



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DEL CD30 SOLUBLE EN LA EXPRESIÓN  
DE CD30 Y CD153 EN LINFOCITOS T Y B DE  
PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**LUIS ANTONIO GARCÍA MOSQUEDA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA  
2014**



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.

## **RECONOCIMIENTOS**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER), BAJO LA ASESORÍA DEL DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA.

LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, FUE POSIBLE GRACIAS AL APOYO DE LA DOCTORA PATRICIA GOROCICA ROSETE Y AL DOCTOR RICARDO LASCURAIN LEDESMA.

### **Agradecimientos**

**Al Doctor Ricardo Lascurain Ledesma**

**A la Doctora Patricia Gorocica Rosete**

**Al Doctor Enrique Rojas Ramos**

**A la Dra. Norma Martínez Jiménez**

*Como una pequeña muestra de cariño y afecto*

*Este trabajo se lo dedicado a mi mamá Marta Mosqueda Mata, a mi abuela María Guadalupe Mata Zuñiga, a mi padre Marco Antonio García y a mi familia, ya que siempre he contado con su amor y apoyo incondicional, por eso, este logro lo comparto con cada uno de ellos esperando llenarlos de orgullo.*

*A mis hermanos, Estefany, Ricardo y Mariel, quienes me han enseñado a enfrentar y superar cualquier obstáculo por grande que éste sea.*

*Agradezco a todas aquellas personas que han dejado huella en mi vida, a mis amigos, mis colegas, en especial a Daniela Mariel, quien es parte importante de mi vida y de mi trabajo, gracias por tu apoyo y cariño. Es un verdadero placer, haber conocido a cada una de las personas que han sido en algún momento, parte de mi vida.*

*Este trabajo también esta dedicado a aquellas personas que estén interesadas en realizar investigación en México, esperando les inspire, como yo he sido inspirado por el trabajo profesional del Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, la Dra. Leslie Chávez Galán, la Dra. Patricia Gorocica Rosete, Ana Luisa López-Bago Martínez, entre muchas otras personas cuyos nombres están incluidos por el simple hecho de compartir la misma pasión.*

*Gracias a todos mis profesores, quienes siempre demostraron ser profesionales en su área, por ello, estoy orgulloso de haber cursado la carrera de Biología en la Facultad de Ciencias, gracias a ti UNAM.*

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
ASMA .....	6
SISTEMA INMUNE .....	7
ALERGIA E HIPERSENSIBILIDAD.....	9
<i>Sensibilización</i> .....	10
<i>Fase tardía</i> .....	12
MOLÉCULAS DE COESTIMULACIÓN.....	13
CD30 Y CD153.....	14
RELEVANCIA DE CD30 Y CD153 EN ALERGIA .....	14
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>16</b>
<b>IV. OBJETIVO .....</b>	<b>16</b>
GENERAL.....	16
PARTICULAR.....	16
<b>V. GRUPO DE ESTUDIO.....</b>	<b>16</b>
GRUPOS DE ESTUDIO.....	16
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	16
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	17
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	17
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>X. REFERENCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>XI. ABREVIATURAS .....</b>	<b>38</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>39</b>

## RESUMEN

**Introducción.** El asma alérgica es un padecimiento crónico catalogado como un problema de salud a nivel mundial. Se caracteriza por la hiperreactividad, obstrucción reversible e inflamación de las vías aéreas, que es desencadenada en respuesta inmunitaria contra diferentes antígenos ambientales.

**Antecedentes.** Se ha evidenciado en modelo murino, que la expresión de las moléculas CD30 y su ligando (CD153), están involucradas en la respuesta inflamatoria bronquial, a su vez, en pacientes asmáticos, se han detectado en circulación sanguínea linfocitos T que expresan CD30. La literatura reporta que el suero de pacientes asmáticos contiene CD30 soluble (CD30s), y que su concentración en éste se relaciona con la gravedad de la enfermedad. Además se ha descrito que sCD30 se une con facilidad a su ligando en membrana. Un estudio en nuestro laboratorio sugiere que los sueros con sCD30, inhiben la proliferación *in vitro* de linfocitos B estimulados con fitohemaglutinina (PHA).

**Objetivo.** Evaluar el efecto del suero con CD30 soluble sobre la expresión de CD30 y CD153 en linfocitos T y B activados de personas asmáticas. **Material y Métodos.** Se utilizó sangre heparinizada de 9 pacientes con asma y de 4 personas sanas; a partir de ésta y mediante el uso de Fycoll-hypaque, se aislaron las células mononucleadas, las cuales se estimularon con PHA en presencia de sueros con CD30s durante 72 horas de cultivo. Posteriormente, las células fueron analizadas en citometría de flujo mediante triple inmunofluorescencia, con el uso de anticuerpos contra CD3, CD19, CD30 y CD153. **Resultados.** Los linfocitos T y B de personas sanas expresan mayores niveles de CD30 y CD153 cuando son sometidos a cultivo con PHA respecto a pacientes asmáticos. **Conclusión.** La expresión de CD30 y de CD153 es inducida por PHA. Además se observó que las personas sanas, expresan mayores porcentajes de CD30 y CD153 postcultivo. Los sueros con sCD30, no afectan la expresión *In Vitro* de CD30 y CD153 sobre linfocitos T y B.

## I. INTRODUCCIÓN

### *Asma*

La iniciativa global para el asma (GINA, por sus siglas en inglés), lo cataloga como un problema de salud a nivel mundial, ya que cerca de 300 millones de individuos son asmáticos y la tasa de mortandad anual alcanza los 250 mil decesos<sup>1</sup>. En México se calcula que del 4% al 12% de la población padece asma, y que cada año, se presentan 600 mil consultas además de atender 270 mil casos de urgencia con este diagnóstico, ocasionando pérdidas a la economía ya que, por un lado, son debidas a la inversión en atención médica y por otro, en la disminución de la productividad de los pacientes<sup>2</sup>. Por ello, el estudio de esta patología es importante para obtener nuevos blancos terapéuticos que la contrarresten o mitiguen.

La patogenia del asma alérgica está determinada por factores del individuo como son: edad, sexo, obesidad, predisposición genética, así como por factores ambientales, principalmente la exposición a alérgenos como el polen, moho, veneno de insectos, partículas fecales de ácaros del polvo doméstico<sup>1</sup>. Con base en su etiología, se han descrito diferentes tipos de asma como la alérgica o extrínseca y la no alérgica o intrínseca<sup>3</sup>, clasificadas de acuerdo con su gravedad y patrón de limitación de flujo de aire [Tabla 1]. Aunque hay diferentes formas de asma reconocidas clínicamente, la investigación en las últimas dos décadas ha girado en torno al de tipo alérgica<sup>3</sup>.

El asma alérgica se caracteriza por la hiperreactividad de las vías aéreas, el reclutamiento eosinofílico en epitelio mucoso de las mismas, así como la hipersecreción de moco y la alta concentración sérica de Inmunoglobulina (Ig) E<sup>4-6</sup>.

Tabla 1. Clasificación de gravedad del asma de acuerdo al tipo de frecuencia y síntomas asmáticos

Frecuencia de síntomas asmáticos	Grave persistente	Moderado persistente	Medio Persistente	Intermitente
<b>Día</b>	3 veces/día	Todos los días ( $\leq 2$ veces /día)	$\geq 2$ veces /semana	$< 2$ veces/semana
<b>Noche</b>	Todas las noches / la mayoría de las noches	$\geq 2$ veces/semana	$\geq 2$ veces/mes	$< 2$ veces/mes
<b>Episodios severos en los últimos 12 meses</b>	Todos los días	Todos los días	$\geq 2$ veces/semana	$\leq 1$ vez/semana
<b>Síntomas inducidos por ejercicio en los pasados 12 meses</b>	Todos los días	Todos los días	$\geq 2$ veces/semana	$\leq 1$ vez/semana
<b>Frecuencia de síntomas durante una semana típica</b>	8-21 veces/semana	7-20 veces/semana	3-6 veces/semana	$\leq 2$ veces/semana

Tomada de: the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2012

## ***Sistema Inmune***

El sistema inmune es el encargado de eliminar a los microorganismos que ingresan al cuerpo, involucra varios tipos celulares como los linfocitos (T y B), células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B), granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos), así como de células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas)<sup>7,8</sup>.

Los linfocitos B (CD19<sup>+</sup>)<sup>a</sup> producen anticuerpos que reconocen y eliminan antígenos de microorganismos o de partículas extrañas que entran al organismo. A su vez, los linfocitos B también son células presentadoras de antígeno, ya que pueden internalizarlo, fragmentarlo y presentarlo a través de Moléculas del Complejo de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, hacia los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) específicos del mismo antígeno<sup>7,8</sup>, estos últimos se clasifican en dos subpoblaciones de acuerdo a la expresión en la superficie de CD4 o CD8.

La subpoblación CD4<sup>+</sup>, denominada cooperadora, controla la respuesta inmune frente a antígenos, induce la producción de anticuerpos en linfocitos B, a su vez recluta a otros tipos celulares como macrófagos, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos<sup>9,10</sup>. Al ser activados los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pueden diferenciarse en varios linajes de células T cooperadoras con base en su producción de citocinas. Por ejemplo, al activarse la subpoblación de linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), predomina la producción de Interleucina 2 (IL-2), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y Factor beta de necrosis tumoral (TNF- $\beta$ )<sup>11</sup>; mientras que en la subpoblación Th2 predominan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13<sup>4,12</sup>. Existen otras subpoblaciones como los linfocitos Th17, caracterizados por la producción

---

<sup>a</sup> En las membranas celulares se expresan diversas proteínas importantes en la interacción, activación y de regulación celular en procesos inmunitarios. A estas proteínas se les asignó el prefijo CD (*cluster of differentiation*) seguido de un número, el cual las identifica de acuerdo al tipo celular donde se expresan o bien por sus funciones; estas proteínas pueden ser constitutivas de algún tipo celular, a su vez pueden ser adquiridas o perderse a lo largo del proceso de maduración o activación de las mismas.

de IL-17 e IL-22<sup>9</sup>. En las enfermedades alérgicas, las citocinas que predominan son producidas por la subpoblación Th2 y los antígenos son denominados alérgenos.

La subpoblación CD8<sup>+</sup> denominada citotóxica<sup>13</sup>, es importante en la eliminación de virus, bacterias y parásitos intracelulares. Ésta se realiza mediante la unión del fragmento peptídico del antígeno patogénico, al MHC de clase I de la célula infectada, mismo que es reconocido por el TCR de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> quienes inducen la muerte celular de células infectadas.

Los mastocitos, basófilos y eosinófilos son células efectoras centrales en enfermedades alérgicas, ya que expresan receptores de unión de alta afinidad para cadenas pesadas épsilon (FcεRI) en mastocitos y basófilos, así como receptores de baja afinidad (FcεRII) para eosinófilos. Los receptores de alta afinidad se unen fácilmente a la inmunoglobulina E (IgE)<sup>15</sup>, mientras que los de baja afinidad se unen cuando la IgE ya está unida al antígeno.

Los mastocitos se localizan principalmente en asociación con vasos sanguíneos, y sobre tejido conectivo de glándulas mamarias, lengua, próstata, pulmones y peritoneo<sup>16</sup>. Expresan el receptor FcεRI, por lo que son afines de unir IgE sobre su superficie. Cuando se activan a través del receptor FcεRI, liberan mediadores preformados como histamina, serina proteasas (tripsasas y quimasas), carboxipeptidasa A y proteoglicanos almacenados en sus gránulos citoplasmáticos, además liberan TNF-α<sup>17,18</sup>.

Los basófilos producen citocinas propias del perfil Th2, comparten características de mastocitos, incluyendo la expresión del receptor FcεRI y la liberación de histamina después de su activación<sup>18</sup>, ésta es el mayor mediador preformado almacenado en sus gránulos. Además son productores de leucotrienos (LT) como: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, los cuales son potentes broncoconstrictores y responsables de incrementar la permeabilidad vascular.

En eosinófilos, su crecimiento y diferenciación se debe al efecto de la IL-5. La eosinofilia en sangre y tejido, es un marcador de infección helmíntica y alergia (como asma)<sup>18</sup>. Durante la inflamación, este tipo celular presente en circulación sanguínea, migra hacia la mucosa nasal y bronquial en respuesta a quimiocinas como RANTES (CCL5) y eotaxina. Ambas quimiocinas son

producidas por linfocitos T activados y células epiteliales de vías aéreas respectivamente, las cuales actúan sobre el receptor CCR3 expresado en eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2<sup>7,17</sup>. Los eosinófilos liberan mediadores proinflamatorios como proteínas catiónicas, citocinas y leucotrienos<sup>7,17-20</sup>.

### ***Alergia e Hipersensibilidad***

El término alergia, se define como una reacción patológica de la respuesta del sistema inmune activado contra un antígeno, el cual puede ser inocuo para el organismo debido a que no provoca daño tisular inherente a su estructura molecular<sup>21</sup>. A este tipo de respuesta inmunitaria se le conoce como de hipersensibilidad. De acuerdo con Coombs y Gell, las reacciones de hipersensibilidad se clasifican en cuatro tipos, las cuales se distinguen por los diferentes tipos de antígenos que reconocen y las clases de anticuerpos involucrados (Ilustración 1).

