



11281

14

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE UNA O-GLICOPROTEÍNA EN LINFOCITOS TH2, EN PROCESO DE ATOPIA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (INMUNOLOGÍA)**  
P R E S E N T A :  
**MED. CIR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA**

ASESORES:

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO  
DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA



MÉXICO, D.F.

Autorizó a la Dirección General de Bibliotecas  
UNAM a defender en formato electrónico e impreso  
contenido de esta tesis en sus bases de datos.  
NOMBRE: *Yonathan Omar Garfias Becerra*

2003

FECHA: *22.8.3*  
FIRMA: *[Firma]*

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE UNA O-GLICOPROTEÍNA EN  
LINFOCITOS TH2, EN PROCESOS DE ATOPIA.

Índice.

1. Resumen .....	1
2. Abstract .....	2
3. Introducción .....	3
4. Antecedentes.....	10
5. Planteamiento del Problema.....	12
6. Hipótesis.....	12
7. Objetivos.....	12
8. Material y Métodos.....	13
9. Resultados.....	19
10. Capítulo 1. <b>Expresión de marcadores de activación celular asociados con la enfermedad alérgica.</b> .....	22
11. Capítulo 2. <b>Determinación del porcentaje de la subpoblación de linfocitos CD4+ALL+ en diferentes procesos alérgicos y en diferentes fases de la enfermedad y su asociación con otras moléculas de activación celular.</b> .....	33
12. Capítulo 3. <b>Análisis comparativo de marcadores de membrana en diversos procesos alérgicos.</b> .....	42
13. Capítulo 4. <b>Expresión de CD30 en linfoblastos CD4+ no apoptóticos estimulados <i>in vitro</i> con el alérgeno específico.</b> .....	53
14. Discusión General.....	71
15. Perspectivas.....	76
16. Bibliografía.....	77

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

La prevalencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado, y no hay teorías que expliquen su etiología satisfactoriamente. En los procesos alérgicos los linfocitos CD4+ secretan citocinas Th2 que favorecen una respuesta inmune humoral. No existe un marcador de membrana específico para células tipo Th2. Se han identificado células CD4+ que expresan una glicoproteína de 70 kDa reconocida por la lectina de amaranto (ALL+) que poseen transcritos para citocinas tipo Th2. Para saber la función de los linfocitos CD4+ALL+ en el fenómeno alérgico, se analizó la expresión de los linfocitos CD4+ALL+ en sangre venosa periférica de pacientes con alergias respiratorias, comparando los resultados con individuos no alérgicos. Se observó que los pacientes alérgicos expresan un 14% de linfocitos CD4+ALL+ tras un estímulo policlonal y 4% los individuos sanos no alérgicos; se comprobó una polarización de citocinas Th2, definido por la relación IL-4/IFN $\gamma$ , en los linfocitos CD4+. Posteriormente se analizó la expresión de CD4+ALL+ en diferentes enfermedades alérgicas, así como en diferentes estados de activación del proceso alérgico, los resultados mostraron que en la dermatitis atópica, hubo un aumento significativo de linfocitos CD4+ALL+, cuando se comparó con la dermatitis de contacto. Para determinar si esta subpoblación celular se encontraba asociada con los estados de activación de la enfermedad alérgica, se hizo un análisis de correlación, donde los linfocitos CD4+ALL+ se relacionan directamente con los linfocitos CD4+CD30+ e inversamente con los linfocitos CD4+CD62L+, lo que indica que esta subpoblación celular se asocia con otras subpoblaciones relacionadas a estados de activación. En este trabajo, se identificaron marcadores de activación en linfocitos CD4+ en la dermatitis atópica que no se identificaron en los procesos alérgicos respiratorios, lo que sugiere la existencia de dos mecanismos diferentes para el desarrollo del fenómeno alérgico. En los padecimientos confinados a la mucosa respiratoria, se encontraron diferencias en la expresión de CD80 en las células presentadoras de antígeno, lo que sugiere que esta molécula está involucrada en el desequilibrio Th2. Por último, se encontró que el CD30 se expresa en blásts CD4+ que no están en apoptosis lo que sugiere que podrían tener una función en la génesis y perpetuación de los procesos alérgicos.

## ABSTRACT

The prevalence of atopic diseases has been increasing on the last decades, however there is no one unique theory able to explain its etiology mechanisms. On the allergic processes, CD4+ T lymphocytes seem to be the responsible cells on mediating a Th2 unbalanced, driving the immune system towards a humoral immune response. There is no a membrane cell marker able to identify a Th2 subpopulation. We have identified a CD4+ lymphocytes subset that expresses a 70kDa membrane glycoprotein recognized by the *Amaranthus leucocarps* lectin (ALL+), and these cells have mRNA for Th2 cytokines. To know the role of the CD4+ALL+ cell subpopulation, we analysed the expression of this CD4+ALL+ subset on peripheral blood mononuclear cells from a group of patients with airway allergic disorders, compared to a non-atopic group. We identified that the allergic group presented 14% of the CD4+ALL+ subset after a polyclonal stimulus and 4% the non-allergic group; also we demonstrated a Th2 polarization profile, defined by the IL4/IFN $\gamma$  ratio on CD4+ lymphocytes determined by the analysis of intracellular cytokine expression. We analyzed the expression of CD4+ALL+ subset on different kinds of allergic disorders and at different stages of the disease, we found that the percentage of CD4+ALL+ was statistically significant greater in atopic dermatitis than in contact dermatitis. By other hand we analyzed the correlation between CD4+CD30+ and CD4+CD62L+ and CD4+ALL+, which means that ALLr molecule is expressed on activated cells. In this work, we also identified activation markers on CD4+ on atopic dermatitis, not identified on airways allergic disorders, which suggests that there could be two kinds of mechanisms, a) confined to the skin and b) confined to the airway mucosa. Moreover, on the processes confined to the airway mucosa we identified differences not on activation markers on CD4+ cells, but we identified differences on the costimulatory molecule CD80 on antigen presenting cells, which suggests that the Th2 unbalanced on these processes could be mediated by these molecule. At last, we propose CD30 as a cell proliferation molecule expressed on CD4+ blast cells and could have a protection function against apoptosis, which could explain the generation and the perpetuation of the allergic response.

## INTRODUCCIÓN

En los organismos multicelulares las funciones celulares dependen de la comunicación intercelular, que puede ser a distancia o por contacto célula-célula. Cuando la comunicación intercelular es por el contacto célula-célula, los oligosacáridos que se encuentran unidos a las proteínas de membrana desempeñan un papel preponderante en este tipo de comunicación. Se ha descrito que el contacto entre estos oligosacáridos puede mediar procesos como la cooperación celular y el tráfico leucocitario hacia sitios de inflamación (Rosen, 1993), la activación celular (Hernández *et al.*, 2002) y la apoptosis (Azuma *et al.*, 2002). La función de estos oligosacáridos en la respuesta inmune ha tomado importancia gradualmente, desde el reconocimiento de los grupos sanguíneos (revisado en Watkins, 1980) hasta el reciente descubrimiento de que ciertas proteínas glicosiladas de la superficie celular regulan la apoptosis (Azuma *et al.*, 2002).

Los carbohidratos de las glicoproteínas regulan procesos celulares.

Las glicoproteínas son compuestos biológicos que se encuentran prácticamente en todos los organismos. Estas moléculas se encuentran en forma soluble o unidas a membranas celulares, están presentes en la matriz extracelular o formando parte de fluidos extracelulares y entre sus funciones está regular la comunicación intercelular. Las unidades de carbohidratos de las glicoproteínas, exhiben una variedad muy amplia tanto en tamaño como en estructura; la clasificación de estas cadenas oligosacáridicas de las glicoproteínas se hace de acuerdo a la naturaleza de los enlaces covalentes de tipo glicosídico que existen entre los aminoácidos y el oligosacárido (Roth, 1987). La glicosilación de proteínas es tipo N- cuando la adición del carbohidrato N-acetilglucosamina (GlcNAc) ocurre en un residuo de asparagina en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La N-glicosilación se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y tiene modificaciones en el complejo de Golgi. La

glicosilación de tipo O- sucede cuando la adición del carbohidrato N-acetilgalactosamina (GalNAc) ocurre en un residuo de aminoácido de serina o de treonina (Spiro, 2002) y este proceso se realiza en el complejo de Golgi (Roth, 1987). Los glicanos en las glicoproteínas pueden tener funciones fisicoquímicas y biológicas. En las funciones fisicoquímicas, los oligosacáridos modifican la solubilidad, carga eléctrica, masa, tamaño y viscosidad de la proteína en solución; controlan la estructura proteica, estabilizan la conformación de la proteína, le confieren estabilidad y protección contra proteólisis (Rudd *et al.*, 1999; Van den Steen *et al.*, 1998; van den Steen *et al.*, 2000). Dentro de las funciones biológicas de los oligosacáridos están: regular el tráfico intracelular de las proteínas y determinar la vida media de las proteínas en circulación, modificar sus propiedades inmunológicas, modular la actividad enzimática y hormonal, actuar como receptores celulares y participar en las interacciones intercelulares (Lis and Sharon, 1993; Nemansky *et al.*, 1995). (Tabla 1).

