



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

EFFECTO DE ICOSL SOLUBLE EN LA PROLIFERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  E  
IL-4 EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANA LUISA LOPEZ-BAGO MARTÍNEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR RICARDO LASCURAIN LEDESMA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTORAL: DR EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTORAL: DRA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

EFFECTO DE ICOSL SOLUBLE EN LA PROLIFERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  E  
IL-4 EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANA LUISA LOPEZ-BAGO MARTÍNEZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTORAL: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTORAL: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de septiembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **LÓPEZ-BAGO MARTÍNEZ ANA LUISA** con número de cuenta **303502409**, con la tesis titulada **"EFECTO DE ICOSL SOLUBLE EN LA PROLIFERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  E IL-4 EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA"**, realizada bajo la dirección del **DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**:

Presidente: DRA. SARA HUERTA YEPEZ  
Vocal: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO  
Secretario: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
Suplente: DRA. ADRIANA KARINA CHÁVEZ RUEDA  
Suplente: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de diciembre de 2014

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. A la Facultad de Medicina de la UNAM  
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de CVU/Becario 440693/270085) y  
al Dr. Ricardo Lascurain, Edgar Zenteno y Gloria Soldevila, quienes formaron parte del  
comité tutorial.

Al Dr. Raúl Chávez, por las bromas de pasillo y las ideas reformatorias que en segundos construyen, por la cultura interminable.

Al Dr. Ricardo Lascurain, por las explicaciones y cuentos, por los juegos, por las risas y la confianza constante, por abrir la oportunidad de un trabajo apasionante.

Al Dr. Yonathan Garfias, por la estancia de un mes que duró un millón de años, por la paciencia y por la prisa, por los extensos análisis y por abrirse a las posibilidades.

A mi matemático de bolsillo, por salvar lo que parecía insalvable, por lo realmente significativo, por separar, dividir y normalizar, diseñar, descomponer y solucionar.  
A Jesús, por hacer exacta la citometría, por su calma interminable.

Al Doctor Edgar Zenteno, por abrir la puerta, pero sobre todo, por el principito.

A Luciana, al hacerlo bello.

Para papá

## ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	12
Hipótesis	14
Objetivos	14
Material y métodos	15
Resultados	20
Discusión	32
Conclusiones	35
Perspectivas	36
Abreviaturas	37
Literatura citada	38
Anexos	45

## RESUMEN

El asma es una enfermedad inflamatoria de la vía respiratoria inferior. Aproximadamente 70% de los casos se define como alérgica porque se asocia al incremento de IgE, involucrando la activación de eosinófilos, mastocitos, macrófagos y linfocitos Th2. Para mantener la respuesta inmune es necesario la presencia de ICOS, que es un coestimulador inducible expresado en los linfocitos T y su ligando (ICOSL) en las células presentadoras de antígeno. La unión de ICOS con ICOSL polariza la respuesta hacia un perfil Th2 incrementando los niveles de IL-4 e IL-5. Posterior al contacto de ICOS con su ligando se liberan de la membrana. Se ha observado que tanto ICOS como ICOSL soluble se encuentran incrementados en algunas enfermedades inmunológicas, como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. El objetivo de este trabajo fue Determinar el efecto de ICOSL soluble sobre la proliferación de células CD3+ y producción de IL-4 en pacientes con asma alérgica. Se reclutaron 43 pacientes que se dividieron en dos grupos: asma alérgica y no alérgica, que fueron comparados con 24 sujetos sanos. Se obtuvo el suero de muestras sanguíneas de sangre periférica y se realizaron dos pruebas ELISA para medir los niveles sanguíneos de ICOS e ICOSL. Para los cultivos celulares se obtuvo sangre de 6 pacientes asmáticos y 8 sujetos sanos, se separaron las células mononucleadas por gradiente de densidad y posteriormente se obtuvieron las células CD3+ por separación negativa utilizando perlas MACS. Se establecieron cultivos celulares en los que 72 horas midiendo la producción de IL-4, IFN- $\gamma$  y proliferación celular por citometría de flujo. Los resultados mostraron mayores niveles de ICOSL e ICOS ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente), en pacientes asmáticos en comparación con sujetos sanos. En paciente con asma alérgica tiene mayores niveles de ICOSL que el paciente con asma no alérgica y que el paciente sano. La variabilidad en las concentraciones es mayor en el enfermo que en el sano. La relación ICOS/ICOSL se encuentra incrementada en el paciente asmático. En presencia de ICOSL en el cultivo celular, los linfocitos de pacientes asmáticos produjeron mayor cantidad de IFN- $\gamma$ . Estos resultados confirman la importancia de ICOS e ICOSL en el asma y sugieren un mecanismo de regulación de la enfermedad, siendo potenciales biomarcadores de la misma.

## ABSTRACT

Asthma is an inflammatory disease of respiratory pathways that is characterized for a stimulus-dependent hyperreactivity. Approximately 70% of asthma cases correspond to allergic asthma, which is associated with serum IgE increase. The inflammatory response in asthma is as result from activity of eosinophils, mast cells, macrophages and T helper type 2 (Th2) cells. For maintenance of the immune response, expression of the inducible costimulator (ICOS) on T cells and its ligand, ICOSL on antigen presenting cells, are required. The ICOS-ICOSL binding cause polarization of immune response toward a Th2 profile with increase of IL-4 e IL-5 levels. After ICOS-ICOSL binding, a shedding occurs in the extracellular portion of both molecules, generating ICOS and ICOSL soluble forms, which increase in some immune diseases such as systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. In this work, our objective was to evaluate the effect of soluble ICOSL in T cell proliferation and IL-4 production in allergic asthma patients. Forty-three patients with asthma were recruited and divided in two groups formed by allergic and non-allergic asthma patients; in addition, a third group was constituted by 24 clinically healthy volunteer subjects (controls). Serum samples were obtained from whole blood from each participant; and two ELISA tests were performed to measure ICOS and ICOSL serum levels. For the cell culture, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from heparinized whole blood from 6 asthma patients and 8 healthy controls. CD3+ T cells were isolated from PBMCs by negative selection using magnetic microbeads-labeled antibodies in a MACS system. After 72 hours of T cell activation by anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies, the intracellular IL-4 and IFN- $\gamma$  cytokines were measured by flow cytometry. The results show significant increased level of ICOS and ICOSL in asthma patients in comparison to controls ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ). Allergic asthma patients showed increased ICOSL levels as compared with non-allergic asthma or control subjects. The variability in soluble ICOS and ICOSL concentrations was higher in patients than in control subjects. The ICOS/ICOSL ratio was increased only in asthma patients. With regard to cell cultures, soluble ICOSL induced higher IFN- $\gamma$  level in asthma patients than in other study groups. These results show that ICOS and ICOSL are important in asthma and suggest a regulatory mechanism, as well as being asthma potential biomarkers.

## INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad inflamatoria de la vía respiratoria inferior, caracterizada por un incremento de la reactividad frente a distintos estímulos. La inflamación en la vía respiratoria ocasiona broncoconstricción e incremento en la producción de moco, lo que culmina en dificultad respiratoria. Aproximadamente 70% de los casos de asma son asociados a un incremento de inmunoglobulina E (IgE), a este tipo de asma se le conoce como alérgica o extrínseca; el 30% restante se asocia a estímulos no inmunológicos como fármacos, ejercicio o temperaturas extremas, denominándose asma intrínseca(1).

### Epidemiología

Se ha observado un incremento en la prevalencia del asma en las últimas décadas (Figura 1), en Estados Unidos el número de personas con asma aumentó 2.9% cada año, de 20.3 millones de personas en 2001 a 25,700,000 personas en 2010. De los 25.7 millones, 7.0 millones eran niños y 18.7 millones eran adultos. Entre los adultos, 3.1 millones de personas de 65 años de edad o más tenían asma. De esos 25.7 millones de pacientes, 19.1 millones eran blancos, 4.7 millones eran negros, y 1.9 millones eran de otras razas (Figura 2, panel izquierdo)(2).

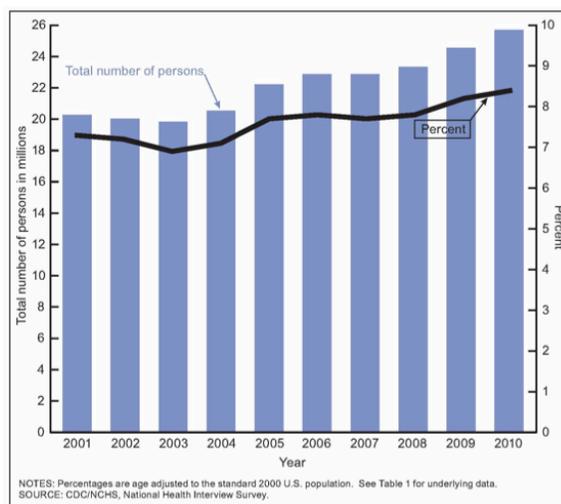
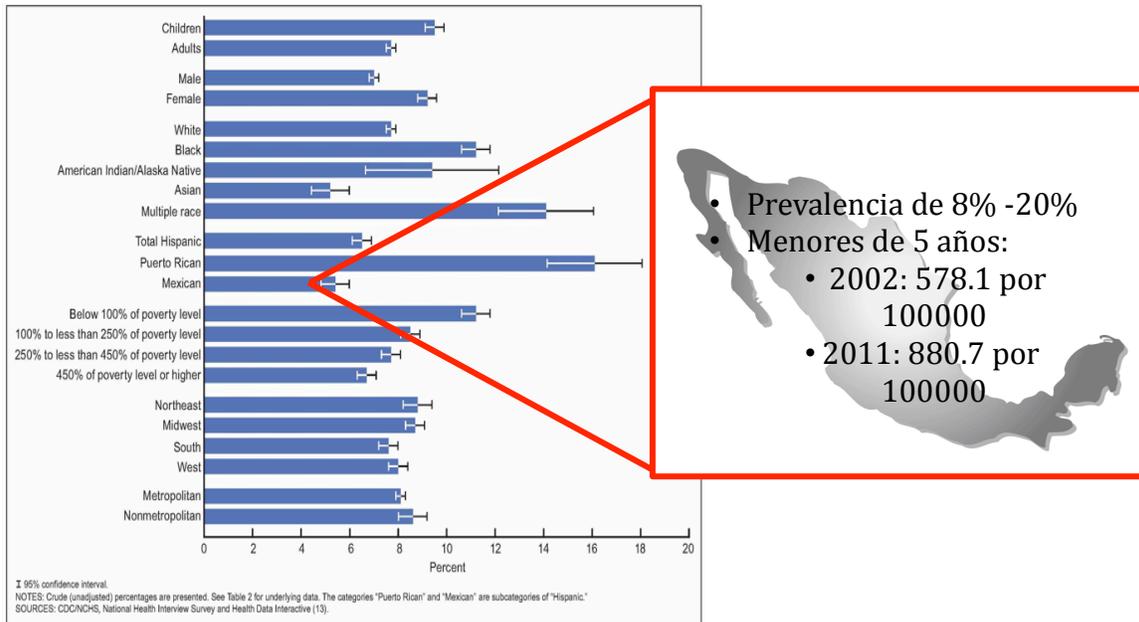


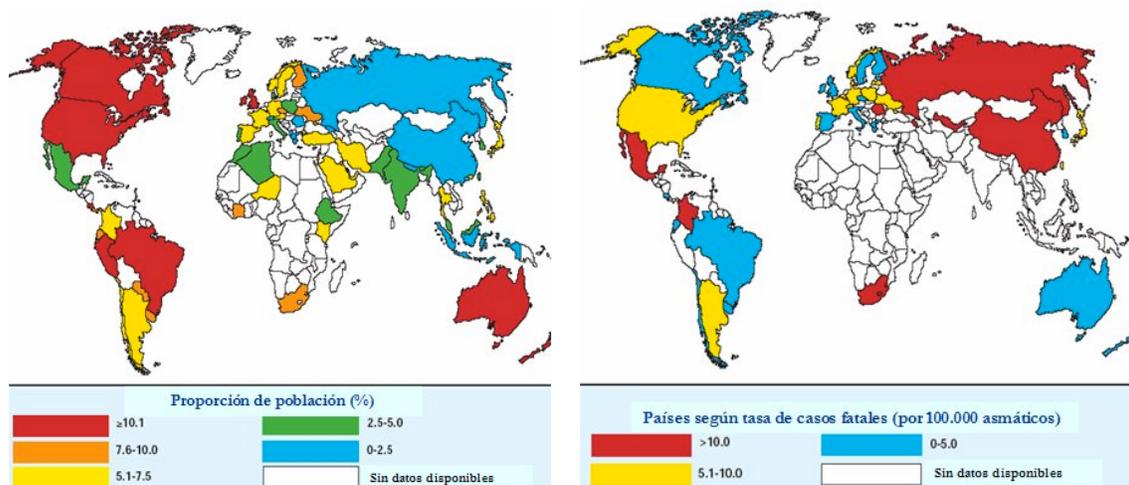
Figura 1. Prevalencia del asma en Estados Unidos del 2001-2010.



**Figura 2. Prevalencia del asma.** Panel izquierdo: Estados Unidos dividido por edad, sexo, raza, nivel económico y región geográfica. Panel derecho: prevalencia del asma en México.

En México, (Figura 2, panel derecho) mediante cuestionarios estandarizados en niños escolares de varias ciudades mexicanas, se observó una prevalencia de asma del 8-20%(3). Considerando como paciente asmático a la persona que acude a consulta por tos, sibilancias o disnea, o que se haya diagnosticado como asmático en el último año. Los datos proporcionados por el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, de la Secretaría de Salud, señalaron que en 2002 la tasa ajustada para asma en menores de 5 años de edad pasó de 578.1 por 100000 a 880.7 por 100000 en 2011 con un incremento del 52%(4).