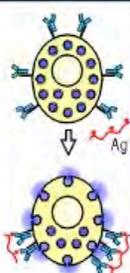
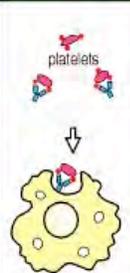
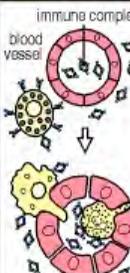
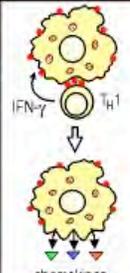
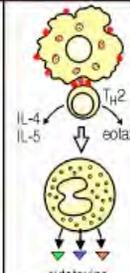
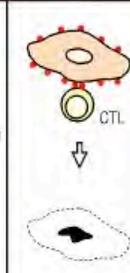
	Type I	Type II	Type III	Type IV		
<b>Immune reactant</b>	IgE	IgG	IgG	T <sub>H</sub> 1 cells	T <sub>H</sub> 2 cells	CTL
<b>Antigen</b>	Soluble antigen	Cell- or matrix-associated antigen	Soluble antigen	Soluble antigen	Soluble antigen	Cell-associated antigen
<b>Effector mechanism</b>	Mast-cell activation	FcR <sup>+</sup> cells (phagocytes, NK cells)	FcR <sup>+</sup> cells Complement	Macrophage activation	Eosinophil activation	Cytotoxicity
						
<b>Example of hypersensitivity reaction</b>	Allergic rhinitis, asthma, systemic anaphylaxis	Some drug allergies (e.g., penicillin)	Serum sickness, Arthus reaction	Contact dermatitis, tuberculin reaction	Chronic asthma, chronic allergic rhinitis	Contact dermatitis

Ilustración A. Tomada de Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Chapter 12, Allergy and Hypersensitivity.

El asma está clasificada como una reacción de hipersensibilidad de tipo I porque es una enfermedad mediada principalmente por la IgE. El asma alérgica se desarrolla en dos etapas, la primera etapa es llamada de sensibilización, la cual identificará al antígeno ambiental y generará memoria para reaccionar rápidamente y con más fuerza en un segundo encuentro o fase tardía<sup>21</sup>.

### **Sensibilización**

La respuesta inmunitaria en enfermedades alérgicas de vías respiratorias, inicia cuando un antígeno ambiental entra al tracto respiratorio y es capturado en el epitelio de las vías aéreas, ya sea por células dendríticas o por macrófagos que migran hacia los ganglios linfáticos mientras internalizan, procesan y fragmentan al antígeno para ser presentado en su superficie por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, hacia los receptores de linfocitos T (TCR) CD4<sup>+</sup> específicos del mismo antígeno<sup>7</sup>.

Para el reconocimiento específico del antígeno, se requiere de la interacción de moléculas de coestimulación, tanto de la célula que presenta al antígeno, como de la célula que lo reconoce. En este sentido, cuando las moléculas CD22, CD40 y CD80/CD86, que están en las células presentadoras de antígeno, interactúan respectivamente con CD45, CD40L y CD28 expresadas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes<sup>7,21</sup>, se favorece la activación recíproca de ambos tipos celulares para una adecuada presentación antigénica, misma que provoca expansión clonal<sup>24</sup>.

La siguiente etapa de la respuesta alérgica sucede con la interacción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos B por medio de la presentación de antígeno y la unión de moléculas de coestimulación. El reconocimiento del epítipo específico del antígeno entre el receptor de linfocito T (TCR) con el fragmento peptídico asociado al MHC de clase II del linfocito B, induce en linfocitos T CD4<sup>+</sup> su activación y producción de distintas moléculas solubles como IL-2, IL-4, IL-13<sup>24</sup>, prolactina, hormona de crecimiento<sup>7,8</sup>, entre otras, las cuales son factores importantes de desarrollo y diferenciación para los linfocitos T y B activados<sup>24</sup>. Los linfocitos B, al ser activados mediante la cooperación del linfocito T CD4<sup>+</sup>, se dividen, por lo que la descendencia sigue dos vías: la primera

convierte una población de linfocitos B en células plasmáticas productoras de IgM (células efectoras), mientras que otra población es convertida en linfocitos B de memoria. A su vez, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> también siguen estas dos vías, generando una subpoblación de linfocitos diferenciados (efectores) y otra subpoblación de linfocitos T de memoria. Cabe mencionar que las células plasmáticas y los linfocitos T efectores, son células terminalmente diferenciadas que pierden la capacidad de activarse y sufrir división celular<sup>25</sup>. Con respecto a los linfocitos de memoria generados por activación antigénica, pueden volver a interactuar entre ellos inducidos por antígenos y después de su activación, generar nuevamente linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores y células plasmáticas, así como linfocitos de memoria de ambas estirpes celulares. Durante esta interacción, el linfocito T CD4<sup>+</sup> de memoria promueve el cambio de isotipo de inmunoglobulina de superficie en el linfocito B de memoria. Para que cambie la IgM a IgE de superficie se requiere que contacte el CD40L del linfocito T CD4<sup>+</sup> con el CD40 del linfocito B en un microambiente rico en IL-4<sup>8</sup>.

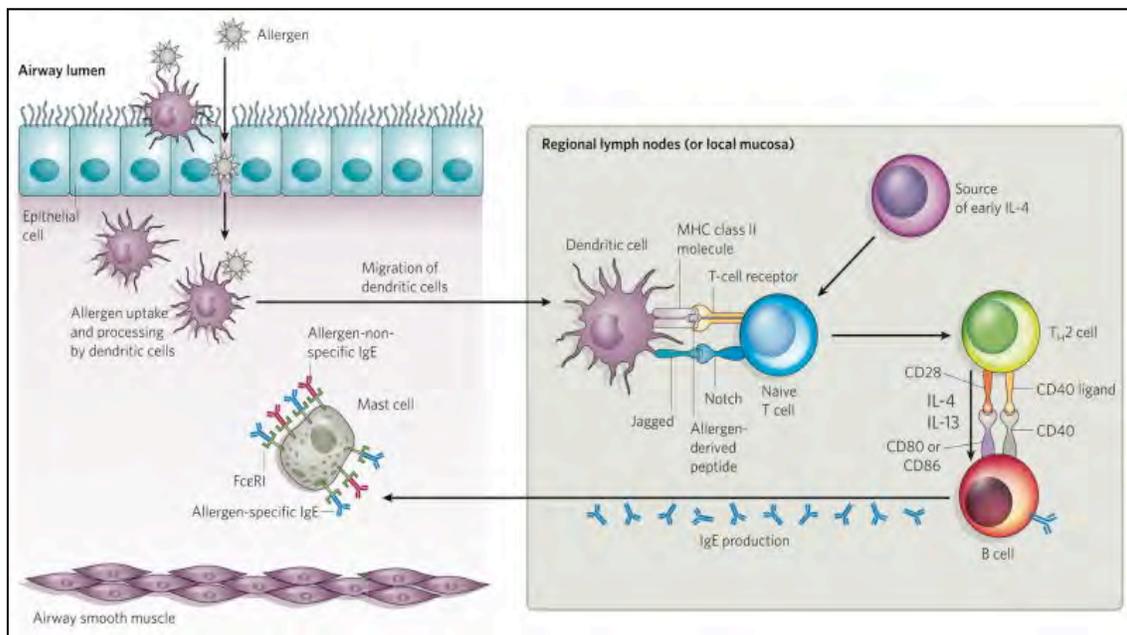


Ilustración 2. Proceso de sensibilización. Tomada directamente de Nature. 2008 July 24; 454(7203).

La IgE sintetizada por las células plasmáticas en ausencia de su antígeno, se une fácilmente a los receptores de membrana de alta afinidad FcεRI presentes en mastocitos (en tejido conectivo) y basófilos (en sangre), sensibilizando al individuo<sup>15,19</sup>. El antígeno también puede ser atrapado por la IgE soluble (que no está unida a las células) y formar complejos inmunitarios que se unen a los receptores de baja afinidad (FcεRII o CD23) presentes en los eosinófilos.

Aunque la IgE es una inmunoglobulina que se produce en respuesta inmune contra parásitos y células neoplásicas<sup>7,8,26</sup>, algunos antígenos ambientales (alérgenos) son capaces de inducir su síntesis, por lo que es considerada el factor principal de las enfermedades alérgicas de vías respiratorias<sup>12</sup>.

### **Fase tardía**

En un segundo contacto del individuo con el alérgeno específico, se activan las células sensibilizadas con la IgE (mastocitos y basófilos), induciendo la degranulación masiva de su contenido<sup>17,19</sup>. La degranulación ocurre por el entrecruzamiento de los receptores FcεRI de mastocitos y basófilos activados por IgE, generando señales intracelulares en los mastocitos de la mucosa<sup>15</sup>, que conllevan a la liberación de mediadores de inflamación como histamina, prostaglandinas, leucotrienos y proteasas<sup>20,27</sup>. La histamina es parcialmente responsable de la permeabilidad endotelial, del edema en las vías aéreas y de broncoconstricción; las prostaglandinas actúan sobre músculo liso como vasodilatador y broncoconstrictor, mientras que las proteasas causan daño a células epiteliales produciendo su descamación y activación<sup>20</sup>. A su vez en los eosinófilos, el mecanismo ocurre cuando la unión del complejo inmunitario de la IgE con el antígeno, es reconocido por el receptor FcεRII, induciendo la liberación de enzimas lisosomales que actúan sobre el tejido circundante<sup>18</sup>. Los eosinófilos, contienen gránulos acidófilos que a su vez, contienen proteína básica mayor (MBP), proteína catiónica del eosinófilo (ECP), peroxidasa del eosinófilo (EPO), neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), fosfatasa ácida y arilsulfatasa. Los eosinófilos son capaces de sintetizar citocinas como IL-3, IL-5, factor estimulador de colonias de

granulocitos y monocitos (GM-CSF), eotaxina y óxido nítrico<sup>18</sup>. Además, sintetizan leucotrienos (LT) como LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> y PAF, quienes promueven la secreción de moco, alteran la permeabilidad capilar, promueven la contracción del músculo liso e inducen la producción de radicales libres del oxígeno causantes de daño al tejido celular<sup>7,17,19,20</sup>.

Cabe mencionar que en el epitelio de las vías aéreas se encuentran las células caliciformes, principales productoras de moco; es aquí donde la IL-13 juega un papel importante durante la hipersecreción de moco, ya que incrementa la producción de mucinas, las cuales son liberadas de la célula por exocitosis sobre el epitelio, dificultando la función respiratoria<sup>17,28</sup>. Por lo tanto, la liberación del contenido de los gránulos de los tipos celulares antes mencionados, así como la producción de citocinas, genera inflamación de las superficies mucosas, que interfiere con la función respiratoria.

En la respuesta inmune, la comunicación celular es importante en los procesos de supervivencia, división, diferenciación, activación y muerte celular. Ésta se da a partir de mensajeros como las hormonas e interleucinas que emiten señales químicas<sup>22</sup>. Además, existen proteínas capaces de acelerar y mejorar la activación celular, denominadas moléculas de coestimulación.

### ***Moléculas de Coestimulación***

Las principales moléculas de coestimulación incluyen a miembros de las familias del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y B7, entre ellas destacan CD28 y CD80/86 respectivamente, responsables de la activación de linfocitos T<sup>29</sup>. Cada molécula de coestimulación tiene un papel importante durante el desarrollo de la respuesta inmune. Nuestro trabajo se enfoca en las moléculas de coestimulación CD30 y CD153, presentes en los linfocitos T y B respectivamente<sup>30</sup>. Estas moléculas tienen un efecto positivo en el desarrollo de una respuesta de tipo Th2<sup>31</sup>, además estas moléculas se relacionan con el desarrollo de enfermedades, como linfomas de tipo Hodgkin, VIH, esclerosis sistémica, rinitis alérgica y asma.

### **CD30 y CD153**

El CD30 es una glicoproteína transmembranal de tipo 1 y pertenece a la superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR)<sup>30</sup>. Inicialmente fue utilizada como marcador para identificar clonas de linfocitos T diferenciadas a Th2<sup>11,32</sup>. Sin embargo, se ha reportado que el CD30 se expresa tanto en linfocitos T como en B<sup>11,30</sup>; en las primeras células se ha asociado a enfermedades como la dermatitis atópica, artritis reumatoide, esclerosis sistémica, asma y en linfomas tipo Hodgkin<sup>30,31</sup>. También se ha descrito el CD30 puede ser escindido de la membrana por la enzima de conversión de TNF- $\alpha$  (TACE)<sup>33</sup>, una metaloproteasa que lo libera a su forma soluble (sCD30)<sup>34,35</sup>, la cual, a diferencia de otras proteínas solubles que también pertenecen a la superfamilia TNFR, se une a su ligando con alta afinidad<sup>36</sup>.

La molécula CD153 es una glicoproteína de membrana de tipo 2 perteneciente también a la superfamilia TNFR y, al igual que CD30, suele expresarse en linfocitos T, así como en linfocitos B activados<sup>30,37</sup>, también ha sido detectada en células epiteliales, mastocitos, eosinófilos y neutrófilos<sup>35,38</sup>. Se ha descrito que la interacción CD30/CD153 es importante en el desarrollo de enfermedades como asma, diabetes, infecciones micobacterianas e inflamación alérgica<sup>34</sup>. Por otro lado, TNFR y TNF juegan un papel importante en la regulación del crecimiento, diferenciación y muerte celular programada en varios sistemas biológicos, incluida el área inmunológica<sup>39</sup>.

### **Relevancia de CD30 y CD153 en alergia**

El primer estudio que relacionó la molécula CD30 con el asma fue de Leonard y colaboradores<sup>31</sup>, quienes mostraron que la expresión de CD30 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con asma alérgica, puede ser inducida con el alérgeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) o con el mitógeno Fitohemaglutinina (PHA) en presencia de IL-2. Posteriormente, Molly Gilfillan encontró que la expresión de CD30 en linfocitos T también puede ser inducida con IL-4<sup>40</sup>. En el año 2006, Garfias y colaboradores encontraron que los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup> son productores de IL-4 e IL-5 después de 7 días de cultivo bajo estimulación constante de *Der p*<sup>5</sup>.