Los procesos de glicosilación se encuentran mediando funciones que van desde la fertilización, embriogenesis, neurogenesis, organogenesis, hematopoyesis, activación celular y transducción de señales (Varki *et al.*, 1999). La mayoría de los estudios sobre oligosacáridos en procesos de activación celular, son enfocados principalmente en células hematopoyéticas, por ejemplo, se han reportado cambios en la O-glicosilación de células T durante la activación (Varki *et al.*, 1999). En otro estudio relacionado, se observó mayor expresión de una glicosiltransferasa en linfocitos activados con respecto a linfocitos en reposo, lo que sugiere que la expresión de glicanos está regulando diferentes procesos celulares (Piller *et al.*, 1988). Se ha observado en un modelo murino, que después de la infección con el virus de la coriomeningitis linfocítica, aumenta el reconocimiento de linfocitos T CD8+ por la lectina PNA (*Arachis hypogaea*). PNA es una lectina que reconoce a la galactosa en posición terminal no reductora en estructuras O-glicosídicas, por lo tanto, el aumento en el reconocimiento de estos linfocitos, sugiere que las estructuras glicosiladas fueron expuestas durante la activación celular por la acción de sialidasas (Galvan *et al.*, 1998).



Las glicoproteínas de membrana también regulan procesos de transducción de señales, tal es el caso del CD22 en los linfocitos B. El CD22 es una glicoproteína transmembranal expresada principalmente en los linfocitos B maduros que reconoce específicamente al ácido siálico con enlaces  $\alpha 2,6$ . El CD22 participa directamente en los procesos de regulación negativa en la transducción de señal a través del BCR (Cister y Goodnow, 1997). En un estudio sobre linfocitos B que carecen del dominio tipo lectina en el CD22, se observan modificaciones tanto en el movimiento de calcio intracelular como su propia fosforilación en el momento de activación a través del BCR, lo que indica que el dominio de lectina del CD22 es necesario para una correcta inhibición de la activación celular (Jin *et al.*, 2002). Además, se ha observado en las células que la expresión de moléculas de membrana favorecen procesos de adhesión celular en el fenómeno de "homing", que consiste en que los linfocitos se unan a superficies endoteliales para migrar del compartimiento intravascular a órganos linfoides secundarios. Estas células endoteliales se encuentran específicamente en las vénulas de endotelio alto (Stamper y Woodruff, 1997); son de forma cuboidal y sus superficies están revestidas con glicoproteínas para adhesión y transmigración celular (Kansas, 1996).

Errores en la glicosilación favorecen patologías.

La glicosilación es un mecanismo que participa estrechamente con el sistema inmune, principalmente generando glicoproteínas en la membrana celular cuya función determina desde el contacto de célula con célula hasta el reconocimiento e infección por microorganismos (Reyes-Leyva *et al.*, 1997). En el caso del virus del HIV, éste utiliza la maquinaria de glicosilación del hospedero para la protección de potenciales sitios antigénicos, (Reitter *et al.*, 1998); otro ejemplo, es el caso de células infectadas por el virus de la hepatitis B que han sido tratadas con el inhibidor de glicosilación desoxinójirimicina, en donde se ha demostrado interferencia en el plegamiento de proteínas de envoltura virales y disminución de la virulencia (Mehta *et al.*, 1998). También se ha descrito que los errores en la

glicosilación generan procesos patológicos (Lowe, 2001; Schachter, 2001), por ejemplo, el potencial metastásico que se observa en carcinomas de ratones atímicos, es atribuido a los errores en la glicosilación de las mucinas y que al incubar las células tumorales con benzyl- $\alpha$ -GalNAc (inhibidor de la O-glicosilación) disminuye el potencial metastásico (Codington and Haavik, 1992). En las enfermedades autoinmunes se observa una autoasociación de los anticuerpos, mecanismo responsable del daño; se han realizado estudios de mutagénesis dirigida contra el dominio CH3 de la IgG3, donde se remueve el sitio de glicosilación y se demuestra una reducción significativa de la autoasociación de estos anticuerpos, lo que sugiere que las estructuras glicosiladas están mediando esta autoasociación (Panka, 1997).

En los mecanismos de daño de las enfermedades alérgicas, se ha encontrado que existe un proceso de inflamación localizado al bronquio en el caso del asma y localizado en la mucosa nasal en el caso de la rinitis alérgica (Holgate, 2001). En relación con moléculas de adhesión que se expresan en el proceso de inflamación, las selectinas (proteínas con dominio de lectina), son de particular importancia para regular los mecanismos de adhesión y rodamiento celular sobre el endotelio; dirigir el influjo de neutrófilos a los sitios de inflamación, uniéndose específicamente a sus ligandos (carbohidratos) correspondientes (Rosse, 1993).

#### Las lectinas.

Las funciones biológicas de los oligosacáridos se dividen en dos grupos, el que se refiere a las propiedades estructurales y el que se refiere al reconocimiento específico de estructuras glicosídicas por otras proteínas de membrana con función de lectinas. Dentro de las funciones de las lectinas de membrana, están la regulación de la migración y adhesión celular y la unión de bacterias a células epiteliales (Lis y Sharon, 1986).

**Tabla 1. Funciones de los carbohidratos en las glicoproteínas.**

Tipo	Función	Ejemplo	Referencia
Fisicoquímicas	Regular la estructura protéica	NGFR*	Chapman <i>et al.</i> , 1996.
	Estabilizar la conformación de la proteína.	Glicoforina-A	Pieper, 1996.
	Proteger de proteolisis.	CD55; mucinas	Kramerov <i>et al.</i> , 1996; Coyne <i>et al.</i> , 1992.
	Regular el tráfico intracelular y localización de las glicoproteínas en la célula.	GF-II; Glicoforina-A	Daughaday <i>et al.</i> , 1993; Ugorski <i>et al.</i> , 1993.
Biológicas	Determinar la vida media de la glicoproteína en circulación.	Hormonas glicoprotéicas: LH, EGF	Drickamer, 1991; Hooper <i>et al.</i> , 1996; Hajjar y Reynolds, 1994.
	Modificar las propiedades inmunológicas de las proteínas.	Sistema sanguíneo ABO	Watkins, 1987.
	Modular la actividad enzimática y hormonal.	HCG, eritropoyetina	Matzuk <i>et al.</i> , 1989 Takeuchi y Kobata, 1991.
	Actuar como receptores de membrana.	Selectinas	Kansas, 1996.
	Participar en las interacciones intercelulares.	IL5	Kodama <i>et al.</i> , 1993.

\* NGFR: Receptor del factor de crecimiento neuronal; CD55: Factor acelerador del decaimiento; GF-II: glicoforina-II; LH: hormona leutinizante; EGF: factor de crecimiento epidérmico; hCG: hormona gonadotropina coriónica humana; IL5: interleucina 5.

Las lectinas que son proteínas o glicoproteínas importantes para la identificación de oligosacáridos, se han convertido en un elemento esencial en el estudio de los carbohidratos de membrana (Lis y Sharon, 1986; Lis y Sharon, 1998) y su utilización ha servido también para el aislamiento de receptores de membrana en linfocitos (Marchalonis, 1987). Con el uso de lectinas, se han identificado subpoblaciones celulares y su asociación con procesos de maduración y activación celular; por ejemplo, se ha observado que la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) reconoce específicamente galactosa terminal en la estructura Gal $\beta$ 1,3GalNAc presente en timocitos de la corteza tímica (Reisner *et al.*, 1976a) y es capaz de distinguir linfocitos CD8+ de memoria (Galván *et al.*, 1998); la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) específica para GalNAc, reconoce timocitos de la médula tímica (Lascurain *et al.*, 1994). La lectina de germen de trigo (WGA)

específica para GlcNAc ha sido utilizada en la purificación de linfocitos B (De Dios *et al.*, 1986). Las lectinas que reconocen el ácido siálico terminal en posición  $\alpha 2,6$  y  $\alpha 2,3$  han demostrado tener patrones de reconocimiento diferentes en células de timo de ratón; la lectina de *Mackia amurensis* (MAA) que se une al ácido siálico en posición  $\alpha 2,3$  reconoce la médula tímica, mientras que la lectina de *Sambucus nigra* (SNA) que reconoce ácido siálico en posición  $\alpha 2,6$  identifica corteza (Alvarez *et al.*, 1999) (Tabla 2). Las lectinas se han utilizado para la identificación de oligosacáridos en procesos patológicos, por ejemplo la lectina Acantinina H que reconoce 9-O acetil sialoglicoconjugados es una biomolécula para identificar un marcador biológico en la leucemia linfoblástica aguda (Sinha *et al.*, 1999).

