4+CD25+FOXP3+ y disminuye la expresión de CD69 posterior a la estimulación antigénica en PBMCs de pacientes con conjuntivitis alérgica. LXX Congreso Nacional de Inmunología Clínica y Alergia. Premiado con el tercer lugar en el concurso de Investigación. Puerto Vallarta, Jalisco.

REFERENCIAS

- Ansel, J. C., Brown, J. R., Payan, D. G., & Brown, M. A. (1993). Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol*, *150*(10), 4478-4485.
- Bonini, S., Micera, A., Iovieno, A., Lambiase, A., & Bonini, S. (2005). Expression of Toll-like receptors in healthy and allergic conjunctiva. *Ophthalmology*, *112*(9), 1528; discussion 1548-1529. doi:10.1016/j.ophtha.2005.04.009
- Brzoska, T., Luger, T. A., Maaser, C., Abels, C., & Böhm, M. (2008). Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev*, *29*(5), 581-602. doi:10.1210/er.2007-0027
- Collaborative Group for the Meta-Analysis of Individual Patient Data in, M. D. R. T. B. t., Ahmad, N., Ahuja, S. D., Akkerman, O. W., Alffenaar, J. C., Anderson, L. F., . . . Menzies, D. (2018). Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *Lancet*, *392*(10150), 821-834. doi:10.1016/S0140-6736(18)31644-1
- Fang, J., Han, D., Hong, J., Zhang, H., Ying, Y., Tian, Y., . . . Lin, J. (2014a). SValpha-MSH, a novel alpha-melanocyte stimulating hormone analog, ameliorates autoimmune encephalomyelitis through inhibiting autoreactive CD4(+) T cells activation. *J Neuroimmunol*, *269*(1-2), 9-19. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.01.010
- Fang, J., Han, D., Hong, J., Zhang, H., Ying, Y., Tian, Y., . . . Lin, J. (2014b). SV α -MSH, a novel α -melanocyte stimulating hormone analog, ameliorates autoimmune encephalomyelitis through inhibiting autoreactive CD4(+) T cells activation. *J Neuroimmunol*, *269*(1-2), 9-19. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.01.010
- Gajdanowicz, P., Van Elst, D., Smolińska, S., Eljaszewicz, A., O'Mahony, L., Kettner, A., & Jutel, M. (2020). The frequency of CD4 + CD25 + FoxP3 + CD127 - cells in Bet v 1 contiguous overlapping peptide immunotherapy as a putative marker of efficacy. *Allergy*, *75*(10), 2685-2686. doi:10.1111/all.14342
- Galicia-Carreón, J., Santacruz, C., Ayala-Balboa, J., Robles-Contreras, A., Perez-Tapia, S. M., Garfias, Y., . . . Jiménez-Martínez, M. C. (2013). An imbalance between frequency of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and CCR4+ and CCR9+ circulating helper T cells is associated with active perennial allergic conjunctivitis. *Clin Dev Immunol*, *2013*, 919742. doi:10.1155/2013/919742
- Galletti, J. G., Guzmán, M., & Giordano, M. N. (2017). Mucosal immune tolerance at the ocular surface in health and disease. *Immunology*, *150*(4), 397-407. doi:10.1111/imm.12716
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., & Delgado, M. (2007). Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol*, *7*(1), 52-63. doi:10.1038/nri1984
- Knop, E., & Knop, N. (2007). Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy*, *92*, 36-49. doi:10.1159/000099252
- Kücüksezer, U. C., Palomares, O., Rückert, B., Jartti, T., Puhakka, T., Nandy, A., . . . Akdis, M. (2013). Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks

- allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*, 131(3), 875-885. doi:10.1016/j.jaci.2012.10.051
- Lee, J. H., Yu, H. H., Wang, L. C., Yang, Y. H., Lin, Y. T., & Chiang, B. L. (2007). The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol*, 148(1), 53-63. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03329.x
- Leiba, H., Garty, N. B., Schmidt-Sole, J., Piterman, O., Azrad, A., & Salomon, Y. (1990). The melanocortin receptor in the rat lacrimal gland: a model system for the study of MSH (melanocyte stimulating hormone) as a potential neurotransmitter. *Eur J Pharmacol*, 181(1-2), 71-82. doi:10.1016/0014-2999(90)90246-3
- Mallol, J., Crane, J., von Mutius, E., Odhiambo, J., Keil, U., Stewart, A., & Group, I. P. T. S. (2013). The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 41(2), 73-85. doi:10.1016/j.aller.2012.03.001
- McDermott, A. M. (2013). Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res*, 117, 53-61. doi:10.1016/j.exer.2013.07.014
- McDermott, A. M., Perez, V., Huang, A. J., Pflugfelder, S. C., Stern, M. E., Baudouin, C., . . . Kurie, E. (2005). Pathways of corneal and ocular surface inflammation: a perspective from the cullen symposium. *Ocul Surf*, 3(4 Suppl), S131-138. doi:10.1016/s1542-0124(12)70238-0
- Perros, F., Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2011). TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways. *Respir Res*, 12(1), 125. doi:10.1186/1465-9921-12-125
- Pflugfelder, S. C., & Stern, M. E. (2014). Mucosal environmental sensors in the pathogenesis of dry eye. *Expert Rev Clin Immunol*, 10(9), 1137-1140. doi:10.1586/1744666x.2014.944163
- Raap, U., Brzoska, T., Sohl, S., Páth, G., Emmel, J., Herz, U., . . . Renz, H. (2003). Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation. *J Immunol*, 171(1), 353-359. doi:10.4049/jimmunol.171.1.353
- Reithofer, M., & Jahn-Schmid, B. (2017). Allergens with Protease Activity from House Dust Mites. *Int J Mol Sci*, 18(7). doi:10.3390/ijms18071368
- Reynolds, L. A., & Finlay, B. B. (2017). Early life factors that affect allergy development. *Nat Rev Immunol*, 17(8), 518-528. doi:10.1038/nri.2017.39
- Ru, Y., Huang, Y., Liu, H., Du, J., Meng, Z., Dou, Z., . . . Zhao, S. (2015). α -Melanocyte-stimulating hormone ameliorates ocular surface dysfunctions and lesions in a scopolamine-induced dry eye model via PKA-CREB and MEK-Erk pathways. *Sci Rep*, 5, 18619. doi:10.1038/srep18619
- Sabatino, F., Di Zazzo, A., De Simone, L., & Bonini, S. (2017). The Intriguing Role of Neuropeptides at the Ocular Surface. *Ocul Surf*, 15(1), 2-14. doi:10.1016/j.jtos.2016.10.003
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., . . . Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*, 212, 8-27. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x
- Shakib, F., Ghaemmaghami, A. M., & Sewell, H. F. (2008). The molecular basis of allergenicity. *Trends Immunol*, 29(12), 633-642. doi:10.1016/j.it.2008.08.007

- Shanahan, F., Denburg, J. A., Fox, J., Bienenstock, J., & Befus, D. (1985). Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol*, *135*(2), 1331-1337.
- Slominski, A., Wortsman, J., Luger, T., Paus, R., & Solomon, S. (2000). Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev*, *80*(3), 979-1020. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.979
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., . . . Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, *11*(4), 443-451. doi:10.1016/s1074-7613(00)80119-3
- Taylor, A., & Namba, K. (2001). In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol*, *79*(4), 358-367. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01022.x
- Taylor, A. W. (2005). The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) suppresses LPS-stimulated TLR4 with IRAK-M in macrophages. *J Neuroimmunol*, *162*(1-2), 43-50. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.01.008
- Thomas, W. R., Hales, B. J., & Smith, W. A. (2010). House dust mite allergens in asthma and allergy. *Trends Mol Med*, *16*(7), 321-328. doi:10.1016/j.molmed.2010.04.008
- Tinsley, P. W., Fridland, G. H., Killmar, J. T., & Desiderio, D. M. (1988). Purification, characterization, and localization of neuropeptides in the cornea. *Peptides*, *9*(6), 1373-1379. doi:10.1016/0196-9781(88)90205-7
- Tong, L., Wong, T. Y., & Cheng, Y. (2018). Level of tear cytokines in population-level participants and correlation with clinical features. *Cytokine*, *110*, 452-458. doi:10.1016/j.cyto.2018.05.013
- Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R. S., Madan, R., . . . Karp, C. L. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, *457*(7229), 585-588. doi:10.1038/nature07548
- van Rijt, L. S., Logiantara, A., Utsch, L., Canbaz, D., Boon, L., & van Ree, R. (2012). House dust mite allergic airway inflammation facilitates neosensitization to inhaled allergen in mice. *Allergy*, *67*(11), 1383-1391. doi:10.1111/all.12017
- Wehbi, V. L., & Taskén, K. (2016). Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T cells - Role of Anchored Protein Kinase A Signaling Units. *Front Immunol*, *7*, 222. doi:10.3389/fimmu.2016.00222