Fue hasta los estudios de Polte y colaboradores<sup>37</sup>, que se demostró la relevancia de la molécula CD30 en el proceso inflamatorio característico de las enfermedades alérgicas; estos autores utilizaron ratones C57BL/6 alérgicos a la ovoalbúmina (OVA) y modificados genéticamente para que no expresaran CD30 (ratones CD30 *knockout*). Cuando estos ratones fueron retados con OVA, no desarrollaron la inflamación pulmonar ni reclutamiento eosinofílico, en comparación con lo observado en ratones sensibilizados con OVA que podían expresar CD30.

De la misma manera, Fuchiwaki y colaboradores<sup>34</sup>, mostraron que el ligando de CD30 (CD153) tiene un papel similar al de CD30; los autores utilizaron la misma cepa de ratones pero ahora deficientes de CD153. Cuando éstos fueron retados con OVA, los resultados mostraron que tanto los síntomas de alergia como la infiltración eosinofílica dentro de la mucosa nasal y la producción de IgE, fueron significativamente menores que en los ratones sensibles a la OVA que expresan CD153. Ambos autores dejaron en claro que la expresión de CD30 o CD153 repercute directamente en el desarrollo de los síntomas propios de alergia.

Estudios recientes como el de Remes, han encontrado una mayor concentración en suero de sCD30 de niños asmáticos en comparación con niños sanos<sup>31,41,42</sup>. Estos niveles séricos de sCD30 fueron relacionados con la gravedad del asma bronquial por Heshmat y colaboradores<sup>41</sup>.

## II. ANTECEDENTES

Un estudio preliminar en el laboratorio mostró que sueros de pacientes asmáticos contienen altos niveles de sCD30 (>1Unidades Internacionales), mismos que concuerdan con otras publicaciones<sup>41,42</sup>, cuando estos sueros fueron adicionados a un cultivo de células mononucleadas estimuladas con PHA, se observó una disminución significativa en la proliferación de linfocitos B. Además, se ha descrito que la concentración de sCD30 en el suero se correlaciona con la gravedad de la enfermedad<sup>41</sup>; también se sabe que esta molécula soluble interacciona con gran afinidad a su ligando de membrana<sup>35</sup>.

Se ha observado que moléculas de membrana como CD80 y B7/H3 en su forma soluble modulan su expresión membranal en linfocitos T<sup>43,44</sup>. Por lo tanto, es posible sCD30 al unirse a su ligando de membrana (CD30L) aumente la expresión de la forma membranal de ambas moléculas.

### **III. HIPÓTESIS**

En pacientes con asma alérgica, el CD30 soluble aumenta la expresión de los receptores de membrana CD30 y CD153 sobre linfocitos T y B en cultivo activados con el mitógeno fitohemaglutinina<sup>43,44</sup>.

### **IV. OBJETIVO**

#### ***General***

Evaluar el efecto de CD30 soluble en la expresión de los receptores CD30/CD153 de linfocitos T y B.

#### ***Particular***

Observar las diferencias de expresión tanto de CD30 y CD153 en ambos grupos de estudio en ausencia de sCD30.

### **V. GRUPO DE ESTUDIO**

El trabajo de investigación fue de tipo experimental.

#### ***Grupos de estudio***

Se incluyeron 9 pacientes con cuadro clínico de asma moderado. El grupo control incluyó a 4 individuos no alérgicos, asintomáticos y sin morbilidades, que presentaron además una eosinofilia <0.5% y un nivel de IgE sérica menor a 100 UI/mL.

#### ***Criterios de inclusión***

Los pacientes fueron captados de la consulta externa del servicio de alergia del Hospital 1° de octubre del ISSSTE.

1. Pacientes de cualquier género de diagnóstico reciente

2. Asma moderado persistente según la clasificación de GINA (episodios diarios que afectan la actividad)
3. Edades entre 8 y 15 años
4. Con IgE sérica elevada mayor a 300 UI/ml
5. Eosinófilos igual o mayor al 5% en sangre y/o moco nasal
6. Coproparasitoscópico negativo

#### ***Criterios de exclusión***

1. Asma severo persistente
2. Pacientes que presenten: inmunodeficiencias, enfermedades metabólicas, enfermedades tumorales o autoinmunidad.

#### ***Criterios de eliminación***

1. Muestra sanguínea insuficiente
2. Coproparasitoscópico positivo

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

**Reactivos.** Los anticuerpos monoclonales de ratón IgG1 $\kappa$  contra moléculas humanas anti-CD3 conjugado al complejo de peridina y clorofila con cianina 5.5 (PerCPCy5.5), anti-CD19 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD30 conjugado a ficoeritrina (PE), anti-CD153-PE y los anticuerpos controles de isotipo IgG1  $\kappa$ , conjugados a PerCPCy5.5, FITC o a PE fueron adquiridos de BioLegend (San Diego, CA, USA). El medio de cultivo RPMI 1640, HEPES, azul de tripano, paraformaldehído, albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, azida de sodio, cloruro de potasio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio y la Fitohemaglutinina (PHA) fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA); piruvato de sodio y L-

glutamina fueron adquiridos de Gibco BRL (Rockville, MD, USA), la solución de penicilina/estreptomina y la gentamicina fueron de In Vitro (México D.F.), el suero fetal bovino fue de Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA) y el ficoll (Lymphoprep) a densidad de 1.077 fue de Axis-Shield PoC As (Oslo, Noruega).

**Células.** Se utilizaron 15 mL de sangre venosa de individuos de ambos grupos de estudio. Se aislaron las células mononucleadas en condiciones de esterilidad y mediante centrifugación a 1700 rpm sobre Lymphoprep por 30 min a 16°C, a partir de la muestra sanguínea heparinizada<sup>45</sup>. Posteriormente, las células se colectaron de la interfase y se lavaron 2 veces mediante centrifugación con solución amortiguadora salino fosfato pH 7.2 (PBS) a 1500 rpm/10 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células en PBS cada vez. Luego, las células fueron cuantificadas en una cámara de Neubauer (hemocitómetro) y la viabilidad celular fue valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripano.

**Titulación de mitógeno y anticuerpos.** Se estandarizó la dosis óptima del mitógeno Fitohemaglutinina (PHA). Para obtener la dosis óptima de mitógeno, previamente se realizó una curva dosis-respuesta utilizando desde 1µg/mL hasta 20 µg/mL de dicha lectina. La dosis óptima fue de 1 µg (10 µl diluido 1:10 en medio de cultivo) para 2x10<sup>5</sup> células. De igual manera se estandarizó la dosis óptima de anticuerpos para 2x10<sup>5</sup> células, las curvas dosis-tinción utilizó 1µg/mL 5µg/mL 10 µg/mL hasta 20µg/mL. Las dosis óptimas fueron de 2µl, 3µl, 5µl y 10µl para los anticuerpos conjugados a CD3, CD19, CD30 Y CD153 respectivamente, utilizando la misma cantidad para sus controles de isotipo.

**Sueros de pacientes conteniendo sCD30.** Los sueros con sCD30 fueron recolectados en el Hospital 1° de Octubre del ISSSTE, bajo autorización por consentimiento informado. Para detectar el contenido de sCD30 se realizó un ELISA tipo emparejado de los sueros provenientes de pacientes

asmáticos. Los sueros se clasificaron de acuerdo a su concentración, en donde los superiores a 1.000 (1 UI) fueron los de mayor concentración y los inferiores a 1 UI los de menor concentración. Se utilizó 10 µL por pozo en cultivo [2ng] para alta concentración y [.4ng] para baja concentración.

**Cultivo celular.** Se cultivaron  $2 \times 10^5$  células mononucleadas por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos, suspendidas en 200µL de medio RPMI-1640 suplementado (1 mL de piruvato de sodio, 1 mL de *L*-glutamina, 10 mL de solución con penicilina/estreptomicina, 100µL de gentamicina y 10 mL de suero fetal bovino inactivado por calor), estimulando con la dosis óptima de PHA en presencia o ausencia de 10 µL de suero con alta o baja concentración de CD30 sérico durante 72 horas en una incubadora húmeda a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

**Inmunofluorescencia.** Para identificar el fenotipo de las células mononucleadas expresando CD30 y CD153 antes y después del cultivo celular, se realizó triple inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpos monoclonales conjugados a PE contra CD30 y CD153, PerCP-Cy5.5 contra CD3 y anticuerpos conjugados a FITC contra CD19. Se suspendieron  $2 \times 10^5$  células mononucleadas (recuperadas del cultivo) en PBS-A (0.2% de azida de sodio y 0.2% de albúmina sérica bovina en PBS) y se incubaron con cada anticuerpo por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavaron (centrifugando a 1200 rpm y descartando sobrenadante) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se utilizaron como control negativo otras células incubadas con los controles de isotipo conjugados a PE, PerCP-Cy5.5 o a FITC.

**Citometría de flujo.** Las células se lavaron con PBS-A y después con la solución salina para el citómetro (FACSflow); para su análisis, se utilizó un citómetro Becton & Dickinson (BD Biosciences, San Jose, CA) con software Cell Quest y posteriormente con el software FlowJo versión 8.7 de Tree Star Inc. (Ashland, OR, USA). Luego de obtener 10,000 células en el citómetro, se graficó tamaño contra granularidad, en la cual se delimitó la región de linfocitos. Una vez

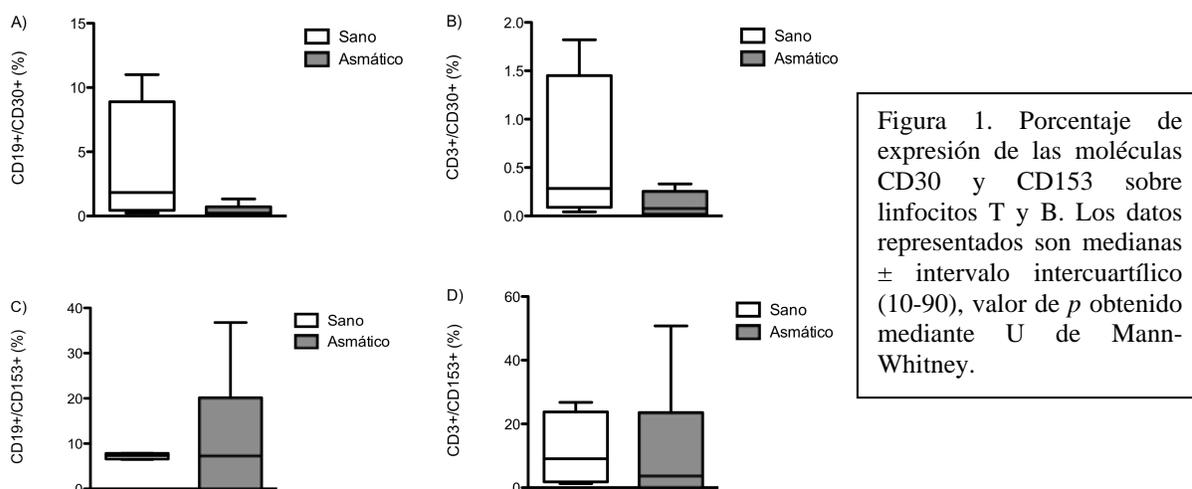
seleccionada la región de linfocitos, se graficó tamaño contra FL-1, FL-2 y FL-3, con el fin de delimitar los controles negativos para identificar posteriormente las moléculas positivas. Una vez marcadas las regiones ideales, se graficó FL-1 vs FL-2 y FL-3 vs FL-2.

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos fueron analizados mediante Graphpad PRISM™ 5.0a (La Jolla, CA, USA) usando una prueba de Shapir-Wilk para valorar la distribución de las poblaciones celulares. Para las variables distribuidas asimétricamente se utilizó la prueba de “U” de Mann-Whitney. Una  $P < 0.05$  se tomó como diferencia estadísticamente significativa.

## VII. RESULTADOS

### 1.- Expresión basal de CD30 y CD153 sobre linfocitos T y B en sanos y pacientes con asma

La expresión basal de la molécula CD30 sobre linfocitos B en personas sanas fue de 1.83% contra 0.24% registrado en individuos asmáticos (Fig.1 panel A), mientras que en linfocitos T fue de 0.28% y 0.07% (Fig.1 panel B). Por otra parte, la expresión de CD153 en linfocitos B fue de 7.34% vs 7.3% (Fig.1 panel C), mientras que en los linfocitos T se registró una expresión de 9.06% contra 3.7% (Fig.1 panel D). No hay diferencias significativas en el porcentaje de expresión basal de CD30 y CD153 sobre linfocitos T y B entre personas sanas y asmáticas.



Cuadro 1. Expresión basal de CD30, CD153 en células CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>

Población	Sano (n=4)	Asmático (n=9)	Valor de <i>P</i>
<b>CD19<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup></b>	1.83	0.24	No significativo
<b>CD3<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup></b>	0.28	0.07	No significativo
<b>CD19<sup>+</sup>/CD153<sup>+</sup></b>	7.34	7.3	No significativo
<b>CD3<sup>+</sup>/CD153<sup>+</sup></b>	9.06	3.7	No significativo

### 2.- Expresión de CD30 y CD153 sobre linfocitos T y B postcultivo en personas sanas y pacientes con asma

En personas sanas, el porcentaje de expresión de CD30 sobre linfocitos B después de cultivo en presencia de sueros con 2ng de concentración sérica de sCD30 fue de 27.45%, mientras que en

presencia de sueros con 0.4ng de concentración sérica de sCD30 fue de 25%, ambas expresiones fueron similares a la condición sin suero que fue de 24% (Fig.2 panel A). Por otro lado, en personas con asma el porcentaje de expresión registrado para 2ng de sCD30 fue de 5.53%; mientras que para 0.4ng fue de 5.95%; la condición sin suero obtuvo un valor de 5.68% (Fig.2 panel B). No se encontraron diferencias estadísticas para ninguna condición.