**Tabla 2. Lectinas, su especificidad y distribución celular.**

Lectina	Especificidad	Distribución celular
PNA	Gal	Timocitos en corteza; linfocitos CD8+ de memoria
ALL	GalNAc	Timocitos de médula
WGA	GlcNAc	Linfocitos B
SNA	Neu5Ac $\alpha 2,6$	Timocitos en corteza
MAA	Neu5Ac $\alpha 2,3$	Timocitos en médula

La subpoblación celular reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.

Se ha purificado de la semilla del amaranto (*Amaranthus leucocarpus*) una lectina (ALL) que es capaz de interactuar con timocitos medulares murinos (Lascurain *et al.*, 1994), con macrófagos murinos no activados (Gorocica *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 1998) y linfocitos T humanos (Lascurain *et al.*, 1997). ALL es una glicoproteína de 35 kDa específica para los antígenos T y T<sub>n</sub> (Gal  $\beta 1,3$  GalNAc $\alpha 1, O$ -Ser/Thr y GalNAc $\alpha 1, O$ -Ser/Thr respectivamente) (Zenteno *et al.*, 1992). Esta lectina aglutina preferentemente eritrocitos con el fenotipo M, no reconoce a linfocitos B y posee discreta actividad mitogénica sobre linfocitos humanos (Lascurain *et al.*, 1997). Mediante cromatografía de afinidad se ha demostrado que la molécula reconocida por la lectina ALL es una glicoproteína de

membrana que pesa 70kDa, el 20% de su masa son carbohidratos y está constituida principalmente por ácidos glutámico y aspártico, serina, prolina y glicina; su porción glicosídica contiene principalmente sitios potenciales de O-glicosilación, por lo que se considera que la glicoproteína reconocida por ALL es una proteína tipo mucina (Porrás *et al.*, 2000).

La glicoproteína reconocida por ALL se encuentra en los timocitos medulares de ratón, lo cual fue identificado mediante ensayos de histoquímica y la subpoblación reconocida fue preferentemente CD4+ lo que sugiere que se trata de una glicoproteína presente en linfocitos T CD4+ en últimas etapas de la maduración (Lascurain *et al.*, 1994). En cuanto a su función, en modelo murino se realizaron ensayos de inducción de apoptosis con dexametasona y se demostró que los timocitos ALL+ son resistentes a apoptosis (Alvarez, 2001).

En sangre periférica de individuos sanos, se encontró que aproximadamente el 5% de los linfocitos CD4+ fueron ALL+ (Lascurain *et al.*, 1994). Utilizando la técnica de RT-PCR en linfocitos TCD4+ aglutinados con la lectina de amaranto, se lograron amplificar transcritos para IL-4 e IL-10 pero no para IL-2 ni para IFN $\gamma$ , lo que sugiere que son células T CD4+ con un patrón de citocinas tipo Th2 (Chávez, 1999).

## ANTECEDENTES

El fenómeno alérgico.

Se define como alergia a la manifestación clínica de una hipersensibilidad mediada por IgE. En las últimas décadas, los padecimientos alérgicos han aumentado y no hay teoría que explique satisfactoriamente la etiopatogenia de estos padecimientos. Dentro de la patología atópica, se han descrito las funciones de la citocinas secretadas por las células T CD4+ y se afirma que existe un desequilibrio en la producción de citocinas que origina un aumento en la polarización hacia la respuesta Th2 (Powrie y Coffman, 1993). Sin embargo, la fase activa de la dermatitis atópica está mediada por un perfil Th2, mientras que la fase crónica está mediada por un perfil Th1 (Hamid *et al.*, 1996). Cabe recordar que hay dos tipos de linfocitos CD4+: los linfocitos productores de IFN- $\gamma$  e IL-2 denominados Th1 y los productores de IL-4 e IL-10 denominados Th2 (Mossman *et al.*, 1986). Los linfocitos Th1 favorecen una respuesta inmune celular, mientras que los linfocitos Th2 favorecen una respuesta humoral y entre estas subpoblaciones celulares existe una regulación mutuamente inhibitoria (Muraille y Leo, 1998).

Otros autores han propuesto que los linfocitos CD4+ no deben clasificarse solamente en estos dos grupos celulares en virtud del constante dinamismo que existe en la respuesta inmune (Kelso, 1995). En la alergia, se ha descrito que los linfocitos CD4+ están activados, y la activación se acompaña de una disminución del CD62L aunado a la expresión de las moléculas CD30, CD25, CCR5, las cuales no se encuentran en los linfocitos de los individuos sanos (Garfias *et al.*, 2001). En estudios realizados en muestras de lavado bronquioalveolar de pacientes alérgicos, se identificó que los linfocitos CD4+ son la principal fuente de citocinas IL-4 e IL-5, lo que conlleva al desequilibrio hacia Th2 (Lee *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 1992). Otros estudios realizados en epitelio bronquial de pacientes con asma, mostraron mediante la técnica RT-PCR *in situ*, transcritos para proteínas que sólo se encuentran en células en estado de activación (Sagara *et al.*, 2002) lo que sugiere que en el fenómeno de alergia hay una activación celular.

## Apoptosis y alergia.

Desde que se identificó que los linfocitos Th1 son más sensibles a la muerte celular inducida por sobreactivación que los linfocitos Th2 (Zhang *et al.*, 1997), se han realizado estudios que sugieren que la resistencia a la apoptosis en las células que participan en el desequilibrio hacia Th2, es un fenómeno asociado a la patogenia de las enfermedades alérgicas. Se ha descrito que la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 se encuentra aumentada en los eosinófilos de los pacientes alérgicos en comparación con los de individuos sanos (Druilhe *et al.*, 1998), demostrando que los eosinófilos de los pacientes están protegidos contra apoptosis. Además, en los linfocitos T obtenidos de lavado bronquioalveolar de pacientes con asma alérgico, se demostró mediante RT-PCR una disminución en la expresión de transcritos de Fas y Fas ligando (CD95/CD95L), dos moléculas necesarias para inducir muerte celular por activación; por consiguiente, al realizar ensayos de activación con un anticuerpo anti-Fas en los mismos linfocitos, no hubo inducción de apoptosis (Spinozzi *et al.*, 1998), sugiriendo que la disminución en la síntesis de las proteínas (Fas/FasL) podría explicar la persistencia de estas células como causa del fenómeno inflamatorio en el asma bronquial.

En resumen, en los padecimientos atópicos hay un predominio de citocinas tipo Th2 producido preferentemente por los linfocitos CD4+ y estas células Th2 son resistentes a la apoptosis; esto sugiere un mecanismo por el cual el proceso alérgico puede desarrollarse y mantenerse. Sin embargo, no se ha encontrado el marcador fenotípico que identifique a células Th2, lo que limita el estudio de la subpoblación celular y su participación en la generación y mantenimiento de la alergia. Por otra parte, los linfocitos CD4+ reconocidos por ALL en individuos sanos son del tipo Th2, según el patrón de citocinas que producen (Chávez, 1999), asimismo, la subpoblación reconocida por esta lectina distingue a células resistentes a apoptosis en timo (Álvarez, 2001).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Considerando que en el proceso alérgico hay un predominio de linfocitos Th2 y que éstos son resistentes a la apoptosis y que la lectina de amaranto reconoce linfocitos tipo Th2 y las células reconocidas por esta lectina se encuentran protegidas contra apoptosis, nos permite plantear la siguiente:

## **HIPÓTESIS**

Los linfocitos CD4+ reconocidos por la lectina ALL están involucrados en el proceso alérgico