El asma constituye una de las causas más frecuentes de ausentismo laboral y escolar, causando una gran pérdida de recursos en es sistema de salud. Hasta la fecha, el asma es diagnosticada por sintomatología y tratada de la misma forma, es decir con medicamentos para reducirla, manteniendo la enfermedad únicamente controlada. Esto refleja un desconocimiento de su fisiopatología y favorece una mayor morbilidad y mortalidad.



**Figura 3. Proporción de población asmática a nivel mundial (panel izquierdo), mortalidad por cada 100000 pacientes.**

Es importante resaltar, que en México a pesar de no ser de los países con más alta prevalencia (Figura 3, panel izquierdo), si es de los países con más alta mortalidad (Figura 3, panel derecho), lo que sugiere un mal diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad en el país(5).

### Fisiopatogenia del asma alérgica: Desarrollo de la respuesta $T_H2$

Clínicamente el asma se presenta como una disfunción fisiológica pulmonar, caracterizada por disnea, sibilancias y variable obstrucción de la entrada de aire. Esta respuesta exacerbada está dada por una hipersensibilidad de la vía respiratoria hacia algún alérgeno en particular. Para que se desarrolle la reactividad es necesario que se asocie la predisposición genética, denominada atopia; así como factores ambientales, es decir la presencia del antígeno. Éste ingresa al sistema cuando el paciente lo inhala, una vez dentro, es capturado por las células presentadoras de antígeno (APC) que se encuentran en el tracto respiratorio, estas células lo procesan y lo presentan a los linfocitos T mediante moléculas de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Una vez que los linfocitos T  $CD4^+$  lo reconocen, se diferencian a linfocitos  $Th2$  y con ello comienzan a secretar su característico patrón de citocinas (Tabla 1), entre las cuales se encuentran la IL-4, la cual inducirá un cambio de isotipo en el linfocito B, la IL-13 que incrementará la producción de moco por el

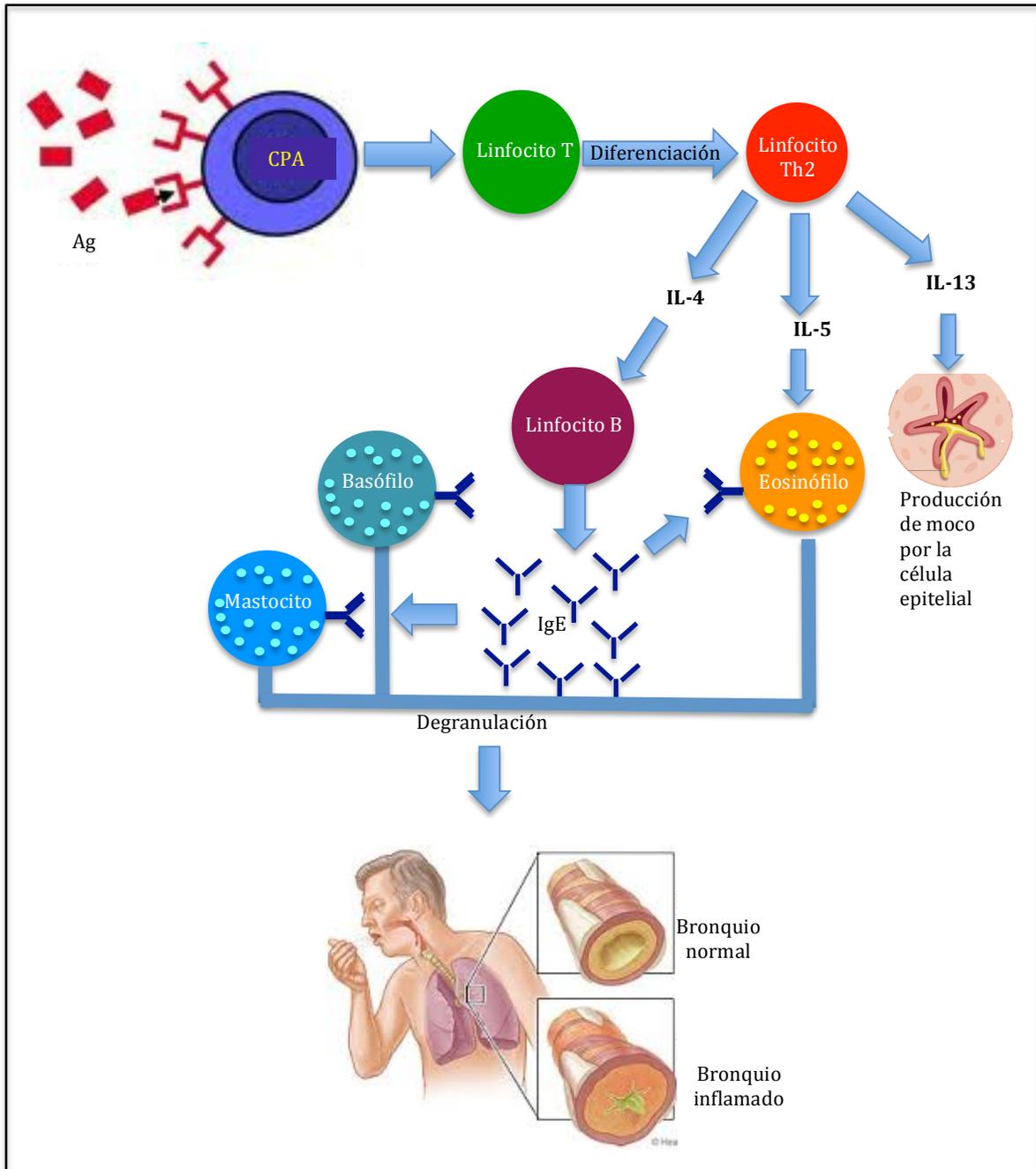
epitelio bronquial y la IL-5 que activará eosinófilos para que se degranulen y secreten los mediadores que desencadenarán la sintomatología del asma (Tabla 2 y Figura 4) (6, 7)(8).

<b>Interleucina</b>	<b>Funciones</b>	<b>Otros</b>
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estimula a la célula B para que realice cambio de isotipo a IgE.</li> <li>-Estimula la polarización de linfocitos T naïve a T<sub>H</sub>2.</li> <li>-Factor de crecimiento autócrino para los linfocitos T<sub>H</sub>2.</li> <li>-IL-4 + IL-13 activan macrófagos, reclutamiento de leucocitos, (principalmente eosinófilos) y promueven la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- También es producida por mastocitos</li> <li>-Receptor: IL-4R<math>\alpha\gamma_c</math>.</li> <li>-Señaliza por la vía JAK-STAT</li> </ul>
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activación y diferenciación de eosinófilos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- También es producida por mastocitos.</li> <li>-Señaliza por la vía JAK2-STAT3</li> </ul>
IL-13	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Incrementa la secreción de moco por el epitelio de la vía respiratoria.</li> <li>-Activación de macrófagos.</li> <li>-Actúa junto con la IL-4 para promover el cambio de isotipo a IgE y a reclutar leucocitos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>También es producida por basófilos, neutrófilos y NKT.</li> <li>-Receptor: Complejo IL-4R<math>\alpha\gamma_c</math>, IL-13R<math>\alpha_1</math> (Se une a IL-4 y a IL-13). El receptor se expresa en linfocitos B, fagocitos mononucleares, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales y del epitelio bronquial.</li> </ul>
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Promueve la diferenciación de linfocitos T<sub>H</sub>2.</li> <li>-Inhibe la supresión de las células Treg</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>También se produce por células epiteliales</li> </ul>
IL-9	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Incrementa la producción de moco</li> </ul>	

**Tabla 1. Principales citocinas de la respuesta T<sub>H</sub>2(7, 8)**

<b>Célula</b>	<b>Categoría</b>	<b>Mediador</b>	<b>Efecto</b>
Mastocitos y basófilos	Secretado por gránulos preformados	Histamine	Incremento de la permeabilidad vascular, contracción muscular,
		Enzimas: -Proteasas: Triptasa o quimasa -Hidrolasas ácidas, catepsina G, Carboxipeptidasas	Remodelación del tejido.
	Mediadores lipídicos producidos tras activación	Prostaglandina D <sub>2</sub>	Vasodilatación, broncoconstricción y quimiotaxis de neutrófilos.
Eosinófilos	Secretado por gránulos preformados	Leucotrienos C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub>	Broncoconstricción prolongada, secreción de moco, incremento de la permeabilidad vascular
		Factor activador de plaquetas (PAF)	Quimiotaxis y activación de leucocitos, broncoconstricción, incremento en la permeabilidad vascular
		Proteína básica mayor, proteína catiónica eosinófila, Peroxidasa eosinófila, hidrolasa lisosomal, lisofosfolipasa	Activa la respuesta inflamatoria. Remodelación y daño al tejido bronquial.
	Mediadores lipídicos producidos tras activación	Leucotrienos C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub>	Broncoconstricción prolongada, secreción de moco, incremento de la permeabilidad vascular

**Tabla 2. Mediadores producidos por granulocitos.**

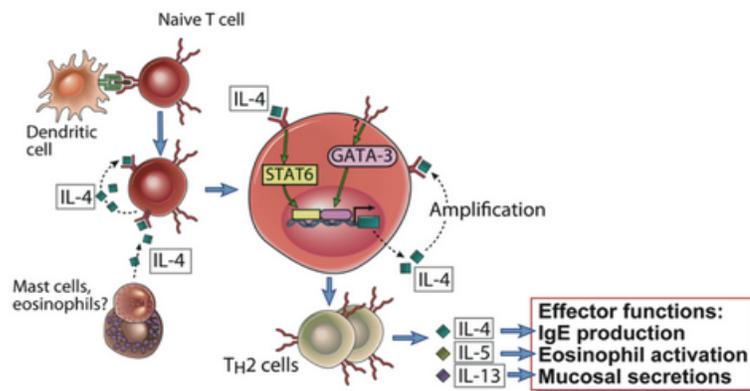


**Figura 4. Fisiopatología del asma.**

Para que este proceso se lleve a cabo, el linfocito T CD4<sup>+</sup> naïve, reconoce al antígeno asociado a MHC de clase II en la célula dendrítica, lo que provocará el cambio en la expresión de moléculas de superficie, la producción de citocinas y la expansión clonal, lo que origina que un gran número de células efectoras, es decir las células ya activadas, respondan a ese antígeno en particular(8).

Los linfocitos T efectores, se caracterizan por su habilidad en expresar moléculas de superficie y secretar citocinas que activaran otras células. Mientras los linfocitos T CD4+ naïve producen mayormente IL-2, las células T CD4+ efectoras son capaces de producir una gran variedad de citocinas que tendrán diversas funciones. Este proceso de diferenciación o polarización de los linfocitos T efectores, está dado por una gran cantidad de factores, especialmente por el ambiente de citocinas en el que está inmerso(8, 9).

Cuando hay contacto con un alérgeno o infecciones con helmintos, es necesario que los linfocitos T CD4+ secreten un patrón de citocinas tipo T<sub>H</sub>2; esta diferenciación es dependiente de IL-4, esto resulta interesante pues los mayores productores de IL-4 son los linfocitos T ya diferenciados. Antes de que esto ocurra, existen otras células que la secretan, por ejemplo mastocitos, basófilos y eosinófilos reclutados al área de inflamación, así como los linfocitos T estimulados con el antígeno secretan pequeñas cantidades de IL-4 en su activación inicial. Una vez que los linfocitos T se diferencian a T<sub>H</sub>2 la IL-4 que estos producen amplifica la respuesta e inhibe el desarrollo de otras estirpes de linfocitos T como T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>17. IL-4 estimula el desarrollo de linfocitos T<sub>H</sub>2 activando STAT6 e induciendo la expresión de GATA-3 (Figura 5) (8).



**Figura 5. Desarrollo de linfocito T<sub>H</sub>2.** La IL-4 producida por la célula T en respuesta al alérgeno presentado por la célula dendrítica, activará la transcripción de GATA-3 y STAT6 lo que estimula la diferenciación de linfocito T CD4+ Naïve a T<sub>H</sub>2.(8)

## Coestimuladores en la activación de linfocitos T

La proliferación y diferenciación del linfocito T requiere dos señales, la primera confiere especificidad en la respuesta inmune y se da por el reconocimiento del complejo principal de histocompatibilidad en la superficie de la célula presentadora de antígeno por el TCR de la célula T. La segunda señal está dada por moléculas coestimuladoras. Estas moléculas están divididas en dos familias: La familia B7:CD28, incluye a CD28, PD-1, CTLA-4 e ICOS; y la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), en donde se encuentran OX40 y CD30. Todas las señales coestimuladoras tienen particular efecto en activación, función, sobrevivencia y se han visto implicadas en enfermedades inflamatorias de respuesta inmediata.(10, 11) En ausencia de esta segunda señal, la célula T no responderá correctamente y entrará en un estado de anergia o muerte por apoptosis.(8, 11, 12)

La familia mejor caracterizada de las moléculas coestimuladoras es la B7:CD28 (Figura 5), dentro de la cual se encuentra el coestimulador inducible del linfocito T (ICOS).(8, 13)

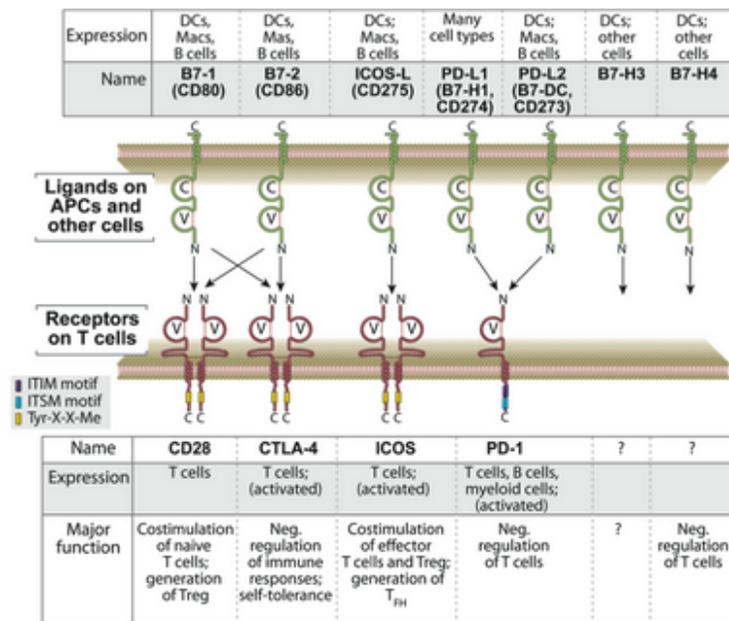


Figura 6. Familia B7:CD28.