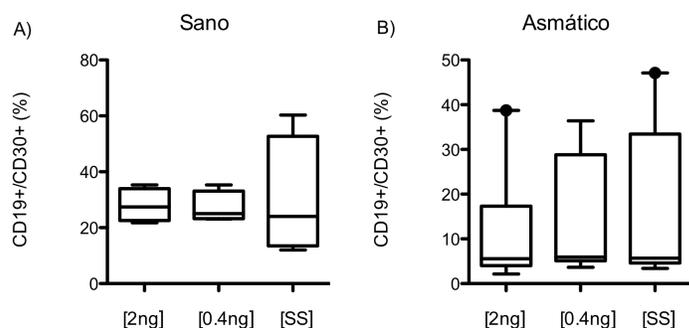


Figura 2. Porcentaje de expresión de la molécula CD30 sobre linfocitos B en personas A) sanas y B) asmáticas.

Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

El porcentaje de expresión de CD30 sobre linfocitos T en personas sanas post cultivo, resultó ser de 27.45% para la condición con 2ng de sCD30, mientras que para 0.4ng fue de 20.75%, para la condición sin suero se registró un total de 40.95% de expresión (Fig.3 panel A). En asmáticos, el porcentaje de expresión para 2ng y 0.4ng fue de 3.19% y 4.06% respectivamente, las cuales fueron menores respecto a la condición sin suero que resultó ser de 7.55% (Fig.3 panel B). No se encontraron diferencias estadísticas en ambos grupos.

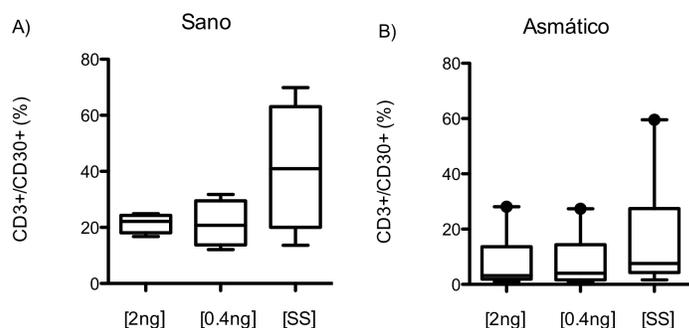


Figura 3. Porcentaje de expresión de la molécula CD30 sobre linfocitos T en personas A) sanas y B) asmáticas.

Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

Por otro lado, el porcentaje de expresión de CD153 en individuos sanos sobre linfocitos B después de cultivo tanto para 2ng y 0.4ng de sCD30 fueron de 54.6% y 61%, siendo éstos mayores respecto a la condición control la cual fue de 49.8% (Fig.4 panel A). Del mismo modo, en pacientes asmáticos, la expresión para 2ng y 0.4ng resultó ser de 21.5% y 27.4% respectivamente, la condición control resultó en un 32.7% (Fig.4 panel B). Tampoco existieron diferencias significativas.

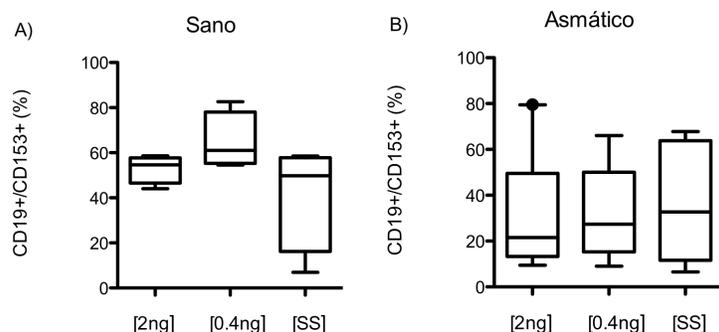


Figura 4. Porcentaje de expresión de la molécula CD153 sobre linfocitos B en personas A) sanas y B) asmáticas. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

En individuos sanos, el porcentaje de expresión de CD153 postcultivo sobre linfocitos T, resultó ser de 47.65% y 49.25% para 2ng y 0.4ng de concentración sérica de sCD30 respectivamente, mientras que la condición sin suero fue de 68.3% (Fig.5 panel A). En personas asmáticas, el porcentaje de expresión de CD153 sobre linfocitos T postcultivo, fue de 18.7% y 17.9% para 2ng y 0.4ng respectivamente, mientras que la condición sin suero marcó un total de 25.4% (Fig.5 panel B). No hay diferencias representativas en la expresión de CD153 sobre linfocitos T.

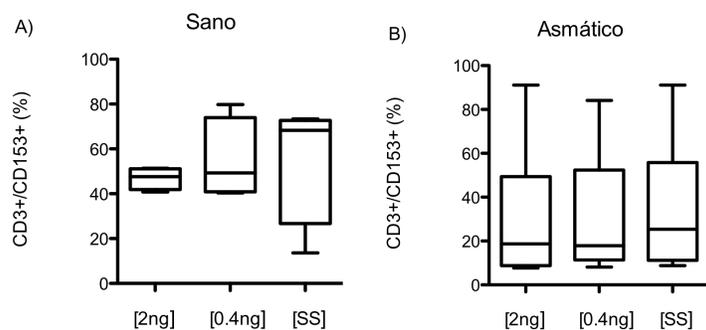
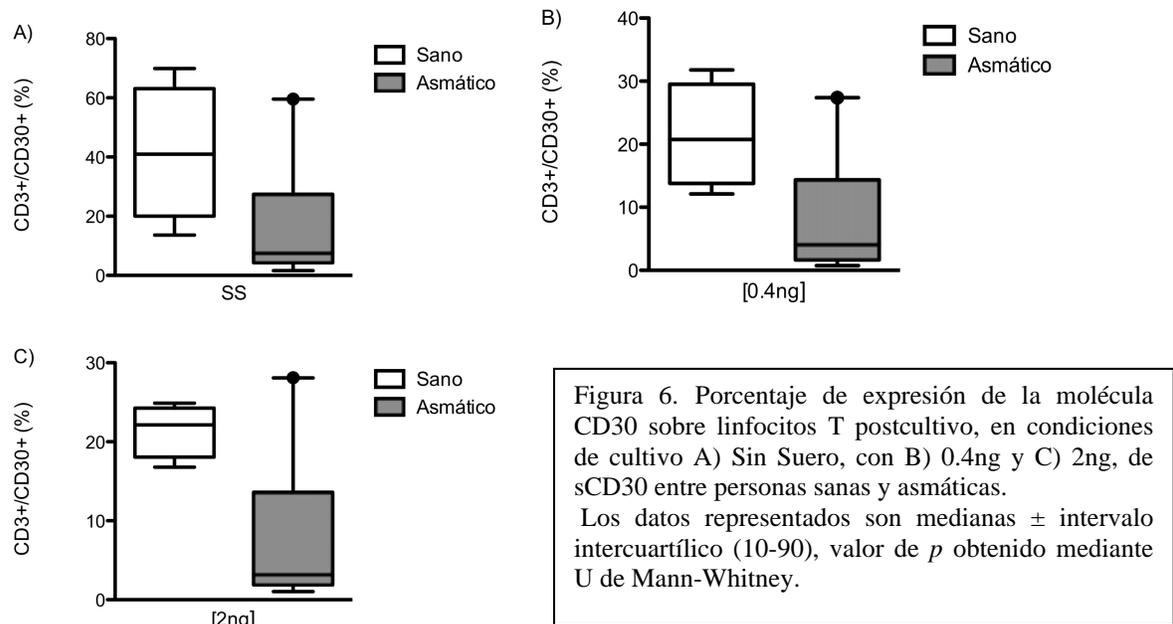


Figura 5. Porcentaje de expresión de la molécula CD153 sobre linfocitos T en personas A) sanas y B) asmáticas. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

**3.-Comparación de las condiciones postcultivo en la expresión de CD30 y CD153 en linfocitos T y B de personas sanas y personas con asma**

A su vez, se comparó el porcentaje de expresión de las proteínas CD30 y CD153, sujetas a las mismas condiciones de cultivo entre personas sanas y asmáticas.

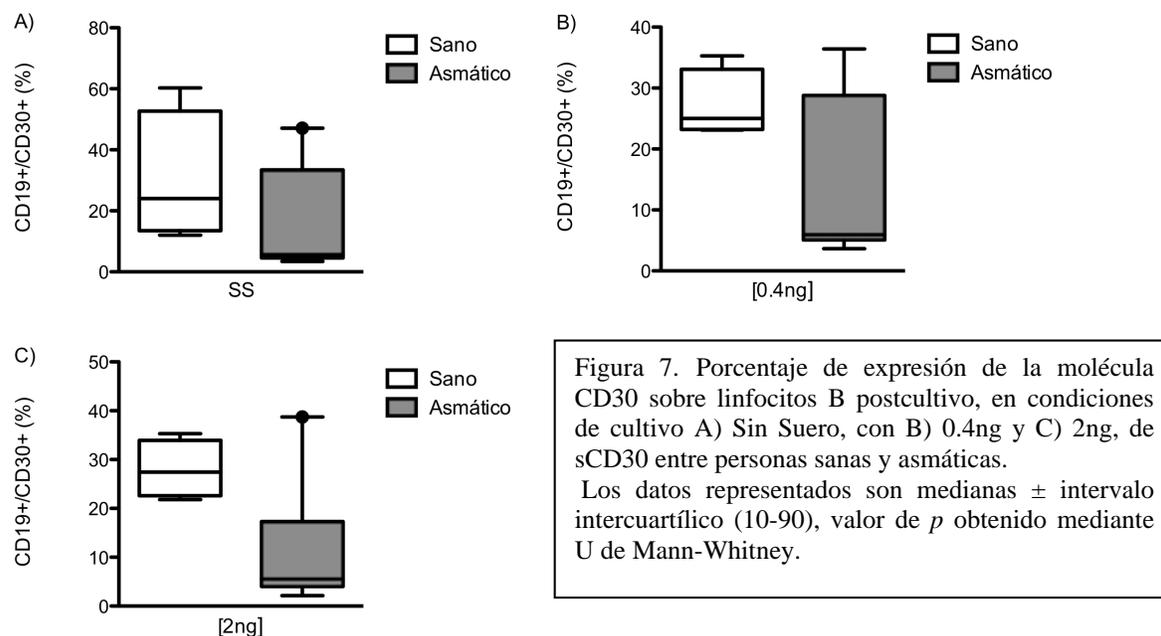
En personas sanas, el porcentaje de expresión de CD30 sobre linfocitos T postcultivo sin sCD30 fue de 40.95%, mientras que en personas asmáticas disminuyó a 7.55% (Fig.6 panel A); 5.42 veces mayor expresión en personas sanas sin una *P* significativa. De la misma forma se registró que el porcentaje de expresión de CD30 sobre linfocitos T fue 6.94 veces mayor para la condición con 2ng (Fig.6 panel B) y de 5.11 veces mayor para la condición con 0.4ng de sCD30 (Fig.6 panel C) respecto a individuos asmáticos; ambos resultados sin diferencia estadística.



Cuadro 2. Condiciones de cultivo en células CD3<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup>

Población/Condición	Sano (n=4)	Asmático (n=9)	Valor de <i>P</i>
<b>CD3<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup> Sin suero</b>	40.95	7.55	No significativo
<b>CD3<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup> [0.4ng]</b>	20.75	4.06	No significativo
<b>CD3<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup> [2ng]</b>	22.15	3.19	No significativo

De la misma manera, se observó que personas sanas expresan un mayor porcentaje de CD30 sobre linfocitos B que pacientes asmáticos, tanto en la condición sin suero (24% vs 5.68%) (Fig.7 panel A) como en las condiciones para 0.4ng (25% vs 5.95%) (Fig.7 panel B) y para 2ng (27.45% vs 5.53%) (Fig.7 panel C) de concentración sérica con sCD30. Sin embargo no se encontraron diferencias válidas para ninguna condición.

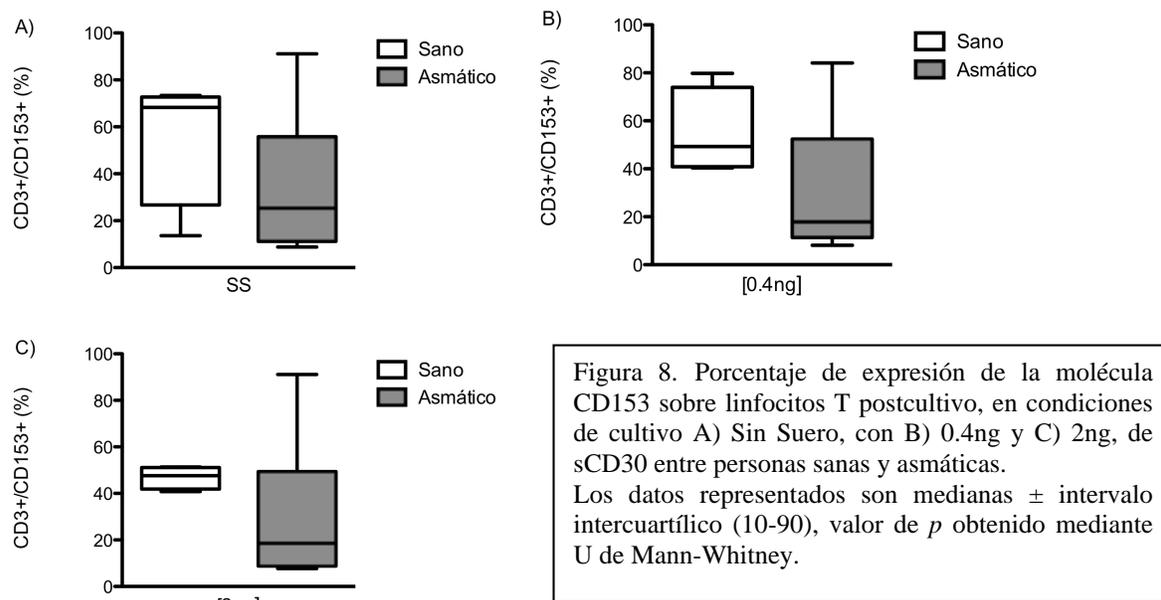


Cuadro 3. Condiciones de cultivo en células CD19<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup>

Población/Condición	Sano (n=4)	Asmático (n=9)	Valor de $P$
<b>CD19<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup> Sin suero</b>	24	5.68	No significativo
<b>CD19<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup> [0.4ng]</b>	25	5.95	No significativo
<b>CD19<sup>+</sup>/CD30<sup>+</sup> [2ng]</b>	27.45	5.53	No significativo

En personas sanas, el porcentaje de expresión de CD153 en linfocitos T, fue de 68.3% para la condición sin suero, mientras que individuos con asma fue de 25.4% (Fig.8 panel A); 2.68 veces mayor en individuos sanos. En la condición con 0.4ng de concentración sérica de sCD30 (Fig.8 panel B), fue 2.75 veces mayor en personas sanas (49.25% vs 17.9%); el porcentaje de expresión

para la condición con 2ng de concentración sérica de sCD30 (Fig.8 panel C) en personas sanas fue de 47.65%, mientras que para personas asmáticas fue de 18.7% (2.54 veces mayor en sanos). No se encontraron diferencias válidas en ninguna condición.