## **OBJETIVO**

Analizar la frecuencia de los linfocitos CD4+ reconocidos por la lectina de amaranto en el fenómeno alérgico.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la frecuencia de los linfocitos CD4+ ALL+ durante la activación celular *in vitro*, en la enfermedad alérgica en comparación con individuos sin enfermedad alérgica. Determinar si existe asociación de los linfocitos CD4+ALL+ con un perfil Th2.
2. Determinar el porcentaje de linfocitos CD4+ ALL+ en diferentes procesos alérgicos, en diferentes fases de la enfermedad y establecer su asociación con otras moléculas de activación celular.
3. Determinar las diferencias de marcadores de membrana de linfocitos CD4+ en diferentes procesos alérgicos, en distintas fases de la enfermedad.
4. Evaluar en cultivo celular, la apoptosis asociada a la expresión del CD30 en linfocitos CD4+ de pacientes alérgicos para utilizarlo como referencia en el estudio de la subpoblación celular CD4+ALL+.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes. En el primer grupo se incluyeron 10 pacientes con asma moderado y rinitis alérgica, los testigos fueron 10 individuos sin alergia. El segundo grupo estuvo integrado por 28 pacientes que fueron distribuidos de la siguiente manera: 4 con rinitis no sintomática, 4 con rinitis activa; 5 con asma moderado y 5 con asma grave; 5 con dermatitis atópica y 5 con dermatitis de contacto. El grupo testigo fue constituido por 4 individuos sin alergia. El tercer grupo fue organizado de la siguiente manera: 15 pacientes con rinitis alérgica y asma alérgico moderado y 7 individuos sanos sin alergia. La alergia se comprobó por historia clínica, por los antecedentes heredo-familiares con atopia en primer grado y por pruebas de laboratorio y gabinete (abajo descritas). Todos los pacientes tuvieron >15% de eosinófilos en moco nasal, >10% de eosinófilos en sangre, IgE sérica >300 UI/ml, coproparasitoscópicos negativos, pruebas cutáneas positivas a *Dermatophagoides pteronyssinus* y/o a *D. farinae* (Allerstand, México). Los pacientes con dermatitis de contacto fueron positivos a níquel, evaluados mediante la prueba del parche (True-Test) (Glaxo-Wellcome) a 72 h. Para la clasificación del asma se siguieron los criterios de la American Thoracic Society (ATS, 1987). Todos los individuos fueron informados y se obtuvo una carta de consentimiento. El protocolo fue aprobado por el comité de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Tablas 3-5).

**Tabla 3. Distribución de pacientes y testigos sanos en el grupo 1**

Grupo	Edad (años)	Tamaño de muestra	PC (mm)	IgE sérica
Pacientes	28 ± 10	n = 10	10 ± 3	>300UI/ml
Sanos	35 ± 8	n = 10	-	<100UI/ml

P.C.: Pruebas cutáneas a *Dermatophagoides pteronyssinus*

**Tabla 4. Distribución de los pacientes del grupo 2.**

	n	P.C.	IgE >300UI/ml	Prueba al parche	Síntomas Activos	VEF1*	Edad
Dermatitis Atópica	5	Positivo	Positivo	NA	Positivos	ND	38±12
Dermatitis de Contacto	3	Negativo	Negativo	Positivo	Positivos	ND	40±7
Asma Moderado	5	Positivo	Positivo	ND	+/-	80-100%	35±10
Asma Severo	5	Positivo	Positivo	ND	Positivos	<60%	34±15
Rinitis no sintomática	4	Positivo	Positivo	ND	Negativos	ND	25±5
Rinitis sintomática	4	Positivo	Positivo	ND	Positivos	ND	30±3
Individuos sanos sin alergia	4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativos	ND	32±9

P.C.: Pruebas cutáneas a *Dermatophagoides pteronyssinus* y/o *D. farinae*, evaluación 15 min después de su aplicación; Prueba al parche, evaluada 72 h después de su aplicación. VEF1: Volumen Espiratorio Forzado al primer segundo. \* Comparado con el valor de predicción. ND: No detectable.

**Tabla 5. Distribución de pacientes alérgicos e individuos sanos del grupo 3.**

Individuos	n	Edad	PC*	IgE (UI/mL)	Eosinófilos en sangre
Con asma y rinitis	15	26 ± 9	++++	>300	>10%
No alérgicos	7	35 ± 8	Negativo	<300	<10 %

\*PC: prueba cutánea a *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Anticuerpos. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón contra moléculas de células humanas, conjugados a ficoeritrina (PE), a isotiocianato de fluoresceína (FITC) o a QuantumRed (QR), contra CD3, CD30, IL-4, IL5, IFN- $\gamma$  (Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD4-QR (Sigma, St Louis, MO, USA). Los anticuerpos utilizados como testigos de isotipo fueron IgG1 e IgG2b los cuales estaban conjugados a uno de los siguientes fluorocromos: FITC o PE.

Obtención de células mononucleadas. De 8 ml de sangre venosa periférica, se obtuvieron las células mononucleadas (CMN) por el método de gradiente de densidad con Ficoll 1.07 (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Norway). Las células localizadas en la interfase Ficoll-suero se aislaron y se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.2, 0.15M (PBS). Se diluyeron en 1 ml de PBS y las células se cuantificaron valorando la viabilidad por el método de exclusión de azul Tripano (Sigma, St Louis, MO, USA).

Lectina de *Amaranthus leucocarpus*. La lectina de la semilla de amaranto (ALL) fue purificada por cromatografía de afinidad siguiendo el método descrito (Zenteno, 1988); la lectina se conjugó a FITC (The y Feltkamp, 1970) o a biotina (Savage *et al.*, 1992). Se comprobó actividad aglutinante de la lectina con eritrocitos humanos tipo A2 y para confirmar la especificidad de ALL se realizaron ensayos de inhibición de la actividad aglutinante con GalNAc 0.2M (Sigma, St Louis, MO, USA) en PBS (Zenteno, 1992).

Triple Inmunofluorescencia. Para realizar ensayos de inmunofluorescencia, se incubaron  $5 \times 10^5$  CMN con anticuerpos de ratón contra CD3, CD4, CD30, IL-4, IFN- $\gamma$  y con la lectina ALL-biotina durante 20 min a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con solución de PBS con 0.2% albúmina sérica bovina y 0.2% NaN<sub>3</sub> (PBA). Se realizó una segunda incubación con streptavidina conjugada a un fluorocromo durante 20 min a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo (FACScalibur, B&D, San José, CA, USA). Para verificar la especificidad de la lectina, se realizaron ensayos de inhibición incubando con GalNAc 0.2M en PBS durante 10 min a 4°C en oscuridad.

Citocinas Intracelulares. Los ensayos de activación celular se realizaron *in vitro* con phorbol-miristato-acetato ester (PMA) y ionomicina.  $5 \times 10^5$  CMN fueron colocadas en cajas de cultivo de 4 pozos con fondo plano, y cultivadas en 500 $\mu$ l de RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 200mM de L-glutamina, 100mM de piruvato de sodio, 50 $\mu$ M de 2-mercaptoetanol,

100U/ml de penicilina, 100 $\mu$ g/ml de estreptomocina. Las células se incubaron con 25 ng/ml de PMA y 1  $\mu$ g/ml de ionomicina en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas. 4 horas antes de finalizar el cultivo, se agregaron 10  $\mu$ g/ml de brefeldina A para impedir la secreción de citocinas. Posteriormente, las CMN se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 minutos y se retiró el sobrenadante. Luego las células se incubaron con los anticuerpos contra los antígenos de membrana (CD3, CD4, CD30) durante 20 min a 4°C. Las células se lavaron con PBA y por segunda vez se incubaron con ALL-biotina durante 20 min a 4°C, se lavaron y se incubaron otros 20 min con streptavidina conjugada a Cychrome. Las células se lavaron con PBA y se incubaron 10 min con 200  $\mu$ l de p-formaldehído al 4% en PBS, se lavaron dos veces y para permeabilizar las membranas se resuspendieron en 200  $\mu$ l de una solución de saponina al 0.1% con 10% de albúmina sérica bovina en PBS, incubando en agitación constante durante 15 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron y se incubaron inmediatamente con los anticuerpos contra citocinas humanas (IL-4 y IFN- $\gamma$ ) durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron y fueron analizadas en el citómetro de flujo FACScalibur™. El análisis de citometría se realizó en los Softwares CellQuest para McCintosch y WinMDI 2.8 para PC. Los resultados de los análisis de citometría fueron evaluados estadísticamente para la comparación entre dos grupos independientes por medio de *t* de Student, tomando una *p*<0.05 como valor estadísticamente significativo. Los medios de cultivo y otros reactivos utilizados en este ensayo fueron adquiridos de Sigma (St Louis, MO, USA) a excepción de los anticuerpos y la lectina ALL.

Ensayo de proliferación celular alérgeno-específico. 10<sup>7</sup> CMN diluidas en 1 ml de RPMI se incubaron con 15 $\mu$ l de succimidil-éster de carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) al 0.5M (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posterior a la incubación, las CMN se resuspendieron con 8 ml de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino. Las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en RPMI suplementado. 2.5 x 10<sup>5</sup> CMN se incubaron en 200 $\mu$ l de medio suplementado, en placas de 96 pozos con fondo plano (Nalgene Nunc Interational, Denmark) en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C; las células se

estimularon con diferentes concentraciones de *Dermatophagoides pteronyssinus* a diferentes tiempos para definir las condiciones óptimas de proliferación celular. Las células estimuladas con ConA (2µg/ml) a 72 h fueron el testigo positivo de proliferación celular. Las células se recuperaron a diferentes tiempos y se incubaron con anticuerpos contra moléculas de membrana y contra citocinas intracelulares. El análisis de proliferación se calculó con el porcentaje de linfoblastos y el índice de división (Angulo y Fulcher, 1998).