## Sistema ICOS:ICOSL

ICOS es el coestimulador inducible del linfocito T, es una proteína transmembranal tipo 1 de 199 aminoácidos, homodimérica, con un dominio extracelular IgV-like,(10) pesa 55-60 kDa y tiene dos subunidades N-glicosiladas comparte un 39% de homología con CD28, es inducida tras la activación del linfocito T. La estimulación vía CD28 es indispensable para inducir la expresión de ICOS en la superficie de las células T estimuladas por antígeno.(14) A pesar de la alta homología que tiene ICOS con CD28, ICOS carece del motivo MYPPPY (Metionina, tirosina, prolina, prolina, prolina, tirosina) el cual, es requerido para la unión de CD28 y CTLA-4 a sus receptores, por lo que ICOS no se unirá a estos.(12)(15, 16) ICOS se expresa específicamente en el linfocito T, es inducida tras 24-48 horas posterior a su activación(10), tiene especial importancia en la ontogenia del linfocito T y en la inducción de la proliferación;<sup>15</sup> se expresa predominantemente en el centro germinal, observándose una función determinante en la formación de éste, su expresión es baja en linfonodos de ratones normales, pero es detectable inmediatamente en la zona T (paracorteza) de ratón sensibilizado con oxazolona.(16, 17)

El ligando de ICOS (ICOSL), es una proteína de dos dominios compuesta por un dominio distal de membrana tipo IgV y uno proximal IgC. Tiene un dominio libre de cisteína en el dominio IgC extracelular. Se presenta como monómero o como dímero de forma constitutiva en la superficie celular de linfocitos B, células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos T y células epiteliales en condiciones de inflamación(18). Tiene una homología del 20% con CD80 y CD86, pero como se mencionó no interactúa con CD28 o CTLA-4, únicamente interactúa con ICOS.(18, 19)

El dominio IgV de ICOSL al unirse,(18) provoca una gran cantidad de funciones en el linfocito T, por ejemplo, induce su proliferación y el desarrollo de distintas estirpes: se ha observado que niveles intermedios de ICOS se asocian con alta producción de citocinas Th2, mientras que niveles elevados se asocian con un incremento de IL-10, tiene un papel esencial en el desarrollo y función de linfocitos Treg, así como una alta expresión en linfocitos T de memoria. (15)

## ANTECEDENTES

En el asma, el reclutamiento y diferenciación del linfocitos T son elementos críticos para que se desarrolle la enfermedad. Los aspectos que regulan esta función aún no se comprenden del todo, sin embargo la producción de citocinas  $T_H2$ , es indispensable para que se presente.(20) La polarización del linfocito T está dada en gran medida por la señalización que induce la APC mediante moléculas coestimuladoras. Incluso su inhibición en la superficie membranal del linfocito T o en la transducción de señales, tiene como resultado una falla en la respuesta celular. Se ha observado que ICOS e ICOSL tienen un papel esencial en el desarrollo de la alergia, por ejemplo la producción de citocinas  $T_H2$  por células de memoria y efectoras, es altamente dependiente de la vía de ICOS/ICOSL. El bloqueo de esta vía o la disrupción génica reduce significativamente el asma alérgica en un modelo murino.(15) Se ha observado que células depletadas para ICOS, produjeron  $IFN-\gamma$  e IL-10, pero no IL-4. Si a este mismo cultivo se le adiciona IL-4 e  $IFN-\gamma$ , se recupera la producción de IL-4, promoviendo la diferenciación a  $T_H2$ . Este antecedente indica que ICOS no es necesario para la diferenciación, pero sí para el mantenimiento de esta respuesta así como para regular la producción de citocinas.(10, 21)

ICOS es esencial en el reclutamiento de células B y en el cambio de isotipo a IgE. La transferencia de células T con expresión alta de ICOS, seguida de un reto con un alérgeno, induce infiltración de células B y T, con la consecuente producción de IgE específica de antígeno; la transferencia de células depletadas para ICOS da como resultado menor número de células B con ausencia de producción de IgE local.(10)

Posterior al contacto de ICOS con su ligando, ocurre el corte en el dominio extracelular del ligando por una serin proteasa que lo libera de la membrana del linfocito B, dejando a ICOSL soluble. El ectodominio cortado de ICOSL es funcionalmente significativo, pues puede limitar a células presentadoras de antígeno para llevar a cabo su función.(22)

En estudios anteriores se ha observado que los niveles de ICOS soluble se encuentran incrementados en enfermedades de índole inmunológico como el Lupus Eritematoso Sistémico, los niveles de éste tienen una relación directa con la gravedad de la enfermedad.(10, 23) En alergias, como el asma o la dermatitis atópica, se ha encontrado que los niveles de algunas moléculas coestimuladoras en su forma soluble están

incrementados, como CD86, esta forma es producida mayormente por monocitos circulantes y puede unirse a CD28 o CTLA-4.(10, 24, 25) Los niveles de CD86 séricos se reducen tras la administración de glucocorticoides sistémicos.(23) La escisión de moléculas coestimuladora y sus funciones biológicas se han descrito bien en otros sistemas, por ejemplo, en el caso de CD25, se ha observado que la liberación de CD25 soluble por las células Treg disminuye la cantidad de IL-2, funcionando como un efecto regulador del mismo sistema.(26) Los efectos de ICOS e ICOSL soluble en asma alérgica no han sido esclarecidos, Wang J. y colaboradores, utilizando un modelo murino de asma alérgica, se observó que tras la administración de ICOS-Ig los ratones presentan una disminución en las cantidades de IgE circulante, por lo que ICOS en su forma soluble podría tener una función regulatoria.(27) Se sugiere que la liberación de ICOSL de la membrana, posterior a su interacción con ICOS, se encuentre incrementado y tenga un efecto regulador de la respuesta inmunológica en pacientes con asma alérgica.

## **HIPÓTESIS**

ICOSL soluble disminuye la proliferación y síntesis de IL-4 en células CD3+ de pacientes con asma alérgica.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de ICOSL soluble sobre la proliferación de células CD3+ y producción de IL-4 en pacientes con asma alérgica.

### **Objetivos particulares**

1. Medir los niveles de ICOSL e ICOS séricos en pacientes con asma alérgica y asma no alérgica.
2. Evaluar el efecto de ICOSL soluble en la proliferación de linfocitos T de pacientes con asma alérgica.
3. Evaluar el efecto de ICOSL soluble en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfocitos T de pacientes con asma alérgica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes fueron reclutados del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cossío Villegas. Los controles son estudiantes de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ambos grupos firmaron una carta de Consentimiento Informado aprobada por el instituto. Los controles son estudiantes de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Criterios de Inclusión:**

1. Pacientes de cualquier género (masculino o femenino)
2. Asma moderado persistente
3. Edades de 18 a 30 años
4. IgE mayor a 100UI/ml
5. Eosinófilos igual o mayor al 5% en sangre
6. Pruebas cutáneas positivas
7. Periodo de lavado mayor a 4 semanas para esteroides sistémicos

### **Criterios de Exclusión:**

Pacientes que presenten:

1. Inmunodeficiencias
2. Enfermedades metabólicas
3. Enfermedades tumorales
4. Autoinmunidad
5. Neumopatías crónicas
6. Que hayan tenido inmunoterapia

### **Criterios de Eliminación:**

1. Muestra sanguínea insuficiente.
2. Coproparasitoscópico positivo

### **Reactivos**

Los anticuerpos agonistas anti-CD3 (clona OKT3) y anti-CD28 (clona CD28.2), se obtuvieron de eBioscience (San Diego, CA, EUA). Los anticuerpos anti-IFN $\gamma$  conjugado a

PE/Cy7 (clona 4S.B3), anti-IL4 conjugado a PE (clona 8D4-8) fueron obtenidos de Becton, Dickinson (New Jersey, EUA). Todos los anticuerpos utilizados fueron contra moléculas de células humanas. La proteína recombinante humana para ICOSL (CD275) se obtuvo de Sino Biological Inc., (Beijing, China). El medio de cultivo RPMI-1640 y el colorante CFSE se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, California, EUA); los compuestos azul tripano, paraformaldehído, suero fetal bovino y las sales utilizadas para la preparación de los amortiguadores, fueron proveídos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El lymphoprep fue obtenido de Axis-Shield (Oslo, Noruega). Los antibióticos penicilina y estreptomina, fueron de Biowhittaker (Radnor, PA, EUA). Las perlas de separación para negativa para linfocitos CD3+ fueron obtenidas de Miltenyi Biotec (Cologne, Alemania). Los reactivos para el marcaje de citocinas intracelulares fueron obtenidos de BioLegend (San Diego, CA, EUA). Los inmunoensayos ELISA para ICOS e ICOSL fueron obtenidos de Uscn Life Science Inc. (Houston, TX, EUA).

### **Separación de células mononucleadas de sangre periférica**

Se obtuvieron 15 ml de sangre venosa periférica en tubos con EDTA manteniéndola a 4°C durante su transporte. La sangre fue centrifugada durante 5 min, a 1500 rpm, con una micropipeta se colectó el suero y se conservó a -70°C hasta su uso. El resto de la sangre, fue diluida en una relación 1:1 con solución amortiguadora salino fosfato (PBS), estéril, pH 7.3 y se depositó cuidadosamente en un tubo cónico de 15 ml previamente adicionado con Lymphoprep, en una relación 3 ml de sangre por 1 ml de Lymphoprep, de forma que la sangre no se mezclara con éste. La mezcla fue centrifugada a 1500 rpm, 20°C durante 30 min. Terminado este tiempo las células mononucleadas se recuperaron de la interfase entre el suero y el Lymphoprep, y fueron lavadas con PBS (centrifugación a 1500 rpm durante 5 min, 4°C, descartando el sobrenadante)(28). Posterior al lavado, las células se resuspendieron en 1 ml de PBS para cuantificarlas en un hemocitómetro, y analizar viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul de tripano.(29)

### **Separación negativa de células CD3+**

Posterior a la separación y cuenta de células mononucleadas de sangre periférica, se realizó una separación negativa de las células CD3+ con perlas MACS, para la cual despues de haber obtenido las células mononucleadas de sangre periférica, se incubaron con el

anticuerpo 1 (Pan T Cell Biotin Antibody Cocktail) durante 10 min en frío, en la misma solución se incubaron con el anticuerpo 2 (Microbead Cocktail) durante 15 minutos en frío. Posteriormente se pasó la solución por la columna magnética, colocada previamente en la base metálica.

#### **Método de tinción con succimidilester de carboxifluoresceína (CFSE)**

Se agregaron 15  $\mu$ l de CFSE a una concentración de 0.5 mM para teñir  $1 \times 10^7$  células diluídas en 1 ml de PBS, si el número de células era superior se realizaba la relación correspondiente. Se incubaron por 15 min en agitación suave, a temperatura ambiente y en oscuridad. Terminada la incubación, fueron agregados 8 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Para verificar que las células hubieran captado el colorante correctamente, fueron observadas en microscopio óptico equipado con epifluorescencia.(30)

#### **Cultivo de células CD3+ de sangre periférica**

El anticuerpo anti-CD3 se utilizó a una concentración subóptima de 0.05  $\mu$ g/ml, se tomaron 50  $\mu$ l de estas concentraciones, añadiéndolos a cada uno de los 96 pozos de la placa, el rh ICOSL se utilizó a dos concentraciones, 200 o 400 ng. La placa fue incubada durante 4 horas a 37°C. Al término de la incubación el sobrenadante fue retirado con una micropipeta. Se adicionaron  $2 \times 10^5$  células mononucleadas, previamente teñidas con CFSE y suspendidas en 200  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, previamente deplementado (incubación a 56°C durante 20 min) y antibióticos (penicilina 10, 000 UI/ml, estreptomocina 10,000 UI/ml). Se agregó anti-CD28 a una concentración de 1  $\mu$ g/ml a cada pozo. Las células se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de humedad durante 72 horas. 5 horas antes de cosecharlas se adicionó PMA, a una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL utilizando 5  $\mu$ l, Ionomicina a 5  $\mu$ g/mL, utilizando 8  $\mu$ l. Después de una hora se adicionó Brefeldina a una concentración de 500  $\mu$ g/mL, utilizando 4  $\mu$ l. (31)

### **Inmunofluorescencia**

Al término del cultivo las células fueron recuperadas de la placa mediante resuspensión con micropipeta y un lavado con 200 µl de PBS frío. Las células fueron lavadas y posteriormente fijadas y permeabilizadas siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente fueron incubadas con anticuerpos anti-IFN y anti- IL-4 durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad.