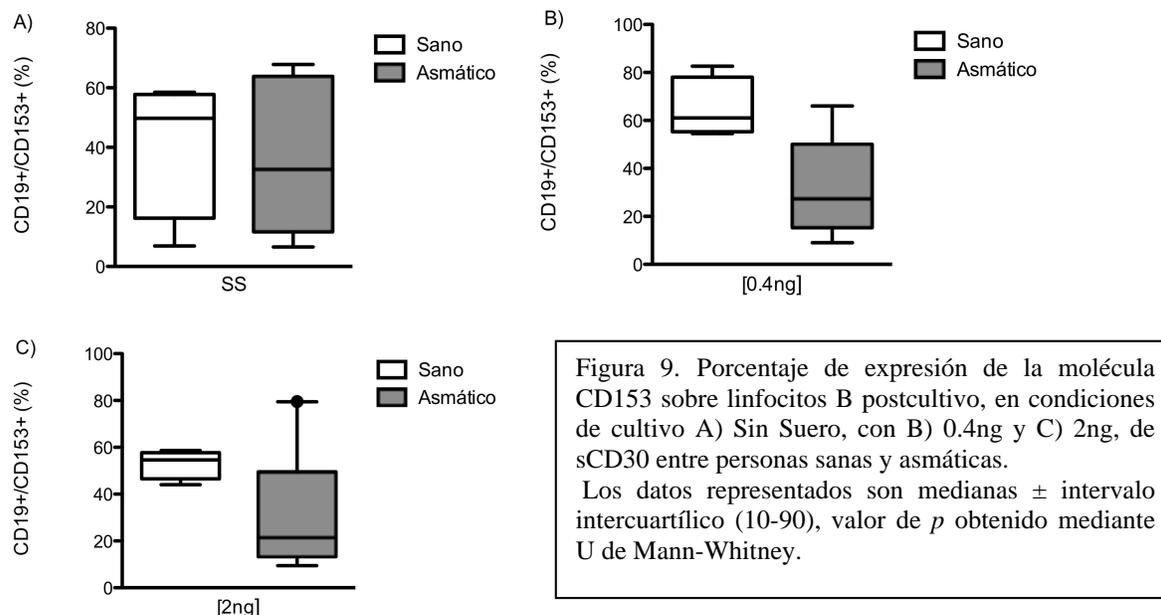


Cuadro 4. Condiciones de cultivo en células CD3<sup>+</sup>/CD153<sup>+</sup>

Población/Condición	Sano (n=4)	Asmático (n=9)	Valor de $P$
CD3 <sup>+</sup> /CD153 <sup>+</sup> Sin suero	68.3	25.4	No significativo
CD3 <sup>+</sup> /CD153 <sup>+</sup> [0.4ng]	49.25	17.9	No significativo
CD3 <sup>+</sup> /CD153 <sup>+</sup> [2ng]	47.65	18.7	No significativo

Finalmente, se analizó la expresión de CD153 sobre el porcentaje de linfocitos B, la condición sin suero mostró un efecto similar a lo descrito. Se registró que las personas sanas, expresan una mayor cantidad de células dobles positivas (49.8%) en comparación con pacientes asmáticos (32.7%), siendo 1.52 veces mayor la expresión en personas sanas (Fig.9 panel A), sin tener una diferencia estadística. Para la condición con baja concentración de sCD30 se registró un total de 61% de expresión en personas sanas, mientras que en asmáticos fue de 27.5%, la diferencia fue de 2.21 veces mayor en personas sanas (Fig.9 panel B). De la misma manera, para la condición de alta

concentración sérica de sCD30, se registró para personas sanas una expresión de 54.6% y para asmáticos un total de 21.5%, la diferencia de expresión fue 2.53 veces mayor para personas sanas (Fig.9 panel C). Tampoco se encontraron diferencias estadísticas en la expresión de éstas proteínas entre personas sanas y personas que padecen asma.



Cuadro 5. Condiciones de cultivo en células CD19<sup>+</sup>/CD153<sup>+</sup>

Población/Condición	Sano (n=4)	Asmático (n=9)	Valor de P
CD19 <sup>+</sup> /CD153 <sup>+</sup> Sin suero	49.8	32.7	No significativo
CD19 <sup>+</sup> /CD153 <sup>+</sup> [0.4ng]	61	27.4	No significativo
CD19 <sup>+</sup> /CD153 <sup>+</sup> [2ng]	54.6	21.5	No significativo

#### 4.-Comparación de las proteínas CD30 y CD153 entre la expresión basal y la expresión postcultivo de individuos sanos y personas con asma.

Tanto para personas sanas como para personas con asma, se comparó la expresión basal para CD30 y CD153 contra sus distintas condiciones postcultivo. En linfocitos B de personas sanas, se observó un incremento en el porcentaje de expresión de CD30 postcultivo (Fig.10 panel A). Para la

condición sin suero se registró un aumento de 13.11 veces (1.83% vs 24%), en la condición de 0.4ng aumentó 13.66 veces (1.83% vs 25%) y para 2ng un total de 15 veces (1.83% vs 27.45%); todas las condiciones obtuvieron una  $P < 0.05$ . La expresión de CD30 sobre linfocitos T (Fig.10 panel B) también registró un aumento postcultivo, mientras que en la condición basal la expresión de la proteína fue menor a uno, en la condición sin suero registró un aumento de 40%, para 0.4ng aumentó a un 20%, y para 2ng, se registró un aumento de 22%; las diferencias fueron significativas con una  $P < 0.05$ .

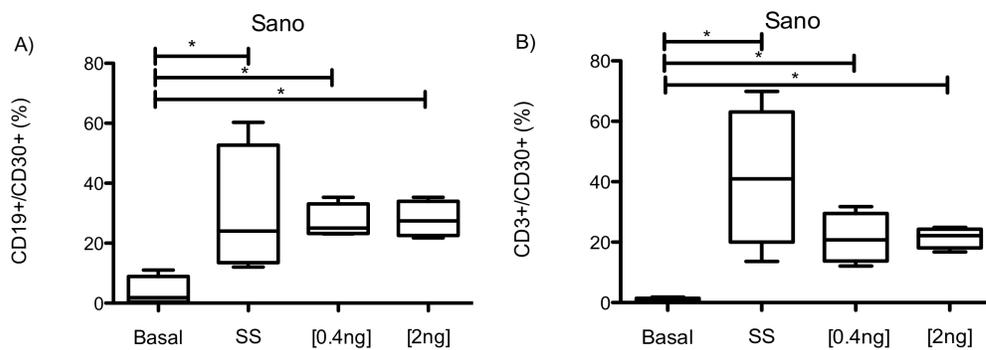


Figura 10. Comparación del porcentaje de expresión de la molécula CD30 sobre (A) linfocitos B, y sobre (B) linfocitos T entre la condición basal contra las condiciones postcultivo; carente de suero, con [0.4ng] y [2ng] de sueros con sCD30. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

De igual manera, en personas sanas se registró un aumento en el porcentaje de expresión de CD153 postcultivo sobre linfocitos B (Fig. 11 panel A) para las condiciones con alta y baja concentración sérica de sCD30. Similar a lo descrito, la expresión de CD153 sobre linfocitos T (Fig.11 panel B), registró un aumento en las condiciones con sCD30. Resultados con un valor de  $P < 0.05$ . Sin embargo para las condiciones sin suero, no se obtuvo una diferencia significativa en el porcentaje de expresión entre el estado basal y postcultivo.

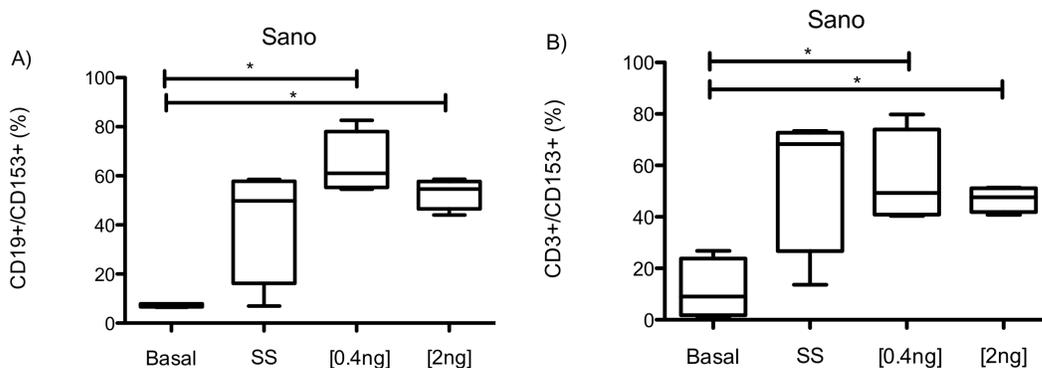


Figura 11. Comparación del porcentaje de expresión de la molécula CD153 sobre (A) linfocitos B, y sobre (B) linfocitos T entre la condición basal contra las condiciones postcultivo; carente de suero, con [0.4ng] y [2ng] de sueros con sCD30. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

De la misma forma en pacientes asmáticos se comparó la condición basal contra las condiciones postcultivo. Aunque el porcentaje de expresión de CD30 basal sobre linfocitos B fue menor a uno, en las condiciones de cultivo se obtuvo un aumento significativo ( $P < 0.005$ ) tanto en la condición sin suero (5.68%), con 0.4ng de suero (5.95%) y para la condición con 2ng (5.53%) (Fig.12 panel A). Similar al comportamiento basal en los linfocitos B, el porcentaje de expresión de CD30 sobre linfocitos T fue menor a 1, misma que aumentó postcultivo tanto para la condición sin suero (7.55%), con 0.4ng (4.06%) y 2ng (3.19%) (Fig.12 panel B), resultados con una  $P < 0.0005$ .

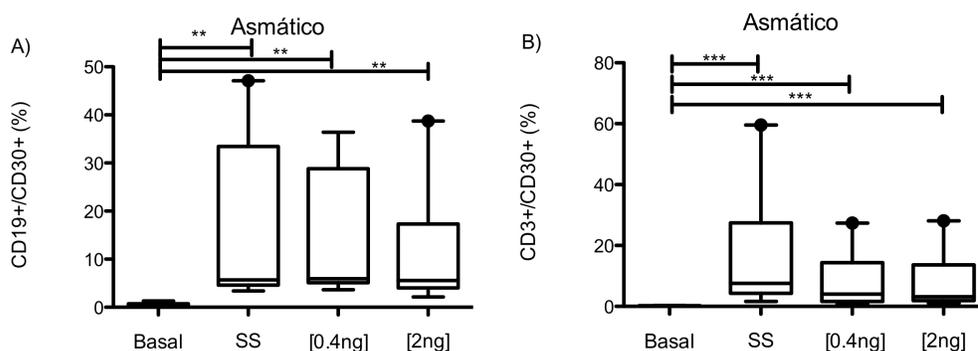


Figura 12. Comparación del porcentaje de expresión de la molécula CD30 sobre (A) linfocitos B, y sobre (B) linfocitos T entre la condición basal contra las condiciones postcultivo; carente de suero, con [0.4ng] y [2ng] de sueros con sCD30. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

Por último y de la misma manera, se comparó el porcentaje de expresión de CD153 sobre linfocitos B (Fig.13 panel A) en pacientes asmáticos entre el estado basal contra las condiciones postcultivo: carente de sCD30 (7.3% vs 32.7%), con 0.4ng (7.3% vs 27.4%) y con 2ng (7.3% vs 21.5%), aunque es evidente un aumento postcultivo no se encontraron diferencias significativas. En el mismo sentido, se comparó la expresión de la proteína en linfocitos T (Fig.13 panel B): condición sin suero (3.7% vs 25.4%), 0.4ng (3.7% vs 17.9%) y 2ng (3.7% vs 18.7%), sin embargo, sólo en las condiciones sin suero y con 2ng, se observó un aumento significativo de expresión de 6.86 y 5.05 veces mayor respecto a la condición basal ( $P<0.05\%$ ).