Neutralización del receptor de IL-4. Para identificar la acción de la IL-4 sobre los linfoblastos alérgeno-específicos durante la proliferación celular, la apoptosis y la expresión de CD30, se utilizaron 50 ng/ml de un anticuerpo neutralizante de la cadena alfa del receptor de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La dosis utilizada fue la recomendada para inhibir la acción de la IL-4 en un sistema *in vitro* (Kitamura *et al.*, 1989).

Ensayos de apoptosis. Para la determinación de la apoptosis celular se utilizaron dos métodos; con el uso de la anexinaV se identifica la fosfatidilserina en la superficie de la membrana celular, (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz CA, USA) y yoduro de propidio (IP) para identificar el DNA fragmentado. El segundo método consistió en utilizar el marcador 7-amino-actinomicina-D (7AAD), que es una molécula que se intercala al DNA cuando éste se encuentra fraccionado (Lecoeur *et al.*, 1998).

Para el método con anexinaV,  $10^6$  células de cultivo se resuspendieron en 50 µl de amortiguador de "unión" (10 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 2.5 mM  $CaCl_2$ , 140 mM NaCl) y se agregó 1µg de anexinaV conjugada a FITC y las células se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Enseguida, se agregó IP o el anticuerpo-PE contra CD30 y las células se analizaron en citometría de flujo. Las células apoptóticas se consideraron como IP-/anexinaV+. El índice de apoptosis fue el cociente obtenido de la división del total de las células apoptóticas entre el total de células adquiridas en el citómetro. Para la determinación de la apoptosis con 7AAD, las células se incubaron con los anticuerpos contra

moléculas fenotípicas siguiendo el método anteriormente descrito. Finalmente, las células se incubaron con 10  $\mu$ l de 7AAD (20 $\mu$ g/ml) durante 20 min a temperatura ambiente.

Análisis estadístico. Para la comparación de dos grupos independientes con valores no paramétricos, los datos obtenidos fueron evaluados utilizando la prueba de "U" de Mann Whitney y los coeficientes de correlación fueron calculados con el producto de Pearson, tomando una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

Los resultados son presentados en forma de capítulos de acuerdo a cada uno de los objetivos del trabajo, en los que se incluye breve introducción, discusión y bibliografía.

En el capítulo 1, se analizó el porcentaje de los linfocitos CD4+ALL+ de pacientes con alergias respiratorias después de estimular *in vitro* con un activador policlonal y se compararon los resultados con un grupo de individuos sin alergias. Además se analizó el perfil de citocinas intracelulares en los linfocitos CD4+ de ambos grupos. En los pacientes se encontró aumentada la subpoblación de linfocitos CD4+ALL+ cuando se comparó con el grupo de individuos sanos. En otro análisis se realizó una comparación de linfocitos CD4+ALL+ con los linfocitos CD4+CD30+ y se observó que ambas subpoblaciones se encontraron aumentadas solamente en los pacientes. Asimismo, se identificó mediante el índice IL-4/IFN- $\gamma$  que los linfocitos CD4+ de los pacientes presentaron mayor porcentaje de células productoras de citocinas tipo Th2 en comparación con los individuos sanos. Estos datos sugieren que el aumento de los linfocitos CD4+ALL+ depende no solo de un estímulo inespecífico, sino también de factores del microambiente como el predominio de ciertas citocinas y una predisposición atópica.

En el segundo capítulo, se analizó la presencia de tres subpoblaciones: linfocitos CD4+CD62L, CD4+CD30+ y CD4+ALL+, identificados en diferentes procesos alérgicos y en diferentes fases de la enfermedad alérgica. Se observó que en la dermatitis atópica hubo aumento en las subpoblaciones de linfocitos CD4+CD30+ y CD4+ALL+ cuando se comparó con la dermatitis de contacto. Al realizar el análisis en los demás padecimientos, solamente se observó que existen ligeros aumentos en estas subpoblaciones en los procesos activados, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a los linfocitos CD4+CD62L+, se observó que los porcentajes estaban disminuidos durante los procesos de activación, tanto en las alergias de mucosa respiratoria como en la dermatitis

atópica. Así mismo, al realizar análisis de correlación, los resultados mostraron que existe una correlación directa entre los porcentajes de linfocitos CD4+CD30+ y CD4+ALL+ y una correlación inversamente proporcional entre linfocitos CD4+CD62L+ y CD4+ALL+. Estos resultados sugieren que los linfocitos CD4+ALL+ están involucrados en la patogenia de la dermatitis atópica.

En el tercer capítulo, se analizaron las diferencias en la expresión de distintos marcadores de activación en los linfocitos CD4+ además de analizar las moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno en los diferentes procesos atópicos y asoció la expresión de estos marcadores con la fase activa del padecimiento. Los resultados demostraron que los porcentajes de los linfocitos CD4+CD30+, CD4+CD124+ y CD4+CD152+ estuvieron elevados en los pacientes con dermatitis atópica en comparación con los pacientes con dermatitis de contacto ( $p < 0.05$ ). Se encontró mayor porcentaje de células presentadoras de antígeno positivas a la molécula CD80 en las células de los pacientes con alergias confinadas a la mucosa respiratoria. Nuestros resultados sugieren que existen diferentes mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de las diversas entidades alérgicas y que la elevación del porcentaje de linfocitos CD4+CD30+ está relacionado con la dermatitis atópica y no con los padecimientos alérgicos confinados a la mucosa respiratoria.

En el cuarto capítulo, se analizó la expresión de la molécula CD30 y su asociación con proliferación celular y apoptosis. Además se valoró el efecto de la IL-4 sobre la proliferación celular y la expresión del CD30. Los resultados mostraron que >90% de las linfoblastos CD30+ tuvieron el fenotipo CD4+. La máxima producción de las citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  en los linfoblastos CD4+CD30+ ocurrió a los 5 días con una cinética muy similar. Sin embargo, la producción de IL-5 por los linfoblastos CD4+CD30+ mostró una cinética diferente con un máximo de expresión a los 7 días. Los análisis de apoptosis tanto con 7AA-D y anexina V, mostraron que los linfoblastos CD30+ no están en proceso de apoptosis. Cuando en el cultivo se le agregó un anticuerpo neutralizante para el receptor de IL-4, se



observó un decremento en el número de linfoblastos y en el porcentaje de linfoblastos CD4+CD30+ así como un aumento en el número de células apoptóticas. Estos resultados sugieren que el CD30 está asociado a proliferación celular y no a procesos de apoptosis. El estudio de la molécula CD30 en los linfocitos CD4+ sugiere que puede ser utilizado como marcador de referencia para el estudio de la subpoblación de linfocitos CD4+ALL+ en los procesos alérgicos.

## **Capítulo 1. Expresión de marcadores de activación celular asociados con la enfermedad alérgica.**

**NOTA: Preparación de manuscrito para su publicación.**

Introducción.

Dentro de los mecanismos propuestos para el desarrollo y mantenimiento de los padecimientos alérgicos está el desequilibrio de la respuesta inmune hacia una respuesta mediada por citocinas tipo Th2, principalmente IL-4, IL-13 e IL-5 (Busse y Rosenwasser, 2003; Wills-Karp y Chiarmonte, 2003). Se han identificado que los productos de los linfocitos CD4<sup>+</sup> son los causantes del desequilibrio de la respuesta inmune hacia la hipersensibilidad mediada por IgE (Larche *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001). En la alergia se ha observado un aumento en la activación celular (Sagara *et al.*, 2002) y se ha identificado este fenómeno en células circulantes así como en células de cortes histológicos de las lesiones (Hamid, 1992). Para reconocer las células en estado de activación asociados a la alergia, se ha sugerido que el CD30 es un buen candidato, esta molécula pertenece a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Armitage, 1994) y se encuentra en células tipo Th2 y su expresión se asocia directamente con la activación del padecimiento alérgico (Bengtsson, 2001). Para que el CD30 se exprese en los linfocitos en estado de activación, se requiere la acción de la IL-4 y de la molécula coestimuladora CD28 (Gilfillan *et al.*, 1998), lo que sugiere su participación como molécula relacionada a la respuesta Th2. Por otro lado, la lectina ALL es capaz de interaccionar con timocitos medulares murinos (Lascurain *et al.*, 1994), con macrófagos murinos no activados (Gorocica *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 1998) y linfocitos T humanos (Lascurain *et al.*, 1997), reconoce los antígenos T y T<sub>n</sub> (Gal β1,3 GalNAcα1,O-Ser/Thr y GalNAcα1,O-Ser/Thr respectivamente) (Zenteno *et al.*, 1992). La lectina ALL aglutina preferentemente eritrocitos con el fenotipo M, no reconoce a linfocitos B y posee discreta actividad mitogénica sobre linfocitos humanos (Lascurain *et al.*, 1997). Se ha descrito que los linfocitos CD4<sup>+</sup> reconocidos por ALL son tipo Th2, debido a que expresan transcritos para citocinas IL-4 e IL-10 y no expresan IL-2 ni IFN-γ (Chávez, 1999).