### **Citometría de flujo**

Las células tratadas con anticuerpos fluorescentes y CFSE fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACScalibur (San José, CA, EUA). El análisis se realizó mediante gráficas de tamaño contra complejidad celular, donde se regionalizó la población de células linfoides, de esta región se hicieron gráficas divididas por cuadrantes para las células reconocidas por los anticuerpos fluorescentes. Las gráficas fueron nuevamente analizadas con el programa FlowJo 8.7 (Tree Star, Inc. Ashland, OR, EUA).

### **ELISA de ICOS e ICOSL**

Se obtuvo sangre de 54 pacientes con asma, los cuales fueron divididos en dos grupos, asma alérgica 29 pacientes (pacientes con pruebas cutaneas negativas) y asma no alérgica 25 pacientes (con pruebas cutaneas negativas). Se incluyeron 24 sujetos clínicamente sanos. De cada sujeto se obtuvieron 7 ml de sangre venosa periférica, la cual se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm. Con una micropipeta se colectó el suero y se mantuvo a -70°C hasta su uso. Se realizaron los ensayos ELISA correspondientes para cada molécula siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Análisis estadístico**

Para comparar la concentración sérica de ICOS e ICOSL medido mediante el ensayo de ELISA en el grupo Sano y Asmático, se realizó una *t* de Student para dos medias independientes. Adicionalmente, se obtuvieron los histogramas de la distribución de frecuencias del nivel sérico de cada molécula de acuerdo a los grupos evaluados.

Por otra parte, la concentración de ambas moléculas se comparó entre el grupo Sano vs. Asma alérgica y Asma no alérgica mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía

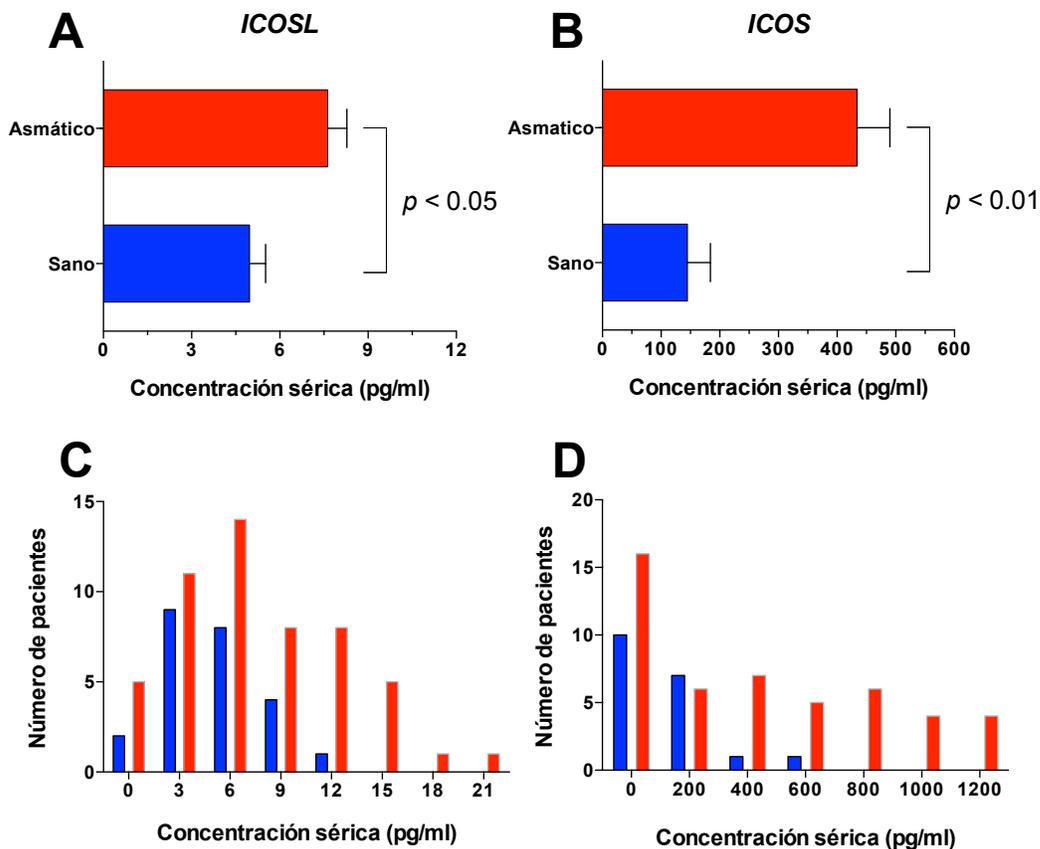
seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para comparar la distribución de la concentración sérica de ICOS e ICOSL entre los grupos se ajustaron curvas tipo Gaussianas. A partir del ajuste de los datos experimentales se obtuvieron los parámetros descriptivos de cada grupo.

Finalmente, para determinar el efecto de ICOSL sobre la proliferación celular, así como la producción de IFN- $\gamma$  e IL4, se utilizó ANOVA de dos vías seguida de la prueba *post hoc* Holm-Sidak. Dentro del modelo se incluyó el efecto de la disponibilidad de ICOSL (soluble, inmovilizado y soluble/inmovilizado) y el grupo evaluado (sano y asmático). En cualquier caso se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

## RESULTADOS

### Evaluación de los niveles séricos de ICOS e ICOSL en pacientes con asma.

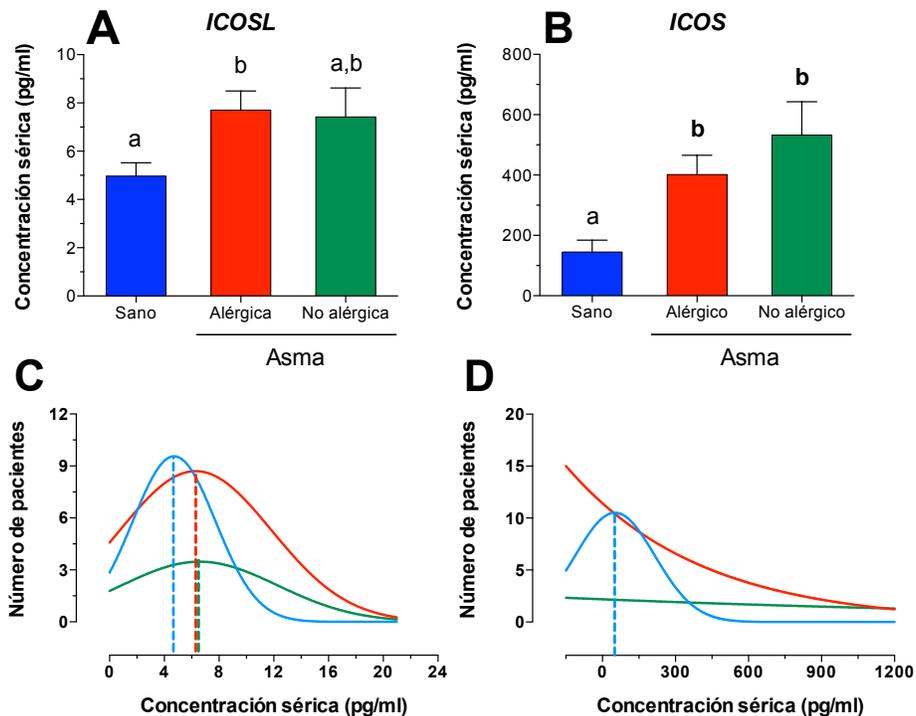
La concentración de ICOS e ICOSL en el suero de pacientes con asma alérgica y no alérgica, Se realizó un ELISA. La comparación de resultados indicó que los pacientes asmáticos, tienen un incremento significativo en la concentración de ICOSL ( $7.6 \pm 4.7$  vs  $4.9 \pm 2.6$  pg/ml, respectivamente, Fig. 1A;  $p < 0.01$ ) e ICOS ( $434.1 \pm 386.7$  vs  $145.1 \pm 170.2$  pg/ml, respectivamente, Fig. 1B;  $p < 0.05$ ) con respecto a los individuos sanos. A partir de las distribuciones de frecuencias de los coestimuladores para ambos grupos se realizaron histogramas, en los cuales se observa un desplazamiento a la derecha para ambas moléculas en el caso de los pacientes, así como una mayor variabilidad en las concentraciones de ambas moléculas para los asmáticos.



**Figura 1.** Los pacientes asmáticos tiene mayor cantidad y variabilidad en la concentración de ICOS e ICOSL séricos. Comparación de la concentración sérica de ICOSL (A) e ICOS (B) y distribución de las moléculas (C y D) en pacientes con asma y sujetos sanos. Los grupos se compararon mediante una T de Student para dos medias independientes. Los datos muestran la media $\pm$ SE (n=54).

El incremento diferencial de cambio de ICOSL es de 1.5 y de ICOS es de 2.99

Se realizó un análisis comparativo en el cual se agruparon los pacientes con asma alérgica y no alérgica, y comparados con los sujetos sanos. Se observó mayor concentración de ICOSL para los pacientes con asma alérgica, comparados con los sujetos sanos ( $7.7 \pm 4.8$  vs  $4.9 \pm 2.6$  pg/ml, respectivamente, Fig. 2<sup>a</sup>,  $p < 0.05$ ) y una mayor concentración de ICOS en los pacientes con asma alérgica y no alérgica en comparación con los sujetos sanos ( $401.4 \pm 387.3$  vs  $532.3 \pm 384$  vs  $145.1 \pm 170.2$ , respectivamente, Fig. 2B,  $p < 0.05$ ). Se realizaron ajustes mediante curvas Gaussianas sobre la distribución de frecuencias de cada coestimulador. La distribución generada por los cambios que existen en la concentración de cada grupo es normal para ICOSL en los tres grupos, observando un desplazamiento a la derecha en los pacientes asmáticos (Cuadro 1 y Fig. 2C). En el caso de ICOS se observa una mayor variabilidad en la concentración de la molécula en el caso de los enfermos, sin apreciar una distribución normal para estos (Cuadro 1 y Fig. 2D).

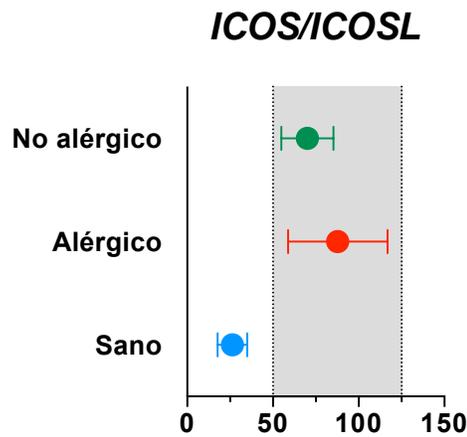


**Figura 2. ICOSL se encuentra elevado en pacientes con asma alérgica e ICOS en pacientes con asma alérgica y no alérgica.** Comparación de la concentración sérica de ICOS (A) e ICOSL (B). Se realizó un análisis de varianza seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, Curvas de distribución de ICOSL (C) e ICOS (D). Los datos muestran la media±SE (n=54).

	ICOSL			ICOS		
	Sano	Asma alérgica	Asma no alérgica	Sano	Asma alérgica	Asma no alérgica
<b>Media</b>	4.7	6.2	6.5	51.64	--	--
<b>Desviación estandar</b>	3.03	5.55	5.7	164.1	3919	10749
<b>R<sup>2</sup></b>	0.97	0.81	0.78	0.99	--	--

**Cuadro 1. ICOSL tiene una distribución normal en ambos grupos. ICOS no presenta una distribución normal.**

La proporción de ICOS/ICOSL observada es mayor en los pacientes con asma alérgica con respecto a los pacientes con asma no alérgica y a los sujetos sanos ( $87.86 \pm 171.4$  vs  $70.10 \pm 52.74$  vs  $26.35 \pm 35.86$ , respectivamente, Fig. 3).

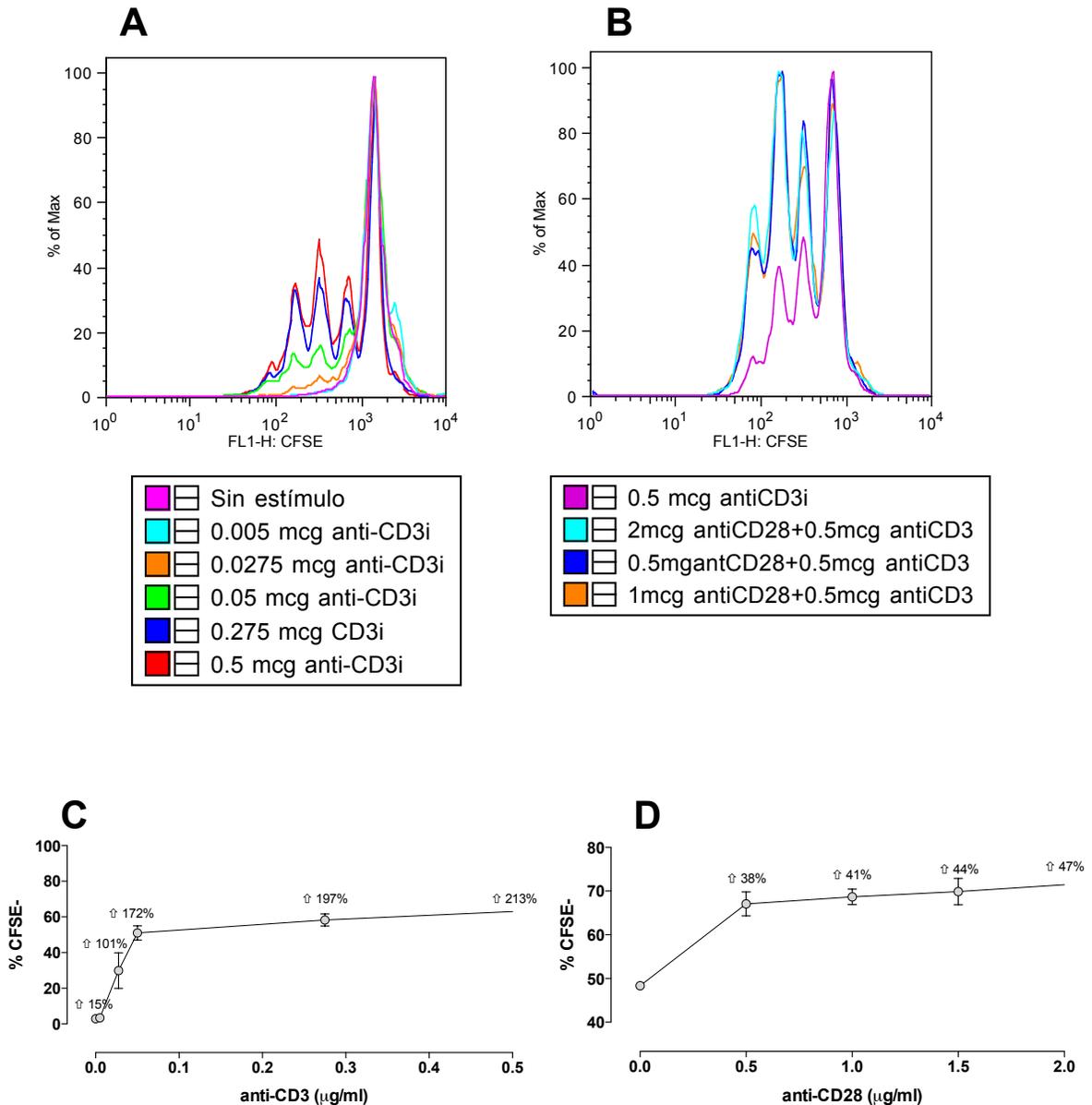


**Figura 3. Los pacientes asmáticos tiene una mayor proporción de ICOS/ICOSL.** Comparación de la proporción ICOS/ICOSL de los sujetos sanos, pacientes con asma alérgica y asma no alérgica. Los datos muestran la media±SE (n=54).