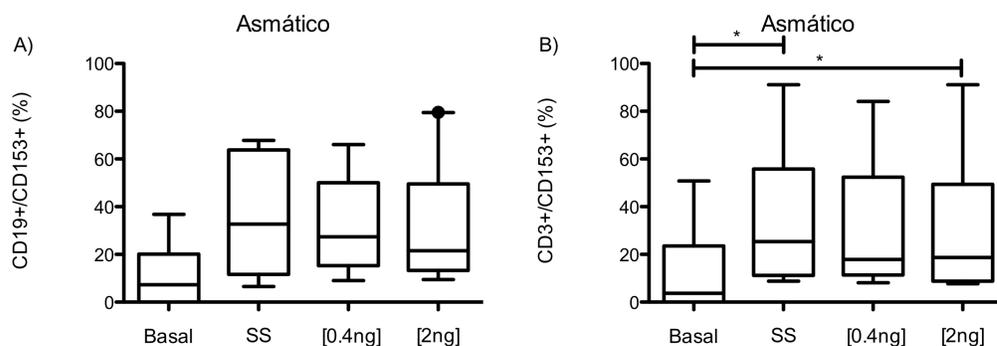


Figura 13. Comparación del porcentaje de expresión de la molécula CD153 (A) linfocitos B, y sobre (B) linfocitos T entre la condición basal contra las condiciones postcultivo; carente de suero, con [0.4ng] y [2ng] de sueros con sCD30. Los datos representados son medianas  $\pm$  intervalo intercuartílico (10-90), valor de  $p$  obtenido mediante U de Mann-Whitney.

## VIII. DISCUSIÓN

La expresión basal de CD30 en personas asmáticas ( $<1\%$ ) resultó conforme a lo reportado por la literatura<sup>46</sup>, la cual menciona que esta es una molécula que no se expresa en un estado basal, por lo que para observar su expresión, necesita que las células sobre las que se expresa, en este caso linfocitos T y B, entren en estado de activación<sup>47</sup>; sin embargo en personas sanas, se registraron

valores del casi 2% de expresión de CD30 sobre la población total de linfocitos B, y menor a 1% sobre la población total de linfocitos T (Cuadro 1).

La expresión basal de su ligando (CD153) sobre la población de linfocitos B resultó ser similar entre ambos grupos de estudio (~7%). En el caso de los linfocitos T, se registró una mayor cantidad de expresión en individuos sanos (9%) a comparación de personas asmáticas (3%), sin encontrar diferencias estadísticas entre ambos grupos (Cuadro 1). De igual manera, nuestros resultados concuerdan con la literatura, ya que es una proteína que se expresa en niveles bajos en un estado basal<sup>30,48,49</sup>. En estos primeros resultados, y con base en los estudios de Nam Sang-yun<sup>6</sup> y Polte<sup>37</sup>, se esperaba que los pacientes asmáticos expresaran mayores cantidades de CD30 y CD153 con respecto al grupo control, ya que como ellos describen, algunos síntomas de alergia como reclutamiento eosinofílico, inflamación de vías aéreas, producción de IL-5 e IgE, son resultado de la interacción entre ambas moléculas.

En ambos grupos de estudio, disminuyó el porcentaje de expresión de CD30 sobre linfocitos T en las condiciones adicionadas con CD30 soluble (Fig.2 y 4). En el caso de CD30 sobre linfocitos B, se registró porcentajes de expresión similares (Fig.3), sólo en la expresión de CD153 sobre linfocitos B (Fig.5), se encontró que en individuos sanos CD30 soluble aumentó el porcentaje de expresión de esta proteína, y en el caso del grupo de estudio, la expresión disminuyó. Estos resultados pueden explicarse debido a que los sueros con CD30 soluble, también presentan factores solubles como citocinas reguladoras que pueden inhibir la expresión de las proteínas de estudio. En los resultados postcultivo, se esperaba que CD30 soluble aumentara el porcentaje de expresión tanto de CD30, como de CD153, ya que CD30 soluble se une fácilmente a su ligando, y la gravedad de la enfermedad se relaciona con la cantidad de CD30 soluble presente en suero, además de que, según lo descrito en modelo murino, la presencia de ambos receptores repercuten en síntomas de asma; sin embargo no hubo diferencias estadísticas entre los porcentajes de expresión en las tres condiciones de cultivo (Fig.2-5), por lo que estos resultados muestran que los sueros con CD30 soluble no afectan la expresión de nuestras proteínas de estudio. Por otro lado, cabe destacar que en estas

imágenes, se observan mayores cantidades de expresión tanto de CD30 como de CD153 sobre linfocitos T y B en personas sanas a comparación de asmáticos, motivo por el cual, se compararon los porcentajes de expresión sobre linfocitos T y B entre ambos grupos para observar posibles diferencias.

En personas sanas, el porcentaje de expresión de CD30 sobre linfocitos T (Fig.6) fue 6 mayor respecto a individuos asmáticos y en el caso de los linfocitos B (Fig.7) 4 veces mayor. En personas sanas se obtuvo que los porcentajes de expresión de CD153 (Fig8), sobre linfocitos T, fueron poco más del doble, sin embargo, la expresión de CD153 en linfocitos B, aumentó en las condiciones donde se le adicionaron los sueros con CD30 soluble; en cambio en el grupo de estudio, los porcentajes de expresión disminuyeron (Fig.9). Aunque es evidente el aumento en el porcentaje de expresión de estos receptores, no hubo diferencias estadísticas, lo que podría explicarse con base en el trabajo de Barbano<sup>49</sup>, quien describe que los pacientes que tienen tratamiento, tienden a expresar niveles normales en las proteínas de estudio. Cabe aclarar que los pacientes de nuestro grupo de estudio, aunque son individuos de reciente diagnóstico es posible que lleven tratamiento, ya que de acuerdo con la clasificación del GINA (Tabla 1), el asma moderado persistente, es una enfermedad que afecta la vida diaria por lo que requiere sea controlada. También es posible que para observar una diferencia estadística entre ambos grupos, sea necesario aumentar el número de individuos a estudio tanto del grupo control, como del problema.

Finalmente, se comparó el porcentaje de expresión previo a cultivo celular contra las diferentes condiciones de postcultivo. Se observó que PHA es un mitógeno que favorece la expresión de CD30 en ambos grupos de estudio (Fig.10 y 12). De igual manera se observó que PHA aumentó la expresión de CD153 sobre linfocitos T y B (Fig.11) de personas sanas, sin embargo en pacientes con asma, no existen diferencias en el porcentaje de expresión de la proteína sobre linfocitos B (Fig.13), sin embargo, sí tiene un efecto positivo en la expresión de CD153 sobre linfocitos T. Resultados concordantes con la literatura, ya que mencionan que el mitógeno PHA induce la expresión de CD30 sobre linfocitos T<sup>5,31</sup>.

Aún no se ha esclarecido totalmente la importancia de éstas moléculas en enfermedades alérgicas, y sobre todo en las complejas interacciones que suceden *In vivo*. Hace falta más investigación para conocer la importancia directa de CD30 y CD153 en la muerte celular programada y por ende, en el desarrollo de enfermedades alérgicas como el asma.

## **IX. CONCLUSIONES**

Se observó que PHA induce la expresión de CD30 entre ambos grupos de estudio, además favorece la expresión de CD153 en personas sanas. Los sueros que contienen sCD30 no afectaron la expresión *In vitro* de CD30 ni de CD153 después de 3 días de cultivo en presencia de PHA; sin embargo, es importante remarcar que en personas sanas, el porcentaje de expresión de CD30 y CD153 tienden a ser mayor a comparación de asmáticos.

## X. REFERENCIAS

- 1 From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2012. Chapter 1 Definition and Overview, The burden of asthma, prevalence, morbidity, and mortality.
- 2 Guía Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento del Asma en Mayores de 18 Años, México; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009, página 9
- 3 Young KH, De kruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* 2010 Jul;11(7):577-84
- 4 Douglas S.R. The role of the T cell in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 126:1081-1091
- 5 Garfias Y, Ortiz B, Hernández J, Magaña D, Becerril-Angeles M, Zenteno E, Lascurain R. CD4+ CD30+ T cells perpetuate IL-5 production in *Dermatophagoides pteronyssinus* allergic patients. *Allergy* 2006 Jan;61(1):27-34.
- 6 Nam SY, Him YH, Do JS, Choi YH, Seo HJ, Yi HK, Hwang PH, Song CH, Lee HK, Kim JS, Podack ER. CD30 supports lung inflammation. *Int Immunol.* 2008 Feb;20(2):177-84
- 7 Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology, 7<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA, USA: Saunders Elsevier, 2012
- 8 Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Richard A. Goldsby. Kuby immunology Sixth Edition, Chapter 11, B Cell Generation, Activation, and differentiation, 12 cytokines
- 9 Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helpers cells. *Cell Res.* 2010 Jan; 20(1): 4-12
- 10 Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89
- 11 Bengtsson, A. The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* 2001, 56: 593–603.
- 12 Kapsenberg ML, Wierenga EA, Stiekema FE, Tiggeleman AM, Bos JD. Th1 Lymphokine Production Profiles of Nickel-Specific CD4+ T-Lymphocyte Clones from Nickel Contact Allergic and Non-Allergic Individuals. *Journal of Investigative Dermatology* 1992; 98, 59–63
- 13 Udono H, Wang JO, Watanabe T (2007) Antigen presentation to lymphocytes. *Nature encyclopedia of life sciences* 1–8.
- 14 Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. New York: Garland Science; 2001. T cell-mediated cytotoxicity.
- 15 Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar; 8(3):205-17.
- 16 Williams Rojas Montoya. *Inmunología de memoria.* Corporación para investigaciones Biológicas (CIB). 10ma Edición 1995
- 17 Zubiría CE. *Asma bronquial.* 2da edición, Ed. Médica Internacional. 2004
- 18 Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD, Dean D, Metcalfe. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb; 125(2 Suppl 2):S73-80.
- 19 Mayr SI, Zuberi RI, Zhang M, de Sousa-Hitzler J, Ngo K, Kuwabara Y, Yu L, Fung-Leung WP, Liu FT. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol.* 2002 Aug 15; 169 (4):2061-8.

- 20 Jarjour, N., W. Calhoun, E. Becky-Wells, G. Gleich, L. Schwartz, and W. Busse. 1997. The immediate and late-phase allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1515–1521
- 21 Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Chapter 12, Allergy and Hypersensitivity.
- 22 Ciara N. Magee, Olaf Boenisch, and Nader Najafian. The Role of Co-Stimulatory Molecules in Directing the Functional Differentiation of Allo-Reactive T Helper Cells. *Am J Transplant.* 2012 October; 12(10): 2588–2600.
- 23 Ramiscal RR, Vinuesa CG. T-cell subsets in the germinal center. *Immunol Rev.* 2013 Mar; 252(1):146-55.
- 24 Javier Cote-Sierra, Gilles Foucras, Liying Guo, Lynda Chiodetti, Howard A. Young, Jane Hu-Li, Jinfang Zhu, and William E. Paul. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 March 16; 101(11): 3880–3885
- 25 Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, Sallusto F. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity.* 2013 Mar 21; 38(3):596-605.
- 26 Potaczek DP, Kabesch M. Current concepts of IgE regulation and impact of genetic determinants. *Clin Exp Allergy.* 2012 Jun; 42(6):852-71.
- 27 Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutation research.* 2010 Aug 7; 690(1-2):24-39.
- 28 Estrada EF, Uribe AM. *Atlas de histología de vertebrados*, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 29 Younes A, Consoli U, Zhao S, Snell V, Thomas E, Gruss HJ, Cabanillas F, Andreeff M. CD30 ligand is expressed on resting normal and malignant human B lymphocytes. *Br J Haematol.* 1996 Jun;93(3):569-71.
- 30 Kennedy MK, Willis CR, Armitage RJ. Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology.* 2006 Jun; 118(2):143-52.
- 31 Leonard C, Tormey V, Faul J, Burke CM, Poulter LW. Allergen-induced CD30 expression on T cells of atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 1997, 27:780-786.
- 32 Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, et al. Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2- type cytokines *FASEB J.* 1995 Jan;9(1):81-6.
- 33 Hansen H.P., Dietrich S., Kisseleva T., Mokros T., Mentlein R., Lange H.H., Murphy G., Lemke H. CD30 shedding from karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J. Immunol.* 165, 6703-6709. 2000
- 34 Fuchiwaki T, Sun X, Fujimura K, Yamada H, Shibata K, Muta H, Podack ER, Kawauchi H, Yoshikai Y. The central role of CD30L/COD30 in allergic rhinitis pathogenesis in mice. *Eur J Immunol.* 2011 Oct;41(10):2947-54.
- 35 Hansen HP, Kisseleva T, Kobarg J, et al. A zinc metalloproteinase is responsible for the release of CD30 on human tumor cell lines. *Int J Cancer* 1995, 63:750-6
- 36 Hargreaves PG, Al-Shamkhani A. Soluble CD30 binds to CD153 with high affinity and blocks transmembrane signaling by CD30. *Eur. J. Immunol.* 2002. 32: 163–173