## Resultados.

Son resultados del análisis de las células correspondientes al grupo 1 de pacientes (ver material y métodos).

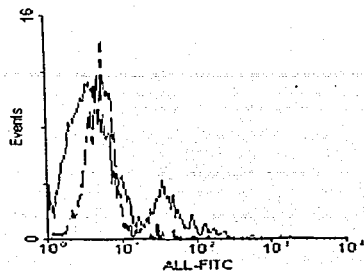
Purificación y viabilidad celular. En el grupo de los pacientes con alergia y en el grupo de los individuos sin alergia se obtuvieron similares resultados en los ensayos de separación celular mediante la técnica de Ficoll, obteniéndose  $1.6 \pm 0.3 \times 10^6$  CMN/ml de sangre, >95% de las células estaban vivas y no hubo diferencias entre las concentraciones, ni con respecto a la viabilidad celular entre grupos.

### Análisis de la subpoblación de linfocitos CD4+ALL+.

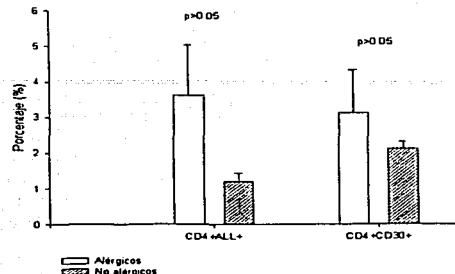
Las células mononucleadas se activaron con PMA y con un ionóforo de calcio durante 24h. La activación celular mostró que los linfocitos CD4+ALL+ aumentaron en número entre las células estimuladas ( $14.9 \pm 2.7$ ) en comparación con las células no estimuladas ( $3.61 \pm 1.4$ ). Así mismo se observó 3.7 veces mayor expresión en el número de linfocitos CD4+ALL+ en las células estimuladas del grupo de los pacientes alérgicos ( $14.9 \pm 2.7$ ) con respecto al porcentaje de linfocitos CD4+ALL+ ( $4.04 \pm 0.63$ ) de las células estimuladas del grupo testigo ( $p < 0.05$ ) (Figura 1A y 1B).

### Análisis de la subpoblación de linfocitos CD4+CD30+.

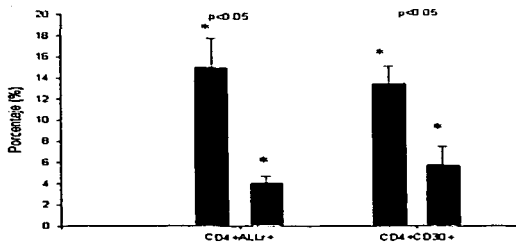
Las células mononucleadas del grupo de los pacientes alérgicos antes de ser estimuladas presentaron un porcentaje de  $3.1 \pm 1.3$  de células CD4+CD30+, mientras que el porcentaje de las células CD4+CD30+ del grupo control fue de se analizaron después de ser activadas *in vitro* y se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de los linfocitos CD4+CD30+. La expresión de esta subpoblación celular fue 2.4 veces mayor en las células estimuladas de los pacientes alérgicos ( $13.4 \pm 1.6$ ) al comparar con las células estimuladas del grupo testigo ( $5.66 \pm 1.6$ ) ( $p < 0.05$ ) (Figura 1B).



A)



B)



C)

Figura 1. A) Histogramas representativos de células CD4+, donde se muestra la expresión de ALL-FITC, en un sujeto control comparado con un paciente alérgico. En células estimuladas 24 h con PMA/Ionomicina. B) Análisis comparativo de células CD4+ALL+ y células CD4+CD30+ de pacaentes alérgicos y no alérgicos sin estímulo. C) Análisis comparativo de células CD4+ALL+ y células CD4+CD30+ estimuladas 24 h con PMA Ionomicina. Comparación entre grupos de pacientes alérgicos (barras oscuras), y no alérgicos (barras claras). Se presenta la media  $\pm$  ES (n=10).

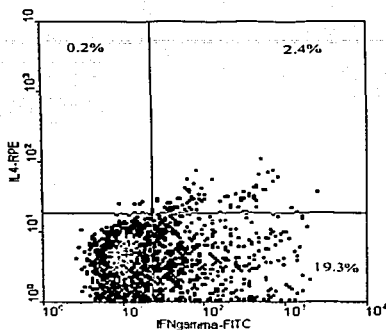
Determinación de IL-4/IFN- $\gamma$  por citometría de flujo.

Se realizó la cuantificación de los linfocitos CD4+ que expresaron IL-4 y/o IFN- $\gamma$ . Los resultados mostraron que únicamente las células que fueron estimuladas, fueron productoras de citocinas. De acuerdo al análisis de citometría de los linfocitos CD4+, se encontró que la relación IL-4/IFN- $\gamma$  en estas células es 4.4 veces mayor en las células del grupo de pacientes alérgicos, comparando contra el grupo de individuos no alérgicos, lo que sugiere que durante el estímulo *in vitro* se generó un microambiente polarizado hacia Th2 (Figura 2).

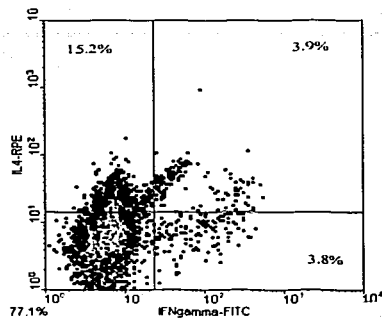
Producción de citocinas por los linfocitos CD4+ALL+. Los linfocitos CD4+ estimulados con PMA durante 24 h, produjeron IL-4 e IFN- $\gamma$ . En los linfocitos CD4+ALL+, se encontró que sintetizan hasta cuatro veces más IL-4 ( $2.6 \pm 0.3$ ) que IFN- $\gamma$  ( $0.6 \pm 0.1$ ). Se encontró una disminución del porcentaje de los linfocitos CD4+ALL+ al analizar después de la incubación de 4 h con brefeldina A (Figura 3).

Discusión.

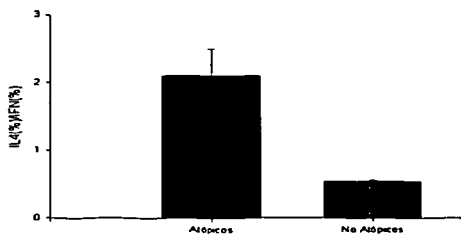
En las enfermedades atópicas se han identificado marcadores de activación de los linfocitos T CD4+, lo que ha sugerido que esta estirpe celular se encuentra elevada en los sujetos alérgicos (Bengtsson, 2001). Así mismo mediante el uso de anticuerpos contra el CD30, se ha encontrado que la población celular que expresa este marcador se encuentra elevada en los pacientes con alergia. En el presente estudio se encontraron diferencias en el porcentaje de los linfocitos CD4+ALL+ entre el grupo de pacientes y el grupo no atópico después de estimular *in vitro* con PMA, esto confirma que la proteína de 70 kDa que se expresa en la membrana de los linfocitos CD4+ reconocida por ALL está desempeñando un papel importante en el proceso de activación en las células de los pacientes con enfermedad alérgica. Se ha descrito que los linfocitos T estimulados por 36 h con ConA y que son reconocidos por esta lectina tienen relación con la fase S del ciclo celular, lo que indica que la expresión de esta glicoproteína tiene relación con la activación celular (Vargas, 2001). Sin embargo, no se presentaron diferencias en



A)

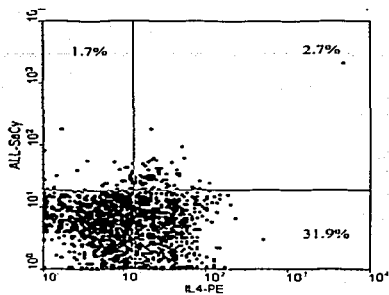


B)

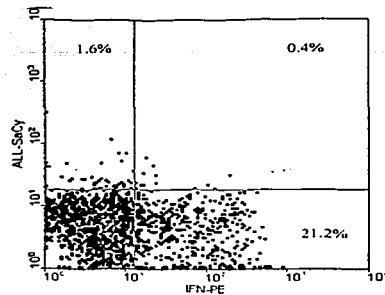


C)