Se realizó un análisis de correlación entre los niveles de IgE e ICOS e IgE e ICOSL, no se obtuvo una correlación entre ninguno.

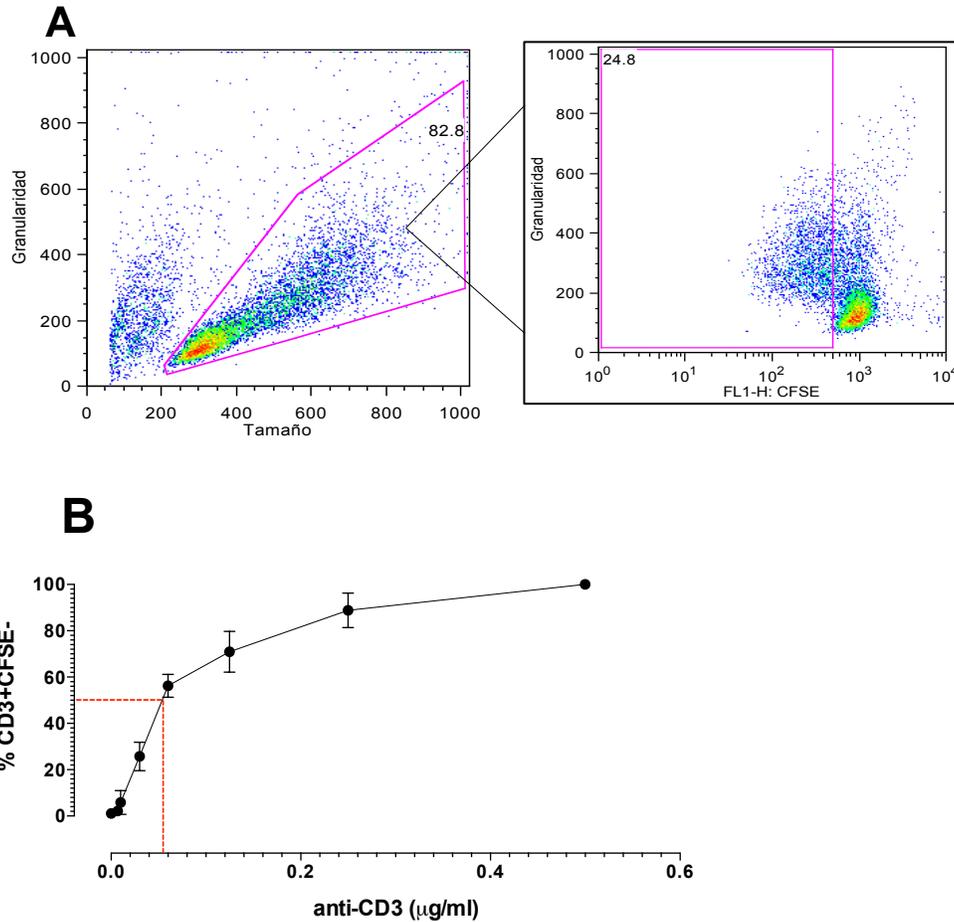
## Activación de células mononucleadas de sangre periférica con anti-CD3/CD28.

Para establecer la dosis óptima de los anticuerpos anti-CD3/CD28 en la proliferación celular, se establecieron cultivos celulares en donde se utilizaron distintas dosis de anti-CD3i: de 0.005 a 0.5  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 4A) y anti-CD28: 0.5 a 2  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 4B). Para el análisis se hizo una región correspondiente a linfocitos y linfoblastos en las gráficas de tamaño (FSC-H) contra granularidad celular (SSC-H) y se evaluó la pérdida de CFSE debido a la división celular. Los resultados mostraron que la dosis adecuada fue de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de anti-CD3i (Figura 4C) con 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-CD28 (Figura 4D).



**Figura 4: Las células mononucleadas de sangre periférica proliferan con 0.5 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 y 1 µg/ml CD28.** Histogramas representativos de proliferación celular a distintas dosis de anti-CD3i (A) y anti-CD28 (B). Curva dosis-respuesta en donde se muestra un índice porcentual de proliferación celular de cada dosis con respecto a la ausencia de estímulo, utilizando las mismas concentraciones de anti-CD3i (C) y anti-CD28 (D).

Para establecer la dosis subóptima de los anticuerpos anti-CD3/CD28 se realizaron cultivos celulares, en donde a partir de las dosis óptimas obtenidas, se utilizaron dosis menores de anti-CD3i, de 0.007 a 0.5 µg/ml; y anti-CD28 1 µg/ml. Para el análisis se hizo una región correspondiente a linfocitos y linfoblastos en las gráficas de tamaño (FSC-H) contra granularidad celular (SSC-H). A partir de esta región se evaluaron las células teñidas con CFSE, con respecto a la pérdida del colorante debido a la división celular (Figura 5A). Posterior al análisis dosis-respuesta, se obtuvo que la dosis efectiva 50 fue de 0.05 µg/ml de anti-CD3 con 1µg de anti-CD28 (Fig. 5B).

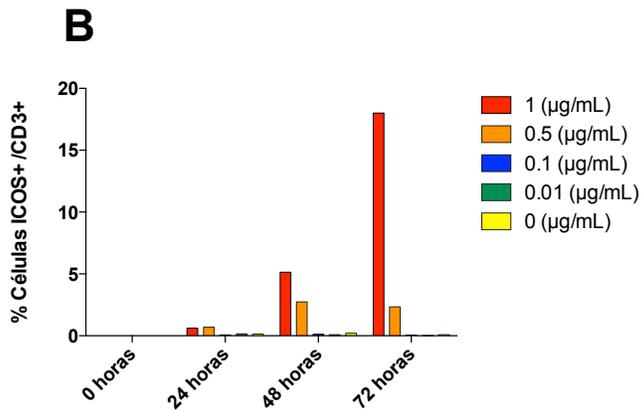
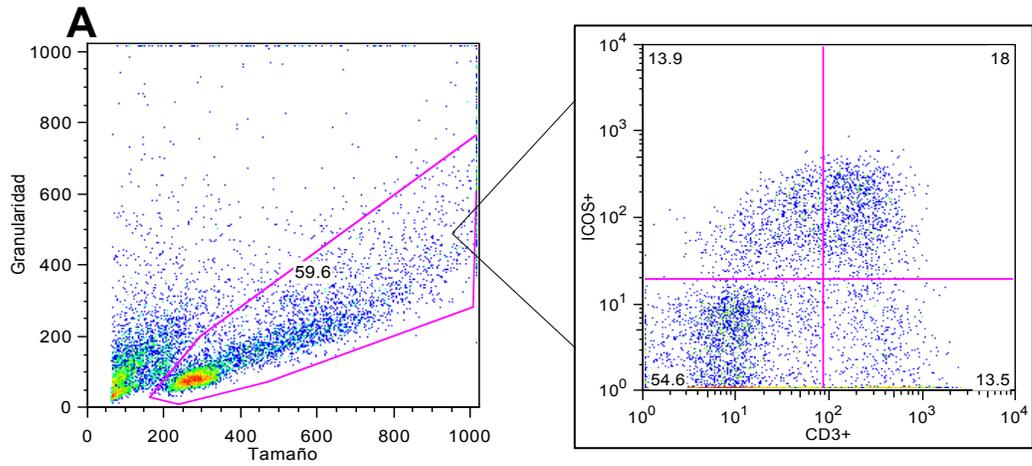


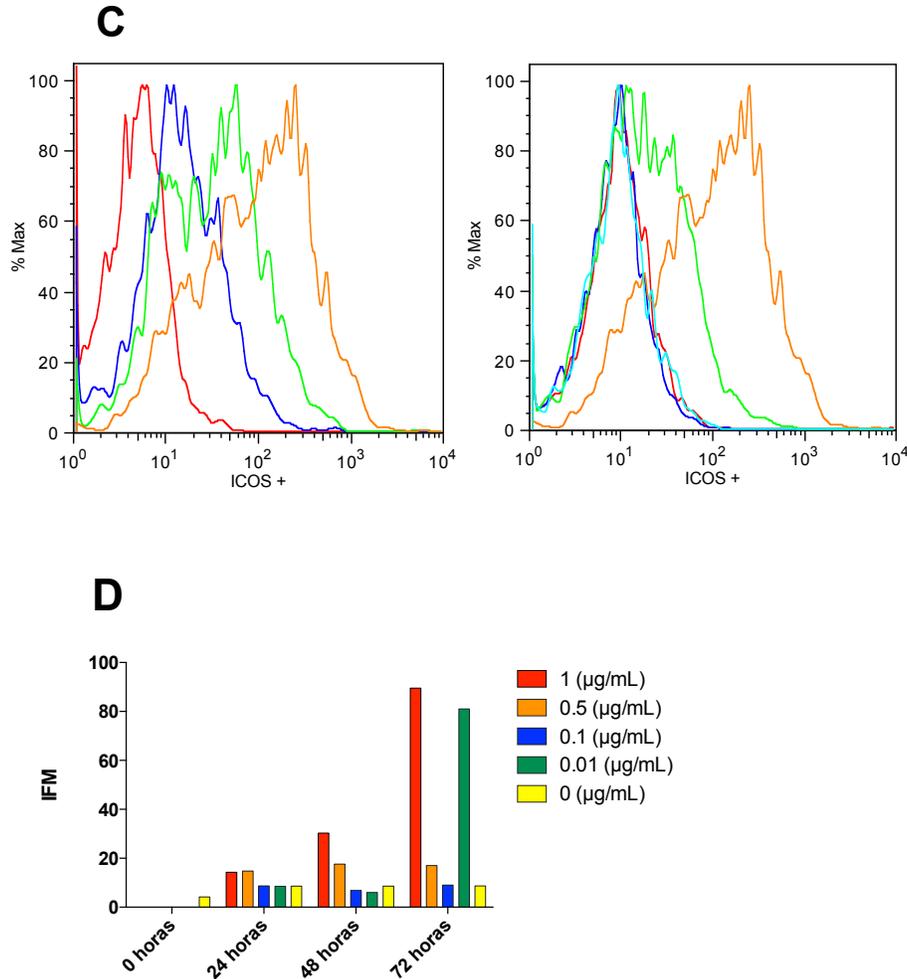
**Figura 5. La DE50 de anti-CD3i es de 0.05 µg/ml.** (A) Gráfica de puntos de citometría de flujo de células mononucleadas cultivadas con 0.05 µg/ml de anti-CD3i. Los análisis se realizaron mediante gráficas de tamaño contra granularidad celular (paneles izquierdo), la región corresponde a linfocitos y linfoblastos. A partir de éstas, se evaluó la pérdida de colorante CFSE (paneles derechos), indicando el porcentaje de células que se dividieron (cuadrante izquierdo). (B) Curva dosis-respuesta en donde se muestra las concentraciones utilizadas de anti-CD3i y el índice de proliferación de las células CD3, la línea roja marca la DE50= 0.05-0.1.

### Expresión de ICOS en linfocitos CD3+, estimulando con diferentes dosis de anti-CD3i y 1 µg de anti-CD28 a diferentes tiempos.

Para establecer la dosis y tiempo óptimos de anti-CD3 para obtener la mayor expresión de ICOS, se realizaron cultivos celulares con dosis subóptimas de anti-CD3i y las células se incubaron con anticuerpos anti-ICOS conjugados a FITC y anti-CD3 conjugados a PeCy5.5. Para el análisis se hizo una región correspondiente a linfocitos y linfoblastos en las gráficas de tamaño (FSC-H) contra granularidad celular (SSC-H) y se evaluaron las células tratadas con los anticuerpos fluorescentes. Los resultados mostraron que

estimulando las células con 1  $\mu\text{g}$  de anti-CD3 y 1  $\mu\text{g}$  de anti-CD28 durante 72 h se obtiene la mayor expresión de ICOS en linfocitos CD3+, como ha sido reportado por Nie y cols.(32) Este incremento se observa tanto en porcentaje de células ICOS+ (Figura 6A y B) como en densidad de expresión (Fig. 6 C y D).