- 37 Polte T, Behrendt AK, Hansen G. Direct evidence for a critical role of CD30 in the development of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Oct;118(4):942-8
- 38 Shimozato O, Takeda K, Yagita H, Okomura K. Expression of CD30 Ligand (CD153) on Murine Activated T Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 24; 256(3):519-26.
- 39 Rossi FM, Degan M, Mazzocut-Zecchin L, Di Francia R, Aldinucci D, Pinto A, Gattei V. CD30L up-regulates CD30 and IL-4 expression by T cells. *FEBS Lett* 2001 Nov 23; 508(3):418-22.
- 40 Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL, Thompson CB. Expression of the Costimulatory Receptor CD30 Is Regulated by Both CD28 and Cytokines. *J Immunol*. 1998 Mar 1; 160(5):2180-7.
- 41 Heshmat NM, El-Hadidi ES. Soluble CD30 serum levels in atopic dermatitis and bronchial asthma and its relationship with disease severity in pediatric age. *Pediatr Allergy Immunol* 2006, 17(4):297-303
- 42 Remes ST, Delezuch W, Pulkki K, Pekkanen J, Korppi M, Matinlauri IH. Association of serum-soluble CD26 and CD30 levels with asthma, lung function and bronchial hyper-responsiveness at school age. *Acta Paediatr*. 2011 Sep; 100(9):106-11.
- 43 Haile ST, Dalal SP, Clements V, Tamada K, Ostrand-Rosenberg S. Soluble CD80 restores T cell activation and overcomes tumor cell programmed death ligand 1-mediated immune suppression. *J Immunol*. 2013 Sep. 1;191(5):2829-36.
- 44 Luan Y, Ju J, Luo L, Zhang Z, Wang J, Zhu DM, Cheng L, Zhang SY, Chen L, Wang FS, Wang S. Potential role of soluble B7-H3 in liver immunopathogenesis during chronic HBV infection. *J Viral Hepat*. 2012 Jan;19(1):23-31.
- 45 Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* 1976, 5: 9-15
- 46 Yamamoto J, Adachi Y, Ononue, Kanegane H, Miyawaki T, Toyoda M, Seki T, Morohashi. CD30 expression on circulating memory CD4+ T cells as a Th2-dominated situation in patients with atopic dermatitis. *Allergy*. 2000 Nov;55(11):1011-8.
- 47 Gruss HJ, Boiani N, Williams DE, Armitage RJ, Smith CA, Goodwin RG. Pleiotropic Effects of the CD30 Ligand on CD30 Expressing Cells and Lymphoma Cell Lines. *Blood*. 1994 Apr 15;83(8):2045-56.
- 48 Tang C, Yamada H, Shibata K, Muta H, Wajjwalku W, Podack ER, Yoshikai Y. A Novel Role of CD30L/CD30 Signaling by T-T Cell Interaction in Th1 Response against Mycobacterial Infection. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):6316-27.
- 49 Barbano G, Cappa F, Prigione I, Pistoia V, Cohen A, Chiesa S, Gusmano R, Perfumo F. Plasma levels of soluble CD30 are increased in children with chronic renal failure and with primary growth deficiency and decrease during treatment with recombination human growth hormone. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Sep;16(9):1807-13.
- 50 Cavagni G, Caffarelli C, Facchetti F. Cutaneous CD30+ cells in children with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121:224–228.
- 51 Ermert M, Pantazis C, Duncker HR, Grimminger F, Seeger W, Ermert L. In situ localization of TNFalpha/beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. Department of Pathology, Justus-Liebig University Giessen, Langhansstr 10, 35385 Giessen, Germany. 2003 May;22(3-4):89-100

- 52 Hamelmann E, Gelfand EW. Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999 Sep; 120(1):8-16.
- 53 Horie R, Watanabe T. CD30: expression and function in health and disease. *Semin Immunol*. 1998 December 10(6):457-70.
- 54 Lombardi V, Singh AK, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010; 151(3):179-89.
- 55 Monika Gooz. Adam-17: The enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010 April; 45(2): 146–169
- 56 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1; 136(7):2348-57.
- 57 Mossmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- 58 Najamura T, Lee R.K, Nam SY, et al. Reciprocal regulation of CD30 expression on CD4 T cells by IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol*. 1997 Mar 1; 158(5):2090-8.
- 59 Nakae S, Ho LH, Yu M, Monteforte R, Iikura M, Suto H, Galli SJ. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jul; 120(1):48-55
- 60 Olivier M, Foret B, Le Vern Y, Guilloteau LA. Capacities of migrating CD1b+ lymph dendritic cells to present Salmonella antigens to naive T cells. *PLoS One*. 2012; 7 (1):e30430.
- 61 Rojas-Ramos E, Garfias Y, Jimenez-Martinez M del C, Martines-Jimenez N, Zenteno E, Gorocica P, Lascurain R: Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4(+) T cells from children with atopic asthma a preliminary report. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28: 659-666
- 62 Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Pizzolo G. CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol*. 1995 May;57(5):726-30.
- 63 Saito H, Ishizaka T, Ishizaka K. Mast Cells and IgE: From History to Today. *Allergol Int*. 2013 Mar;62(1):3-12.
- 64 Shakoory B, Fitzgerald SM, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J Interferon Cytokine Res* 2004, 24,25(5): 271-81
- 65 Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:29-53.

## XI. ABREVIATURAS

CCL5	Ligando de quimiocinas 5
CCR3	Receptor de quimiocinas 3
CD	Cúmulo de diferenciación (cluster of differentiation)
CD30L	CD30 Ligando
Der P	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ECP	Proteína catiónica del eosinófilo
EPO	Peroxidasa del eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada del eosinófilo
FceRI	Receptor de alta afinidad para cadenas pesadas épsilon
FceRII	Receptor de baja afinidad para cadenas pesadas épsilon
GINA	Iniciativa Global para el Asma
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
IL2	Interleucina 2
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
IL10	Interleucina 10
IL13	Interleucina 13
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ICOSL	Ligando del coestimulador inducible de células T
ICOS	Coestimulador inducible de células T
Ig	Inmunoglobulina
LT	Leucotrienos
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
MBP	Proteína básica mayor
OVA	Ovoalbúmina
PAF	Factor activador de plaquetas
TH1	Células T cooperadoras de tipo 1
TH2	Células T cooperadoras de tipo 2
PBS	Solución amortiguadora salino fosfato
PHA	Fitohemaglutinina
sCD30	CD30 soluble
TACE	Enzima de conversión alfa del factor de necrosis tumoral
TCR	Receptor de células T
TH2	Células T cooperadoras de tipo 2
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- $\beta$	Factor de necrosis tumoral beta
TNFR	Receptores del factor de necrosis tumoral

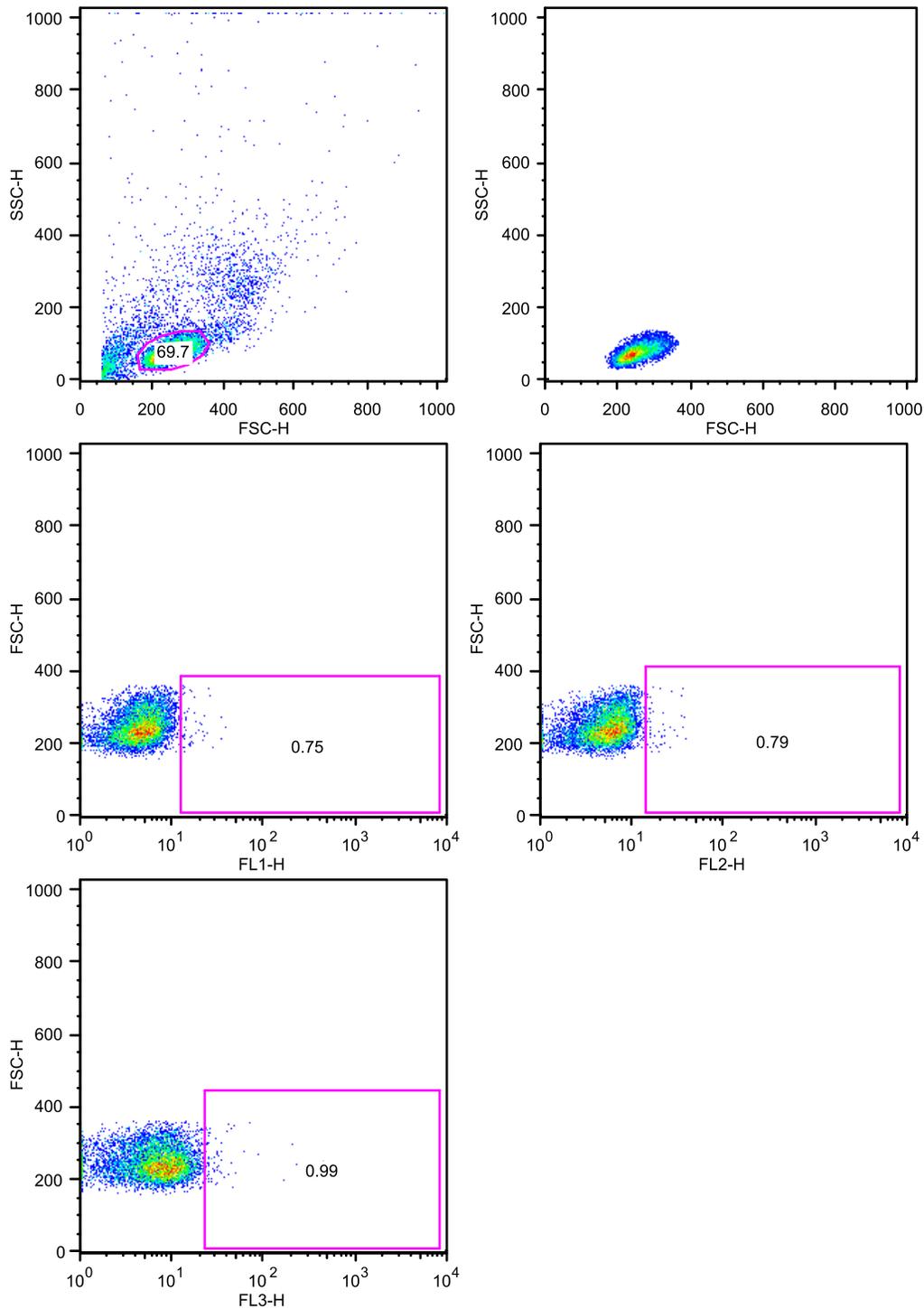
## XII. ANEXOS

**Tabla 2. Anticuerpos acoplados a distintos flourocromos utilizados durante marcaje celular**

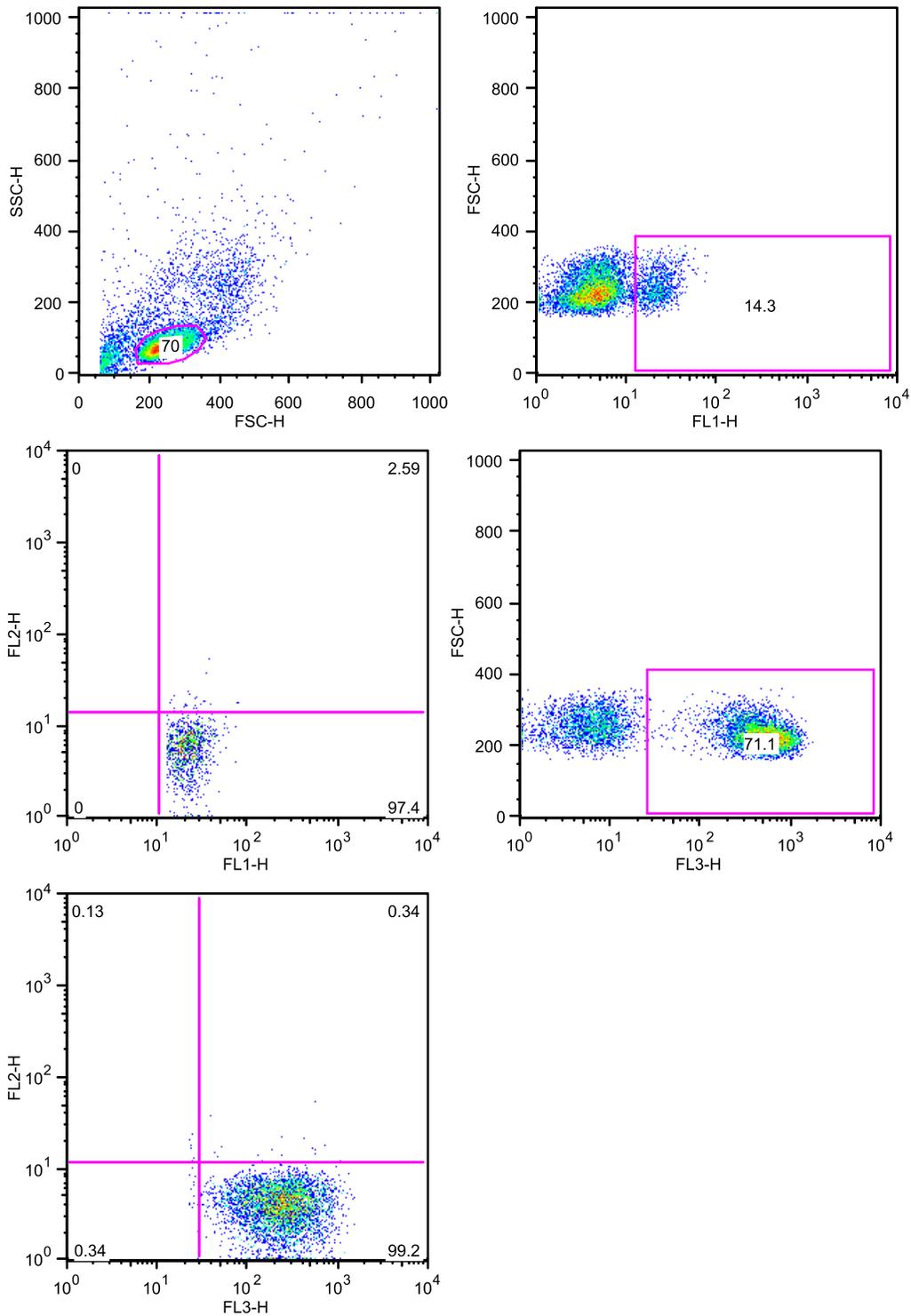
	FL-1 (FITC)	FL-2 (PE)	FL-3 (PerCP-Cy5.5)
CD19	X		
CD30		X	
CD153		X	
CD3			X

**Tabla 3. Personas involucradas en el estudio**

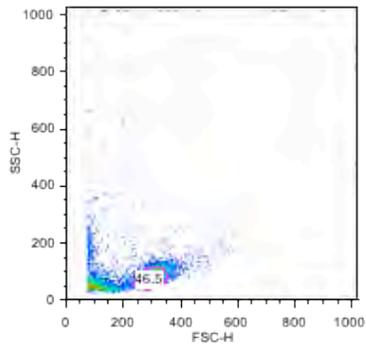
Edad	Sexo	Diagnóstico
9	Femenino	Sano
8	Femenino	Sano
9	Masculino	Sano
7	Masculino	Sano
11	Femenino	Asmático
9	Masculino	Asmático
8	Femenino	Asmático
8	Masculino	Asmático
9	Masculino	Asmático
10	Femenino	Asmático
8	Masculino	Asmático
7	Masculino	Asmático
8	Masculino	Asmático



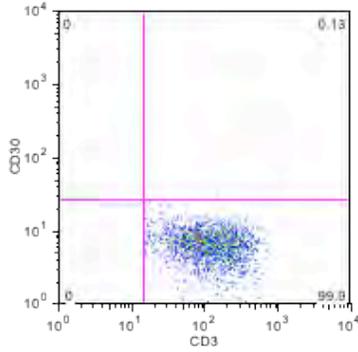
En la gráfica de tamaño contra granularidad obtenida por citometría de flujo, se delimitó el área de linfocitos(1). Una vez seleccionada el área(2), se graficaron dos parámetros: tamaño vs los diferentes fluorocromos (3) con el objetivo de delimitar nuestro control negativo para identificar posteriormente el área de linfocitos T y B.