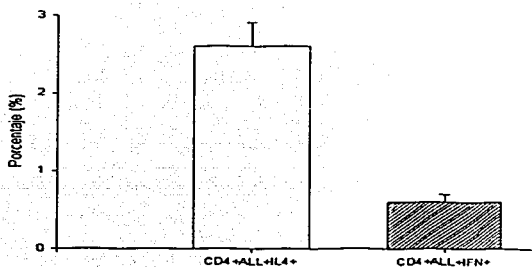
Figura 2. Determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo. A) Se compara la producción de IL4 e IFNgamma en linfocitos CD4<sup>+</sup> de un individuo sano, las CMN fueron estimuladas 24 h con PMA/ionomicina. B) Se compara la producción de IL4 e IFNgamma en linfocitos CD4<sup>+</sup> de un paciente atópico, las CMN fueron estimuladas con PMA/ionomicina durante 24 h. C) Relación IL4/IFNgamma entre el grupo de atópicos (barra oscura) y del grupo de individuos no atópicos (barra clara). Se muestra la media  $\pm$  ES (n=10)



A)



B)



C)

Figura 3. Análisis de las células CD4+ALL+y la co-expresión de citocinas. A) Comparación de ALL+ y de IL-4. B) Comparación de ALL+ e IFNgamma. Citogramas comparativos de un individuo alérgico. Se analizan solo los linfocitos CD4. C) Gráfica donde se comparan los porcentajes de las células CD4+ALL+IL4+ y las células CD4+ALL+IFN+. Se expresa la media  $\pm$  ES (n=10)

los porcentajes de los linfocitos CD4+ALL+ cuando están en reposo, esto podría deberse a que las células de los individuos sanos o de los pacientes no estaban activadas. Probablemente el estadio de la enfermedad tendrá una repercusión en la expresión de la subpoblación de estudio.

Los porcentajes de células CD4+ALL+ y CD4+CD30+ son similares después de la activación *in vitro*. Los porcentajes de los linfocitos CD4+CD30+ de los pacientes alérgicos estimuladas con PMA aumenta hasta 2.4 veces más que en las células estimuladas de los individuos sin alergia, este incremento demostró tener una significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Se han realizado estudios donde las células que expresan el marcador CD30 tras un estímulo con PMA, son productoras de citocinas tipo Th2 (Mingari *et al.*, 1996). Se ha descrito un predominio de células con fenotipo Th2 y se ha comprobado que estimulando a las células de los pacientes alérgicos con PMA o PHA, se confirma una polarización de citocinas tipo Th2 en linfocitos CD4+ (Kang *et al.*, 1997; Leonardi *et al.*, 1999; Pene *et al.*, 1994; Rafiq *et al.*, 2000). En este trabajo verificamos que la relación de IL-4/IFN- $\gamma$  es 4.4 veces mayor en las células CD4+ de los pacientes con alergia en comparación con el grupo no alérgico, como se ha demostrado anteriormente (Kang *et al.*, 1997). Después del estímulo con PMA, el microambiente que se genera es un microambiente es tipo Th2; también se ha propuesto que para la expresión de la molécula CD30 se necesita la acción de IL-4 y CD28 (Gilfillan *et al.*, 1998), por lo que la elevación de IL-4 sobre IFN- $\gamma$  en el microambiente favorece la expresión del CD30 sobre los linfocitos CD4+. La IL-4 favorece la polarización hacia un tipo de respuesta Th2, en parte por la disminución de Th1 y en parte por el aumento de células Th2 (Mossman y Sad, 1996). En el caso de las células CD4+ALL+, su expresión es favorecida quizá por el estímulo de la IL-4 generada en los linfocitos CD4+ tipo Th2. Por lo suponemos que esta estirpe celular es dependiente de un sistema tipo Th2, además se favorece la expresión de la glicoproteína reconocida por ALL por que las propias células CD4+ALL+ son también productoras de IL-4. Lo que sugiere entonces de una participación autocrina y paracrina de IL-4 para esta estirpe celular. La disminución en el porcentaje de las células CD4+ALL+ después de la incubación con brefeldina A, es debido a que la brefeldina A es un



inhibidor de la glicosilación (Haney, 2001; Irurzun *et al.*, 1993; Semel *et al.*, 2002), ya que interfiere con la glicosilación en la vía de secreción de proteínas (Galbete *et al.*, 2000). Por ello, no se puede realizar una asociación directa entre expresión de CD4+ALL+ y las citocinas mediante citometría de flujo. Nuestros resultados sugieren sin embargo, que se podría considerar a la estirpe celular CD4+ALL+ como una subpoblación celular relacionada a procesos de activación de pacientes con alergia, y que su expresión está relacionada con un perfil de citocinas Th2.

### Referencias

1. Armitage, R.J. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 407-413.
2. Bengtsson, A. The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* 2001; 56: 593-603.
3. Busse, W.W., Rosenwasser, L.J. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S799-804.
4. Chávez, R. Purificación de una subpoblación de linfocitos tipo Th2, empleando la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 1999.
5. Galbete, J.L., Martín, T.R., Peressini, E., Modena, P., Bianchi, R., Forloni, G. Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem J* 2000; 348 Pt 2: 307-313.
6. Gilfillan, M.C., Noel P.J., Podack, E.R. Reiner, S.L. Thompson, C.B. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 1998; 160: 2180-2187.
7. Gorocica, P., Lascurain, R., Hernández, P., Porras, F., Bouquetet, S., Vázquez, L., Zenteno, E. Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. *Glycoconj J* 1998; 15: 809-814.

8. Hamid, Q., Barkans, J., Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B. Co-expression of CD25 and CD3 in atopic allergy and asthma. *Immunology* 1992; 75: 659-663.
9. Haney, P.M. Localization of the GLUT1 glucose transporter to brefeldin A-sensitive vesicles of differentiated CIT3 mouse mammary epithelial cell. *Cell Biol Int* 2001; 25: 277-88.
10. Irurzun, A., Perez, L., Carrasco, L. Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett* 1993; 336: 496-500.
11. Kang, D.H., Coe, C.L., McCarthy, D.O., Jarjour, N.N., Kelly, E.A., Rodriguez, R.R., Busse, W.W. Cytokine profiles of stimulated blood lymphocytes in asthmatic and healthy adolescents across the school year. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 481-487.
12. Larche, M., Robinson, D.S., Kay, A.B. The role of T lymphocytes in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 450-463.
13. Lascurain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaña, L.F., Zenteno, E. Recognition of CD4+ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 1994; 83: 410-413.
14. Lascurain R., Porras, F., Baez, R., Chávez, R., Martínez-Cairo, S., Alvarez, G., Zenteno, E. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol Invest* 1997; 26: 579-587.
15. Lee, S.Y., Kim, S.J., Kwon, S.S., Kim, Y.K., Kim, K.H., Moon, H.S., Song, J.s., Park, S.H. Distribution and cytokine production of CD4 and CD8 T-Lymphocyte subsets in patients with acute asthma attacks. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 659-664.
16. Leonardi, A., DeFranchis, G., Zancanaro, F., Crivellari, G., De Paoli, M., Plebani, M., Secchi, A.G. Identification of local Th2 and Th0 lymphocytes in vernal conjunctivitis by cytokine flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 3036-3040.

17. Maldonado, G., Gorocica, P., Agundis, C., Pérez, A., Molina, J., Zenteno, E. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconj* 1998; 15: 615-622.
18. Mingari, M.C., Maggi, E., Cambiaggi, A., Annunziato, F., Schiavetti, F., Manetti, R., Moretta, L., Romagnani, S. Development in vitro of human CD4+ thymocytes into functionally mature Th2 cells. Exogenous interleukin-12 is required for priming thymocytes to produce both Th1 cytokine and interleukin-10. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1083-1087.
19. Mosmann, T.R., Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.
20. Pene, J., Rivier, A., Lagier, B., Becker, W.M., Michel, F.B., Bousquet, J. Differences in IL-4 release by PBMC are related with heterogeneity of atopy. *Immunology* 1994; 81: 58-64.
21. Rafiq, K., Bullens, D.M., Kasran, A., Lorre, K., Ceuppens, J.L., Van Gool, S.W. Differences in regulatory pathways identify subgroups of T cell derived Th2 cytokines. *Clin Exp Immuno* 2000; 121: 86-93.
22. Sagara, H., Okada, T., Okumura, K., Ogawa, H., Ra, C., Fukuda, T., Nakao, A. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 249-254.
23. Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S., Conklin, E. *Avidin-Biotin Chemistry: A handbook*. 1ª ed. Rockford Illinois, USA: Pierce Chemical Company, 1992.
24. Semel, A.C., Selaes, E.C., Singhal, A., Eklund, E.A., Colley, K.J., Bellis, S.L. Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 32830-32836.
25. The, T.H., Feltkamp, T.E.W. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. *Immunology* 1970; 18: 865-873.
26. Vargas, J. Marcadores oligosacarídicos de linfocitos T asociados a la función celular. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2001.