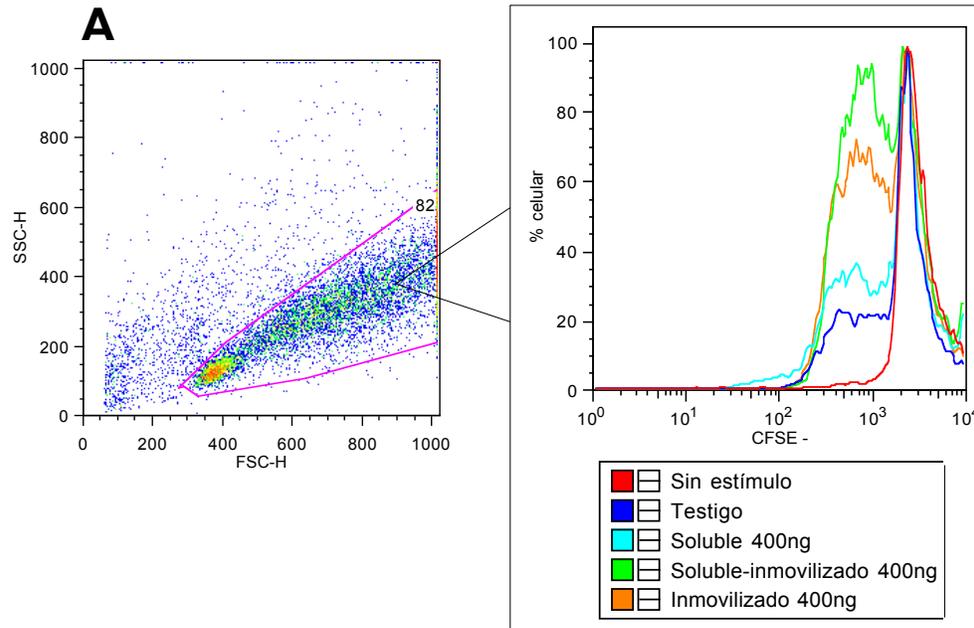


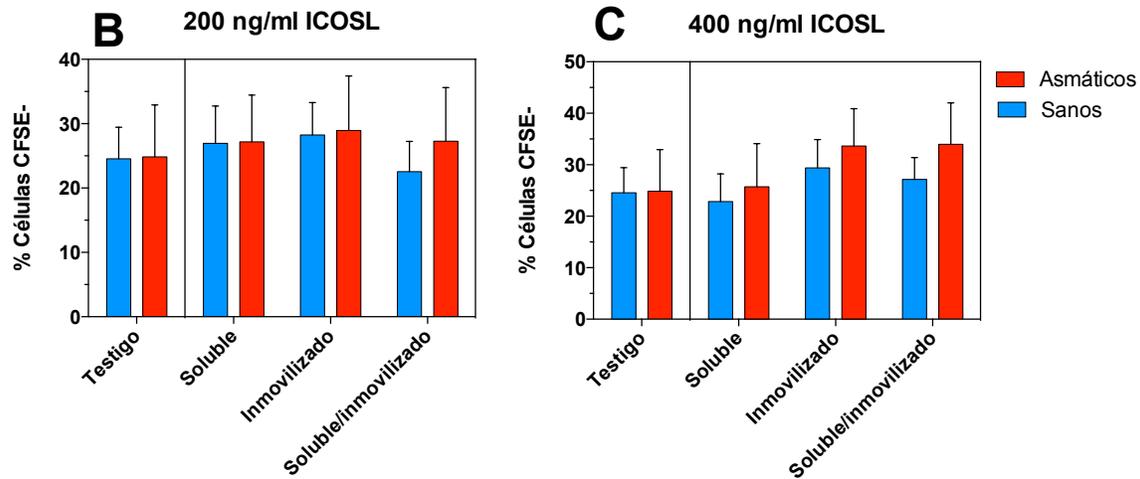
**Figura 6:**

**La mayor expresión de ICOS en células CD3+ se obtiene estimulando con 1µg anti-CD3/CD28 a las 72 horas de cultivo.** a) Gráficas de puntos de citometría de flujo, a partir de una de tamaño contra granularidad celular (paneles izquierdos), se regionalizaron los linfocitos activados, a partir de ésta se evaluó la expresión de ICOS conjugado a FITC y CD3 conjugado a PECy5.5. La imagen es representativa de 2 ensayos independientes. b) Gráfica de columnas que muestra el porcentaje de células CD3+ICOS+ que fueron estimuladas a distintas dosis (0.01, 0.1, 0.5 y 1µg/ml) de anti-CD3/1µgCD28, cosechadas a las 24, 48 y 72 horas. c) Histograma de densidad de expresión de ICOS en células CD3+, cultivadas a diferentes tiempos, rojo 0 horas, azul 24 horas, verde 48 horas y naranja 72 horas (panel izquierdo) y a distintas dosis, azul claro 0 µg, azul oscuro 0.01 µg, rojo 0.1 µg, verde 0.5 µg, naranja 1 µg (panel derecho). d) Gráfica de columnas que muestra el índice de fluorescencia media de células CD3+ICOS+ que fueron estimuladas a las distintas dosis (0.01, 0.1, 0.5 y 1µg) de anti-CD3/1µgCD28, cosechadas a las 0, 24, 48 y 72 horas.

## Efecto de ICOSL soluble e inmobilizado sobre la proliferación de células CD3+ y producción de IFN- $\gamma$ e IL-4 en pacientes asmáticos

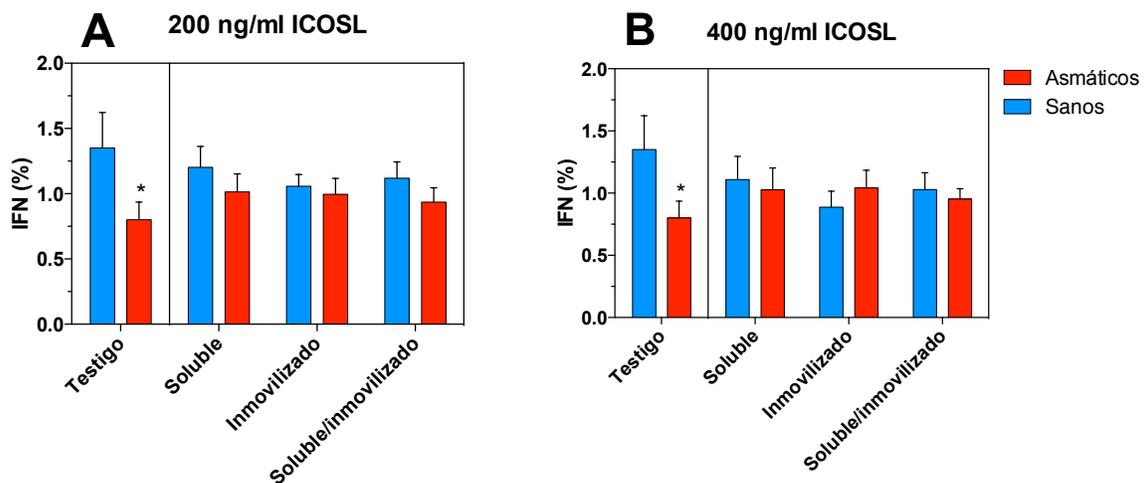
Para establecer el efecto de ICOSL soluble e inmobilizado sobre la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 por células CD3+ de pacientes asmáticos, se establecieron cultivos celulares con las dosis subóptimas obtenidas anteriormente de anti-CD3/CD28. La comparación de los resultados indica que a pesar de no obtener diferencia significativa en la proliferación celular al utilizar ICOSL (Fig 7 B y C), cuando se utiliza ICOSL en dosis altas (400ng/ml), las células de algunos pacientes tienen una proliferación mayor que los sujetos sanos y se observa un mayor incremento de la proliferación cuando ICOSL se utiliza inmobilizado (Figura 7A), este incremento se da en el porcentaje celular (Figura 7A panel derecho), no en el número de mitosis al que llegan estas células.

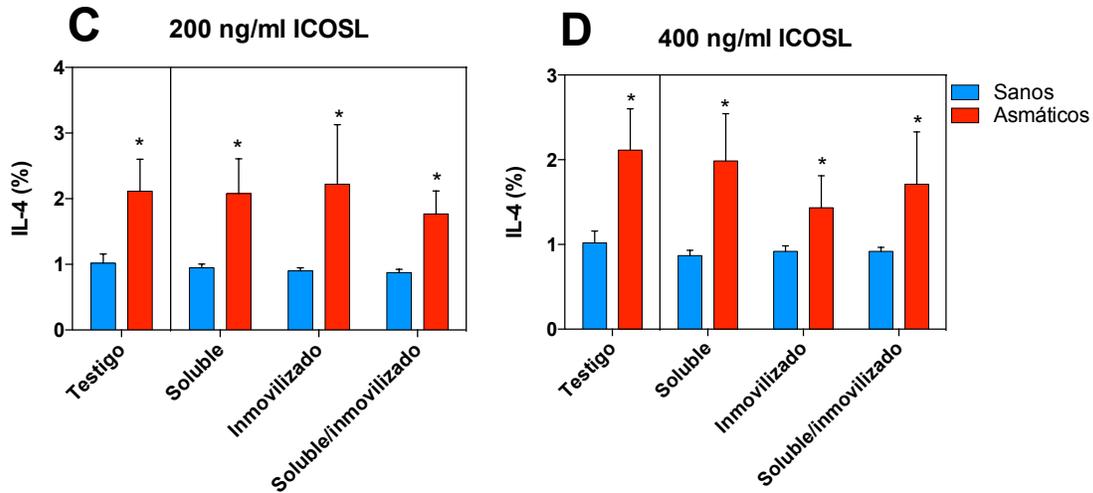




**Figura 7. ICOSL no tiene un efecto sobre la proliferación de células CD3+.** A) Gráficas de puntos de citometría de flujo, a partir de una de tamaño contra granularidad celular (paneles izquierdos), se regionalizaron los linfocitos activados, a partir de ésta se evaluó la reducción de CFSE y se muestra un histograma representativo de estas (panel derecho). B) Comparación de la pérdida de CFSE con 200 ng y C) 400 ng de ICOSL en distintas condiciones.

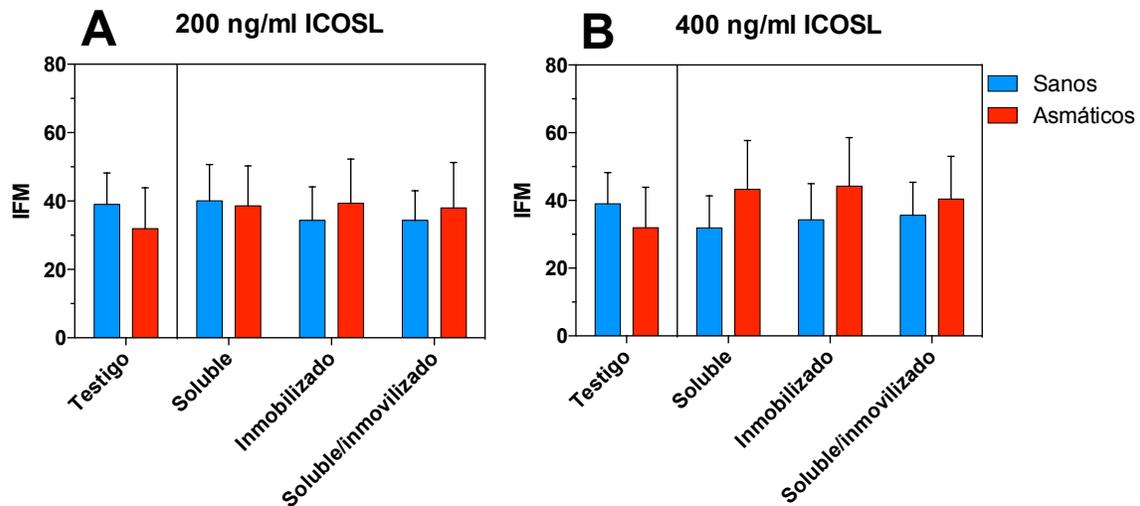
Cuando se midió la producción de IFN- $\gamma$  (Figura 8 A y B) e IL-4 (Figura 8 C y D), se observó mayor producción de IFN- $\gamma$  en los pacientes asmáticos, en relación con los sujetos sanos en presencia de ICOSL ya sea soluble o inmovilizado, observando una diferencia significativa en ausencia de ICOSL y cuando se adiciona la molécula los valores se igualan (Figura 8A). La producción de IL-4 en sujetos asmáticos también es mayor en comparación a los sujetos sanos, pero esta no se modifica tras la adición de ICOSL ( $p < 0.05$ ).