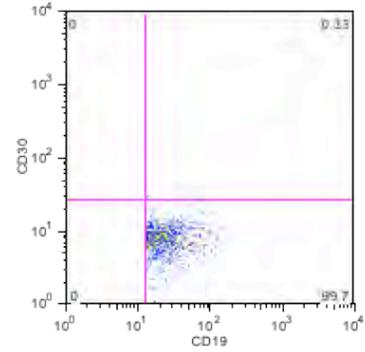
Los límites marcados con los controles de isotipo, fueron aplicados a las poblaciones celulares marcadas con anticuerpos para CD3, CD19, CD30 y CD153, con el fin de tener las poblaciones positivas para éstos.



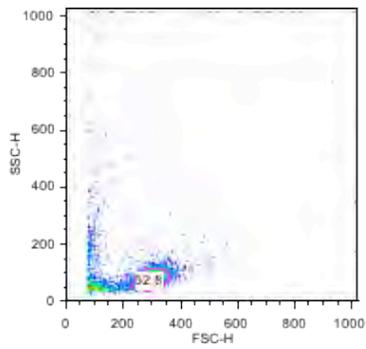
Basal Asmático



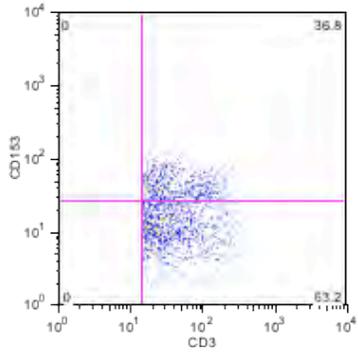
Basal Asmático



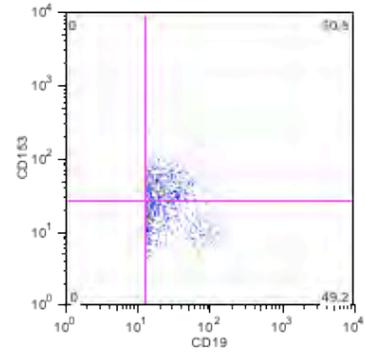
Basal Asmático



Basal Asmático

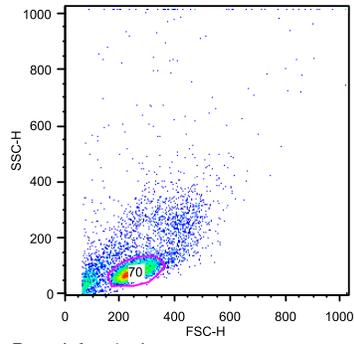


Basal Asmático

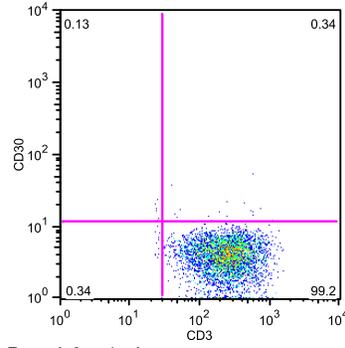


Basal Asmático

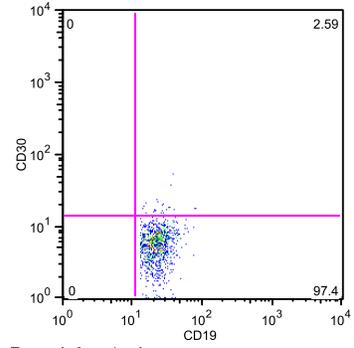
**Imagen representativa de triple inmunofluorescencia basal**



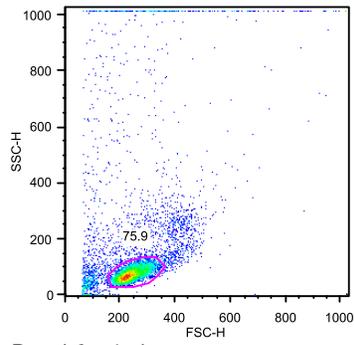
Basal Control



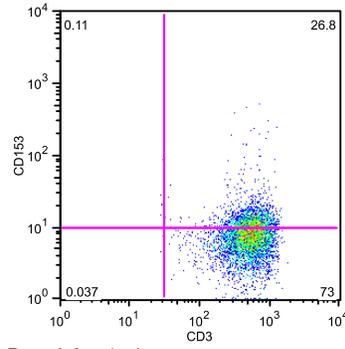
Basal Control



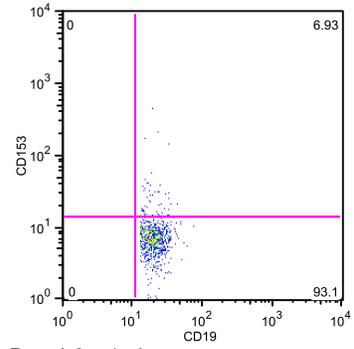
Basal Control



Basal Control



Basal Control



Basal Control

**Imagen representativa de triple inmunofluorescencia basal**

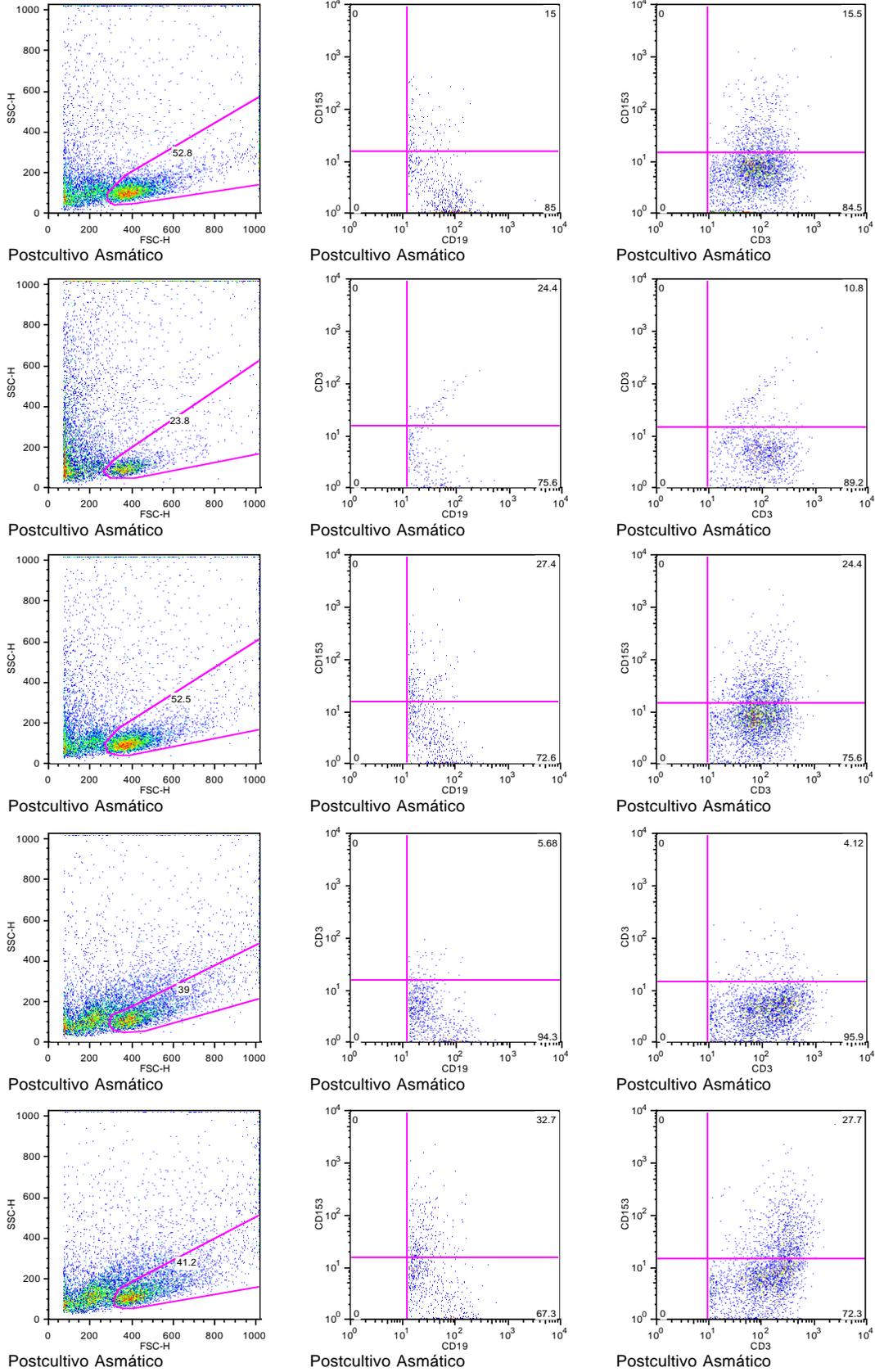
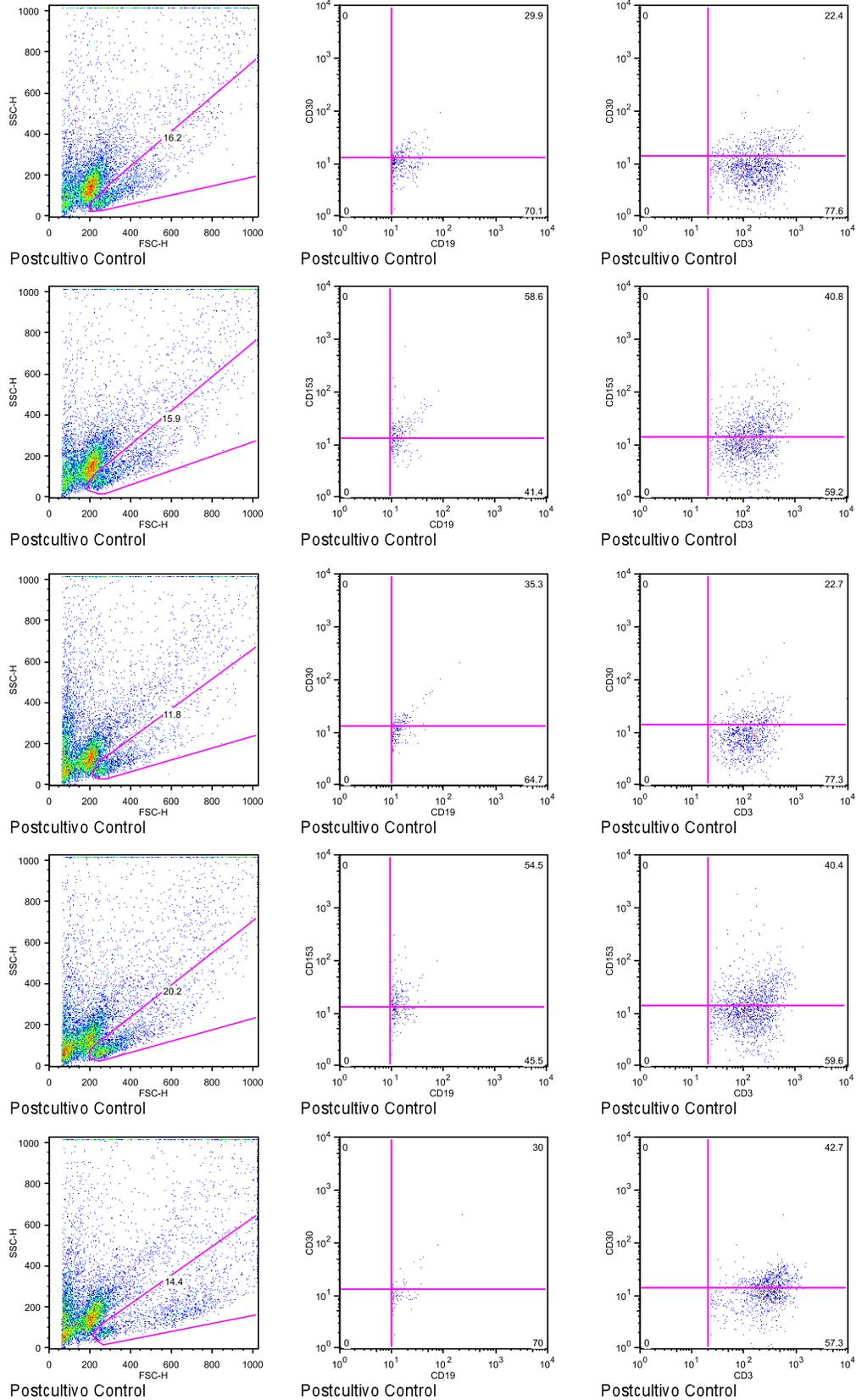


Imagen representativa de triple inmunofluorescencia Postcultivo



**Imagen representativa de triple inmunofluorescencia Postcultivo**