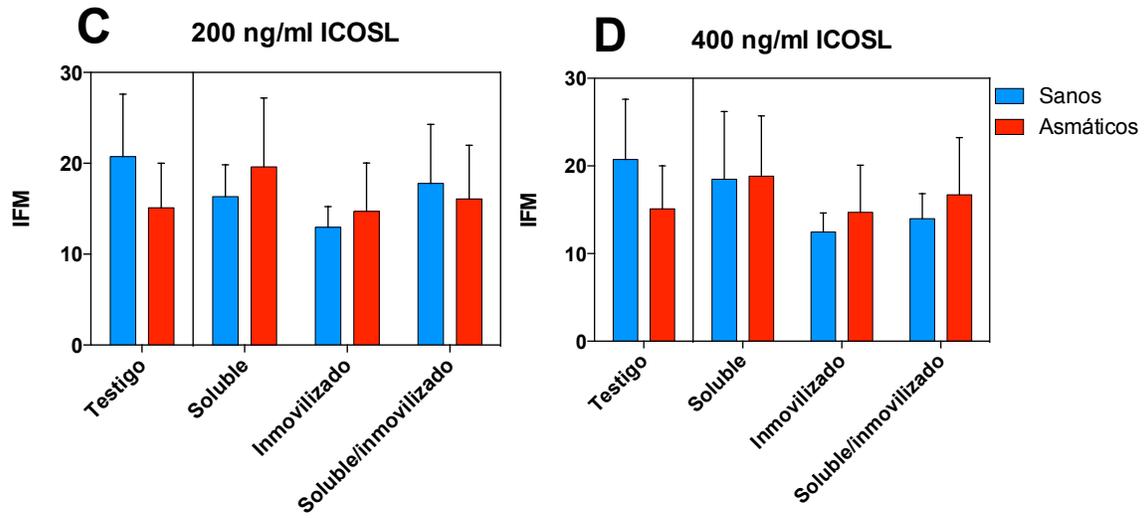




**Figura 8. Los sujetos asmáticos producen más IFN- $\gamma$  en presencia de ICOSL.** Comparación de la producción de IFN- $\gamma$  (A y B) e IL-4 (C y D) en sujetos con asma alérgica, utilizando 200 ng (A y C) y 400ng de ICOSL (B y D). \* $p < 0.05$ .

Posteriormente se determinó el índice de fluorescencia media para ambas moléculas, sin obtener diferencias significativas en ninguna, se puede observar que para IL-4, en presencia de ICOSL en cualquier dosis, en pacientes asmáticos el IFM de IFN- $\gamma$  (figura 8 A y B) incrementa, a diferencia del IL-4 (Figura 8 C y D) en donde no se observa una tendencia clara y se observa una mayor variabilidad en las muestras.





**Figura 9. El IFM de IFN- $\gamma$  e IL-4 no presenta diferencias.** Comparación del IFM de IFN- $\gamma$  (A y B) e IL-4 (C y D) en sujetos con asma alérgica, utilizando 200 ng (A y C) y 400ng de ICOSL (B y D).

## DISCUSIÓN

El asma es un padecimiento que ha ido en incremento en las últimas décadas, siendo la población infantil la más afectada, incluso se considera la enfermedad crónica más común en la niñez y es la presentación final de una serie de etiologías en las que están asociados factores genéticos y ambientales.(33) En el asma alérgica, los antígenos proteicos que ingresan por las vías respiratorias inducen la respuesta de anticuerpos IgE en individuos atópicos.(34) Estos antígenos son capturados, internalizados y procesados por las células presentadoras de antígeno, posteriormente los fragmentos peptídicos son presentados a los linfocitos T CD4+ mediante moléculas del MHC-II.(35) El reconocimiento del complejo MHC-II-peptido para la activación de los linfocitos T vírgenes específicos, requiere de múltiples señales de coestimulación por medio del contacto entre moléculas de membrana y moléculas solubles con sus receptores. Una vez que los linfocitos T son activados, se expresa en su membrana el coestimulador inducible (ICOS).(36)

La expresión de ICOS en la membrana del linfocito T está regulada a varios niveles, a nivel transcripcional por medio de moléculas como Src, Fyn y MAP cinasa ERK; a nivel postranscripcional, la proteína Roquin, miembro de la familia *Ring-type Ubiquitin ligase* regula la degradación de mRNA de ICOS. La función de ICOS en la respuesta T<sub>H2</sub> está bien descrita,(21) sin embargo se ha demostrado que en un contexto inflamatorio puede promover una respuesta T<sub>H1</sub>, T<sub>H17</sub> o Tfh, por lo que la expresión de ICOS se regula de forma distinta dependiendo del linaje de Célula T.(37-39) En las células T<sub>H1</sub>, se incrementa la expresión de ICOS mediante la unión de NFATc2 y a asociación del factor T-bet al promotor de ICOS. En las células T<sub>H2</sub>, la expresión está incrementada por la interacción de NFATc2 asociado a GATA-3 con la región UTR 3'mRNA ICOS y en las células Treg la unión de T<sub>H2</sub> a IRF4 al promotor de ICOS en asociación con la expresión de ICOS. En este linaje celular, la unión de IRF4 (factor de transcripción asociado a T<sub>H2</sub>) al promotor de ICOS se asocia con su expresión.(38)

A diferencia de ICOS su ligando se expresa de forma constitutiva en los linfocitos B, pero su expresión tras la activación de esta célula está altamente regulado por tres vías de señalización: BCR, IL-4R y CD40L. Posterior al reconocimiento de BCR por el antígeno, la expresión constitutiva de ICOSL comienza a disminuir progresivamente en las células B activadas. Las citocinas T<sub>H2</sub>, como IL-4 pueden disminuir la expresión de ICOSL

tanto en células naïve como en células activadas. El tratamiento con antígeno e IL-4 disminuye la expresión de ICOSL. La regulación de IL-4R se da mediante la transcripción de Stat6, lo que indica que al menos dos vías de señalización convergen. Esto sugiere que CD40-CD40L regula la expresión de ICOSL en células B activadas.(39, 40) La capacidad de la regulación de ICOSL a través de BCR e IL-4R implica que es similar a la regulación de CD80 y CD86, pues la coestimulación por estos a través de CD28 es crítica en la estabilización de la expresión de CD40L en células T activadas.(41, 42)

Una vez que ICOS se une con su ligando, una serina proteasa libera de la membrana la porción extracelular de ICOSL.(22) En nuestros resultados se observa que los pacientes asmáticos, presentan concentraciones mayores de ICOS e ICOSL séricos, con respecto a los sujetos sanos (Fig. 1A y B). Estos resultados confirman la importancia de estas moléculas en el asma, y el incremento sérico de ellas en esta enfermedad sugiere una regulación de la misma. El dominio extracelular de ICOSL pierde su capacidad de unirse a ICOS(22), así que este corte proteolítico de ambas moléculas funciona como una regulación del sistema, pues al cortarse ya no pueden interactuar. El incremento en la concentración sérica de los niveles de ambas moléculas en asma, refleja que el proceso de corte está acrecentado en el asma y sugiere una importancia en la regulación de la enfermedad, pues estas moléculas tienen una función esencial en el mantenimiento de la respuesta T<sub>H</sub>2.

Los pacientes asmáticos fueron agrupados en asma alérgica y no alérgica (Figura 2A y B), no se observó una diferencia entre los grupos, en ellos existe un incremento de ambas moléculas en su forma soluble, lo que concuerda con lo reportado por Humbert M. y colaboradores, quienes encontraron un incremento de IL-4 e IL-5 en el tejido pulmonar de pacientes con asma alérgica y no alérgica,(43) lo que sugiere la participación de ICOS e ICOSL en la fisiopatología de ambas enfermedades, a pesar de que en el asma intrínseca (no alérgica) no exista aumento de IgE.

Con respecto a la distribución de la concentración de ICOS e ICOSL (Figura 1 C y D) en los pacientes asmáticos comparados con los sanos, se observa una mayor desviación en los valores de ambas moléculas para los pacientes asmáticos, no se observa una correlación con los niveles de IgE para ninguna de las dos moléculas, sin embargo la variabilidad, la cual es mayor en ICOS, puede relacionarse con otros datos de la enfermedad como tratamiento, edad sexo o sintomatología. A pesar del incremento en la

concentración de ambas moléculas, la distribución de los datos no es contundente para sugerirlos como un marcador diagnóstico de la enfermedad, tendrían que realizarse más estudios, agrupando a los pacientes y evaluar la posibilidad de su uso como marcadores.

Los pacientes asmáticos tienen una mayor proporción de ICOS/ICOSL séricos (Figura 3), lo que sugiere que ICOS sufre mayor hidrólisis que su ligando o incluso una mayor expresión en membrana de ICOS en linfocitos T y una menor expresión de ICOSL en linfocitos B, de la misma forma que sucede en el Lupus eritematoso sistémico, esta diferencia es mayor en sujetos con la enfermedad activa.(44) En el asma no hay reportes al respecto, sin embargo podría sugerir un mecanismo similar.

La vía ICOS/ICOSL es importante en la activación y función de las células  $T_H2$  efectoras, induciendo proliferación y producción de citocinas, preferencialmente IL-4 e IL-5.(45) McAdam y colaboradores, utilizando ratones knock-out para ICOS, observaron una disminución de IgE circulante y producción de citocinas como IL-4 e IL-10 y un incremento de IFN- $\gamma$ , tanto en sobrenadante como intracelular.(46), (47) Para evaluar la función de ICOSL soluble dentro de este sistema, se establecieron cultivos celulares, utilizando dosis subóptimas de anti-CD3i, para resaltar el efecto de ICOSL en la activación del linfocito T y no quedara enmascarado al saturar el sistema con anti-CD3i. Se utilizó anti-CD28 en dosis óptimas, pues se ha reportado que su presencia es necesaria para la expresión de ICOS en el linfocito T.(14) ICOSL recombinante humano se adicionó bajo distintas condiciones: soluble, inmovilizado y soluble mas inmovilizado a dosis de 200 y 400 ng.(24) No se observaron diferencias significativas en la proliferación del linfocito T (figura 7), sin embargo se observa una tendencia a incrementar la proliferación en pacientes asmáticos cuando se utilizan 400 ng de rhICOSL. Esto sugiere que es necesario incrementar el tamaño de la muestra en virtud de la tendencia.

Se observa una mayor producción de IFN- $\gamma$  por las células CD3+ de los pacientes asmáticos en comparación a los sujetos sanos en presencia de ICOSL ya sea soluble o inmovilizado, en cualquiera de las dosis empleadas (Figura 8A y B). El IFN- $\gamma$  es una molécula característica de la respuesta  $T_H1$  opuesta a la respuesta  $T_H2$ , por lo que puede indicar una regulación intrínseca del asma. Es importante resaltar que este cambio se da con la molécula de ICOSL, sin importar si ésta se encuentra inmovilizada o en su forma soluble. El incremento en la producción de IFN- $\gamma$  ocurre únicamente en pacientes

asmáticos, lo que podría ser una respuesta tipo Feedback negativo como ocurre con CD28.(48)

En el análisis de la intensidad de fluorescencia media de ambas moléculas, no ocurren cambios tras la adición de la molécula. Sin embargo en pacientes asmáticos el IFM de IFN- $\gamma$  (figura 9 A y B) tiende a incrementar cuando se utilizan 400 ng de rhICOSL, a diferencia del IL-4 (Figura 9 C y D) en donde hay mayor variabilidad entre las muestras y no se observa la tendencia.

Estos datos muestran que a pesar de que el ICOSL que se utilizó es una molécula recombinante tuvo un efecto biológico, sin embargo sería importante aislar ICOSL del suero y probar si tienen el mismo efecto.

### **CONCLUSION**

ICOSL soluble no disminuye la proliferación y síntesis de IL-4 en células CD3+ de pacientes con asma alérgica.

## PERSPECTIVAS

Este proyecto confirma la importancia de ICOS e ICOSL en el asma, lo cual abre las puertas a nuevas investigaciones para esclarecer la fisiopatología de esta enfermedad, la cual ha tenido un gran incremento en su prevalencia en los últimos años.

Como nosotros mostramos, ambas moléculas están incrementadas en el suero de los pacientes asmáticos, pero es necesario determinar la cinética de corte de ambas, tanto en sujetos asmáticos como en sujetos sanos, así como realizar un estudio más profundo en la evaluación de los niveles séricos de ambas moléculas y establecer la razón de esta gran variabilidad en las concentraciones de ICOS, si algún tratamiento la modifica o es por alguna característica biológica de los pacientes.

También hay que comprobar que ICOSL soluble se une a ICOS de membrana, para confirmar su efecto en el incremento de IFN- $\gamma$  en las células CD3<sup>+</sup> de pacientes asmáticos y repetir los experimentos con la molécula aislada del suero de los pacientes, para comprobar que la molécula podría tener un efecto in vivo. También es importante establecer la vía por la que ICOSL soluble incrementa la producción de IFN- $\gamma$  en estas células.

Esclarecer estos mecanismos es importante pues como se mencionó anteriormente estas moléculas pueden funcionar como marcadores diagnósticos de la enfermedad.

## ABREVIATURAS

- APC: Célula Presentadora de Antígeno (Antigen Presenting Cell)
- BSA: Albúmina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
- CD: Grupo de moléculas de diferenciación (Cluster of Differentiation)
- CD3i: CD3 inmovilizada
- CFSE: Succimidilester de carboxifluoresceína (Carboxyfluorescein Succimidyl Ester)
- ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein Isothiocyanate)
- FSC-H: Tamaño (Forward Scatter-Height)
- ICOS: Coestimulador inducible de Células T (Inducible T-cell Costimulator)
- ICOSL: Ligando del coestimulador inducible recombinante humano
- hrICOSL: ICOSL recombinante humano
- IFM: Índice de Fluorescencia Media
- IFN- $\gamma$ : Interferon Gamma
- IL: Interleucina
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
- PAF: Factor Activador de plaquetas (Platelet-Activating Factor)
- PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
- PE: Ficoeritrina (Phycoeritrin)
- PECy5.5: Ficoeritrina conjugada a cianina 5.5.
- RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute
- SFB: Suero fetal bovino
- SSC-H: Granularidad o complejidad celular (Side Scatter-Height)

## LITERATURA CITADA

1. Fireman P. Atlas of allergies and clinical immunology. 3rd ed. Philadelphia, PA: Mosby; 2005. xv, 406 p. p.
2. Moorman JE, Bailey CM, et al. . National Surveillance of Asthma: United States, 2001-2010. National Center for Health Statistics Vital Health Stat. 2012;3(35).
3. Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento del Asma en Mayores de 18 años. Social IMdS, editor. México2009.
4. Diagnóstico y tratamiento del asma en menores de 18 años en el primero y segundo niveles de atención. Salud Sd, editor. México2008.
5. E. J. Bronchial asthma I: epidemiology, pathogenesis, definition. Medwave. 2007 Ene 2007;7.
6. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. Mutation research. 2010 Aug 7;690(1-2):24-39. PubMed PMID: 19769993. Pubmed Central PMCID: 2923754.
7. Robinson DS. The role of the T cell in asthma. The Journal of allergy and clinical immunology. 2010 Dec;126(6):1081-91; quiz 92-3. PubMed PMID: 20709383.
8. Abul K. Abbas AHL, Shiv Pillai. Cellular and molecular immunology. ELSEVIER, editor. Philadelphia2012. 545 p.
9. Holgate ST, Davies DE. Rethinking the pathogenesis of asthma. Immunity. 2009 Sep 18;31(3):362-7. PubMed PMID: 19766079.

10. Lombardi V, Singh AK, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *International archives of allergy and immunology*. 2010;151(3):179-89. PubMed PMID: 19786798. Pubmed Central PMCID: 2837887.
11. Siddiqui S, Mistry V, Doe C, Stinson S, Foster M, Brightling C. Airway wall expression of OX40/OX40L and interleukin-4 in asthma. *Chest*. 2010 Apr;137(4):797-804. PubMed PMID: 20139223. Pubmed Central PMCID: 2851558.
12. Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, et al. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *European journal of immunology*. 2000 Dec;30(12):3707-17. PubMed PMID: 11169414.
13. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome biology*. 2005;6(6):223. PubMed PMID: 15960813. Pubmed Central PMCID: 1175965.
14. McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, et al. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Journal of immunology*. 2000 Nov 1;165(9):5035-40. PubMed PMID: 11046032.
15. Chen YQ, Shi HZ. CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. *Allergy*. 2006 Jan;61(1):15-26. PubMed PMID: 16364152.
16. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*. 1999 Dec 16;402(6763):827-32. PubMed PMID: 10617205.
17. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):263-6. PubMed PMID: 9930702.

18. Chattopadhyay K, Bhatia S, Fiser A, Almo SC, Nathenson SG. Structural basis of inducible costimulator ligand costimulatory function: determination of the cell surface oligomeric state and functional mapping of the receptor binding site of the protein. *Journal of immunology*. 2006 Sep 15;177(6):3920-9. PubMed PMID: 16951355.
19. Khayyamian S, Hutloff A, Buchner K, Grafe M, Henn V, Kroczeck RA, et al. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Apr 30;99(9):6198-203. PubMed PMID: 11983910. Pubmed Central PMCID: 122926.
20. Mazzarella G, Bianco A, Catena E, De Palma R, Abbate GF. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy*. 2000;55 Suppl 61:6-9. PubMed PMID: 10919498.
21. Tesciuba AG, Subudhi S, Rother RP, Faas SJ, Frantz AM, Elliot D, et al. Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *Journal of immunology*. 2001 Aug 15;167(4):1996-2003. PubMed PMID: 11489981.
22. Logue EC, Bakkour S, Murphy MM, Nolla H, Sha WC. ICOS-induced B7h shedding on B cells is inhibited by TLR7/8 and TLR9. *Journal of immunology*. 2006 Aug 15;177(4):2356-64. PubMed PMID: 16887997.
23. Her M, Kim D, Oh M, Jeong H, Choi I. Increased expression of soluble inducible costimulator ligand (ICOSL) in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009 May;18(6):501-7. PubMed PMID: 19395451.
24. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP, Caron G, Gauchat JF, Renno T, et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity*. 2000 Sep;13(3):303-12. PubMed PMID: 11021528.

25. Shi HZ, Xie ZF, Deng JM, Chen YQ, Xiao CQ. Soluble CD86 protein in serum samples of patients with asthma. *Thorax*. 2004 Oct;59(10):870-5. PubMed PMID: 15454653. Pubmed Central PMCID: 1746836.
26. Lindqvist CA, Christiansson LH, Simonsson B, Enblad G, Olsson-Stromberg U, Loskog AS. T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology*. 2010 Nov;131(3):371-6. PubMed PMID: 20518821. Pubmed Central PMCID: 2996557.
27. Wang J, Zhang J, Long XL, Cai G, Shen Q. [The therapeutic effect of soluble inducible costimulator fusion protein on inflammation in a murine model of allergic asthma]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2005 Jun;28(6):398-402. PubMed PMID: 16008978.
28. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scandinavian journal of immunology*. 1976 Jun;Suppl 5:9-15. PubMed PMID: 1052391.
29. Phillips HJ. "Dye exclusion tests for cell viability". Academic Press: Kruse, P.F., Jr. and Patterson, M.J. Jr.; 1973.
30. Quah BJ, Parish CR. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *Journal of immunological methods*. 2012 May 31;379(1-2):1-14. PubMed PMID: 22370428.
31. *Cell Culture Manual 2008-2009*. 3rd Edition ed: Sigma Life Science; 2008-2009. p. 230-1.
32. Nie X, Cai G, Zhang W, Wang H, Wu B, Li Q, et al. Lipopolysaccharide mediated mast cells induce IL-10 producing regulatory T cells through the ICOSL/ICOS axis. *Clinical immunology*. 2012 Mar;142(3):269-79. PubMed PMID: 22154192.

33. Cooper PJ, Rodrigues LC, Cruz AA, Barreto ML. Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. *Allergy*. 2009 Jan;64(1):5-17. PubMed PMID: 19076533.
34. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008 Jun;38(6):872-97. PubMed PMID: 18498538.
35. McMEnamin C, Holt PG. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. *The Journal of experimental medicine*. 1993 Sep 1;178(3):889-99. PubMed PMID: 8102390. Pubmed Central PMCID: 2191183.
36. Nurieva RI. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. *Clinical immunology*. 2005 Apr;115(1):19-25. PubMed PMID: 15870016.
37. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nature immunology*. 2009 Feb;10(2):167-75. PubMed PMID: 19098919. Pubmed Central PMCID: 2742982.
38. Simpson TR, Quezada SA, Allison JP. Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Current opinion in immunology*. 2010 Jun;22(3):326-32. PubMed PMID: 20116985.
39. Liang L, Porter EM, Sha WC. Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Jul 1;196(1):97-108. PubMed PMID: 12093874. Pubmed Central PMCID: 2194020.

40. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annual review of immunology*. 2005;23:515-48. PubMed PMID: 15771580.
41. Jaiswal AI, Croft M. CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cells: implications for development of the primary T and B cell response. *Journal of immunology*. 1997 Sep 1;159(5):2282-91. PubMed PMID: 9278317.
42. Johnson-Leger C, Christensen J, Klaus GG. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *International immunology*. 1998 Aug;10(8):1083-91. PubMed PMID: 9723694.
43. Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996 Nov;154(5):1497-504. PubMed PMID: 8912771.
44. Yang JH, Zhang J, Cai Q, Zhao DB, Wang J, Guo PE, et al. Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2005 Oct;44(10):1245-54. PubMed PMID: 15987711.
45. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature immunology*. 2002 Aug;3(8):715-20. PubMed PMID: 12145657.
46. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature*. 2001 Jan 4;409(6816):105-9. PubMed PMID: 11343123.
47. McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*. 2001 Jan 4;409(6816):102-5. PubMed PMID: 11343122.

48. Marti F, Krause A, Post NH, Lyddane C, Dupont B, Sadelain M, et al. Negative-feedback regulation of CD28 costimulation by a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP6. *Journal of immunology*. 2001 Jan 1;166(1):197-206. PubMed PMID: 11123293.

## ANEXOS

<b>Pacientes asmáticos con pruebas cutáneas positivas utilizados para los ELISA</b>						
	<b>Género</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Tiempo de diagnóstico</b>	<b>Alérgeno positivos</b>	<b>IgE (UI/ml)</b>	<b>Comorbilidades</b>
<b>1</b>	Masculino	10	6 años	<i>Dermatoph</i>	146	Rinitis alérgica
<b>2</b>	Masculino	6	4 años	<i>Dermatoph</i>	460	Rinitis alérgica
<b>3</b>	Masculino	6	5 años	<i>Dermatoph</i>	122	Rinitis alérgica
<b>4</b>	Femenino	8	2 años	<i>Dermatoph/Quercus</i>	-	Rinitis alérgica
<b>5</b>	Femenino	9	10 meses	<i>Gato</i>	14.4	No
<b>6</b>	Masculino	7	4 años	<i>Dermatoph/Perro</i>	713	No
<b>7</b>	Masculino	9	7 años	<i>Dermatoph/Perro/Gato</i>	73	Rinitis alérgica
<b>8</b>	Masculino	15	12 años	<i>Dermatoph/Capriola/Lolium/Maíz</i>	80	Rinitis alérgica
<b>9</b>	Femenino	7	2 años	<i>Dermatoph</i>	19	Rinitis alérgica
<b>10</b>	Masculino	9	4 años	<i>Dermatoph</i>	-	Rinitis alérgica
<b>11</b>	Masculino	11	2 años	<i>Dermatoph/capriola</i>	557.7	Rinitis alérgica
<b>12</b>	Femenino	9	6 meses	<i>Chenopodium/FraxinusSchinus</i>	349	Rinitis alérgica /Dermatitis atópica
<b>13</b>	Femenino	7	4 años	<i>Dermatoph/gato</i>	-	Rinitis alérgica
<b>14</b>	Femenino	13	1 año	<i>Dermatoph/gato</i>	324	No
<b>15</b>	Masculino	8	2 años	<i>Dematoph</i>	134	Rinitis alérgica
<b>16</b>	Femenino	16	8 años	<i>Dermatoph/lolium</i>	-	Rinitis alérgica
<b>17</b>	Femenino	9	3 años	<i>Dermatoph</i>	87	Rinitis alérgica
<b>18</b>	Masculino	8	2 años	<i>Dermatoph</i>	120.5	Rinitis alérgica
<b>19</b>	Masculino	7	3 años	<i>Dermatph</i>	-	Rinitis alérgica
<b>20</b>	Femenino	10	5 años	<i>dermatoph</i>	119	Rinitis alérgica
<b>21</b>	Masculino	12	8 años	<i>Dermatoph</i>	-	No
<b>22</b>	Femenino	11	7 años	<i>Dermatoph</i>	78.8	No
<b>23</b>	Masculino	8	5 años	<i>Dermatoph</i>	54	No
<b>24</b>	Femenino	8	4 años	<i>Capriola/Fraxinus/Ligustrum</i>	249	Rinitis crónica
<b>25</b>	Femenino	10	3 años	<i>Dermatoph/Aspergillus</i>	122.5	No
<b>26</b>	Femenino	12	9 años	<i>Dermatoph</i>	221	Rinitis alérgica
<b>27</b>	Masculino	14	10 años	<i>Dermatoph</i>	36	Rinitis alérgica
<b>28</b>	Femenino	10	6 años	<i>Dermatoph/Quercus</i>	148	Rinitis alérgica
<b>29</b>	Femenino	10	2 años	<i>Dermatoph</i>	112.2	Rinitis alérgica

<b>Pacientes asmáticos con pruebas cutáneas negativas utilizados para los ELISA</b>					
	<b>Género</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Tiempo de diagnóstico</b>	<b>IgE (UI/ml)</b>	<b>Comorbilidades</b>
<b>1</b>	Masculino	6	6 meses	68	No
<b>2</b>	Femenino	6	2 años	-	No
<b>3</b>	Femenino	15	5 años	12	No
<b>4</b>	Masculino	11	8 meses	8	No
<b>5</b>	Femenino	12	1.5 años	29	No
<b>6</b>	Masculino	14	4 años	22	No
<b>7</b>	Masculino	9	4 años	72	No
<b>8</b>	Masculino	10	2 años	81.1	No
<b>9</b>	Masculino	17	12 años	-	No
<b>10</b>	Masculino	11	8 años	19	No
<b>11</b>	Femenino	12	2 años	-	No
<b>12</b>	Femenino	9	1 año	32	No
<b>13</b>	Femenino	14	6 años	100	No
<b>14</b>	Masculino	9	8 meses	-	No
<b>15</b>	Masculino	15	2 años	33	No
<b>16</b>	Femenino	6	4 años	24	No
<b>17</b>	Femenino	8	3 años	17.7	No
<b>18</b>	Femenino	13	8 años	-	No
<b>19</b>	Masculino	6	2 años	25.8	Crisis Convulsivas
<b>20</b>	Masculino	6	9 meses	55.4	No
<b>21</b>	Masculino	15	10 años	-	No
<b>22</b>	Femenino	11	3 años	64.5	No
<b>23</b>	Masculino	10	5 años	33	No
<b>24</b>	Femenino	6	1 año	-	Rinitis Crónica
<b>25</b>	Femenino	13	3 años	16	No

<b>Pacientes asmáticos utilizados para los cultivos celulares</b>					
	<b>Género</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Pruebas cutáneas</b>	<b>Comorbilidades</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>1</b>	Masculino	34	Positivas: Betula+, Fraxinus +++, Ligostrum +++++, Platanus+	Rinitis Alérgica	Broncodilatador
<b>2</b>	Masculino	29	Positivas	No	Salbutamol
<b>3</b>	Femenino	43	Positivas	Rinitis Alérgica	Montelukast, Avamys, Loratadina
<b>4</b>	Femenino	30	Positivas	Rinitis Alérgica	No
<b>5</b>	Femenino	42	Positivas	Rinitis Alérgica	No
<b>6</b>	Masculino	20	Positivas	Rinitis Alérgica	No