27. Wills-Karp, M., Chiaromonte, M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 21-27.
28. Zenteno, E., Lascurain, R., Montaña, L.F., Vázquez, L., Debray, H., Montreuil, J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J* 1992; 9: 204-208.

## **Capítulo 2. Determinación del porcentaje de la subpoblación de linfocitos CD4+ALL+ en diferentes procesos alérgicos y en diferentes fases de la enfermedad y su asociación con otras moléculas de activación celular.**

### **NOTA: Manuscrito en preparación**

#### Introducción:

Las enfermedades alérgicas se manifiestan por una hipersensibilidad mediada por IgE; esta manifestación puede ser en la piel, la mucosa nasal, el pulmón o la mucosa gastrointestinal (Holgate *et al.*, 2001). Existen diferencias entre patologías, localizadas en piel como la dermatitis atópica y las que su sitio de choque es la mucosa respiratoria; donde existe mayor polarización hacia Th2 es en la dermatitis atópica (Schuerwegh *et al.*, 1999). Lo que sugiere que en la dermatitis atópica existe una inmunopatología más severa en comparación con los otros padecimientos confinados a la mucosa respiratoria.

Se han realizado estudios de correlación entre la expresión de CD30 en linfocitos CD4+ de pacientes con dermatitis atópica y la severidad del padecimiento donde han identificado una asociación directa entre el aumento en la expresión de CD30 en linfocitos CD4+ y el estado de activación del padecimiento alérgico (Yamamoto *et al.*, 2000). Además, se ha observado que existe una estrecha relación entre los niveles de IgE elevada en suero y niveles de sCD30 (Latza *et al.*, 1999). Otros autores han propuesto a la expresión diferencial de marcadores de linfocitos T de memoria en la enfermedad alérgica (Mitra *et al.*, 1999). Se ha identificado al CD62L como una molécula relacionada a estados de activación en linfocitos (Lees *et al.*, 2000). Por otro lado, como ya se ha mencionado, la lectina ALL reconoce a una subpoblación de linfocitos tipo Th2, debido a que expresan transcritos para citocinas IL-4 e IL-10 y no expresan IL-2 ni IFN- $\gamma$  (Chávez, 1999). Se ha propuesto que los linfocitos ALL+ estimulados con ConA, tienen relación con la fase S del ciclo celular (Vargas, 2001). El objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de linfocitos CD4+ ALL+ en diferentes procesos alérgicos, en diferentes

fases de la enfermedad y establecer su asociación con otras moléculas de activación celular.

#### Resultados.

Son resultados del análisis de las células correspondientes al grupo 2 de pacientes (ver material y métodos).

#### Subpoblación de linfocitos CD4+ALL+.

Como se puede observar en la figura 1A, los linfocitos CD4+ALL+ se encuentran en mayor porcentaje en los pacientes con los procesos alérgicos en fase activa, en comparación con los linfocitos CD4+ALL+ de los pacientes con los procesos alérgicos en fase no activa. Los linfocitos CD4+ALL+ se encontraron incrementados en mayor proporción en la dermatitis atópica ( $17.2 \pm 1.2\%$ ) en comparación con la dermatitis de contacto ( $0.8 \pm 0.3$ ) ( $p < 0.05$ ). En el grupo de los pacientes asmáticos graves se encontraron valores de linfocitos CD4+ALL+  $4.5 \pm 1.3\%$ , en tanto que en el grupo de pacientes asmáticos leves fue de  $0.2 \pm 0.08\%$ . El grupo de los pacientes con rinitis activa presentó  $3.6 \pm 1.4\%$  de linfocitos CD4+ALL+ y el grupo de los pacientes con rinitis no sintomática, la subpoblación fue de  $0.4 \pm 0.1\%$  (Figura 1A). Se observa que en los procesos activos la frecuencia de las células CD4+ALL+ se encuentra aumentada respecto al estado de activación, siendo la dermatitis atópica la que presenta diferencia estadísticamente significativa, con respecto a la dermatitis de contacto.

#### Evaluación de la subpoblación de linfocitos CD4+CD62L+.

Se observó una disminución del porcentaje de linfocitos CD4+ que presentaron el marcador CD62L conforme al estado de activación de la enfermedad alérgica. En el grupo de los pacientes con asma grave se encontró que  $10.7 \pm 3.9\%$  fueron CD4+CD62L+ y en el grupo de los pacientes con asma moderado fueron  $75.6 \pm 3.8\%$ , mientras que el grupo de los pacientes con rinitis activa expresaron  $29.9 \pm 7.7\%$ ; y el grupo de rinitis no activa presentó que  $68.1 \pm 7.7\%$  fueron linfocitos CD4+CD62L+. En la alergia confinada a la piel, las células CD4+CD62L+ fueron

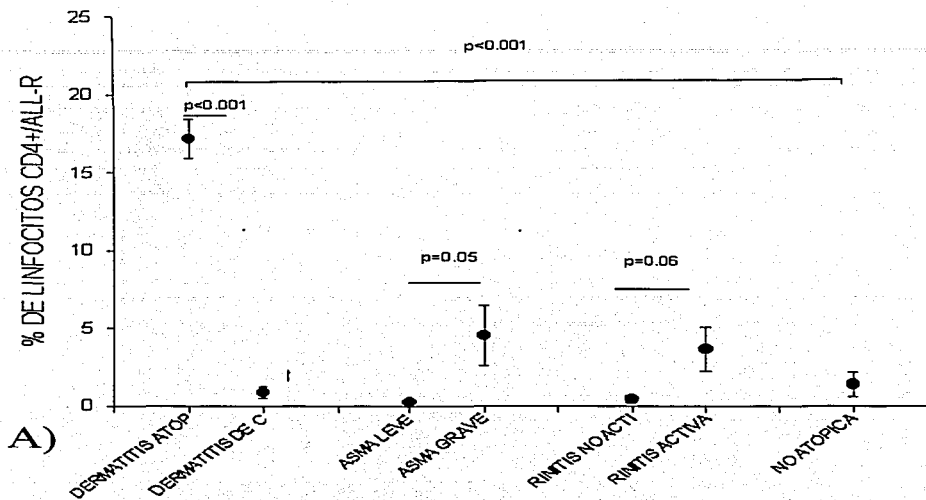


Figura 1. A) Tabla de comparación de la expresión de los porcentajes de CD4+ALL+, por grupo de pacientes. Las células fueron analizadas por citometría de flujo, los resultados son la media  $\pm$  ES.

28.9±4.5%, las del grupo de la dermatitis de contacto fueron 56.1±4.6% y el grupo testigo presentó 41.0±10.3% de la subpoblación CD4+CD62L+.

Realizando un análisis de correlación entre las células CD4+CD62L+ y las células CD4+ALL+ se encontró una correlación negativa (-0.58) en los diversos procesos alérgicos ( $p < 0.05$ ) (Figura 1B).

Evaluación de la subpoblación de linfocitos CD4+CD30+.

EL porcentaje de linfocitos CD4+CD30+ se encuentra elevado en los padecimientos alérgicos en fase activa. Sin embargo, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de pacientes con dermatitis atópica (22.6±5.5%) al comparar con el grupo de pacientes con dermatitis de contacto (3.0±0.9%) ( $p < 0.05$ ); el grupo de los pacientes asmáticos graves presentó 3.1±1.1% de linfocitos CD4+CD30+, mientras que el grupo de los pacientes con asma leve presentó 0.8±0.1%; el grupo de los pacientes con rinitis activa presentó 3.1±1.1% y el grupo testigo presentó 0.2±0.1%. Interesantemente, al realizar un análisis de correlación entre los linfocitos CD4+CD30+ y los linfocitos CD4+ALL+, se encontró una correlación positiva (0.89) en todos los procesos alérgicos ( $p < 0.05$ ) (Figura 1C).

#### Discusión.

Se ha identificado los procesos alérgicos tienen diferencias entre ellos, siendo la dermatitis atópica la manifestación más severa del fenómeno alérgico (Schuerwegh *et al.*, 1999). Se ha descrito al CD30 como molécula de activación celular asociada a linfocitos CD4+ con perfil Th2 (Bengtsson, 2001). Así mismo se ha identificado mediante la lectina de amaranto (ALL) una subpoblación de linfocitos que reconoce linfocitos CD4+ humanos que tienen transcritos para citocinas tipo Th2 (Chávez, 1999) y su expresión se ha encontrado asociada con la fase S del ciclo celular (Vargas, 2001). En este estudio se encontró que existen diferencias en el porcentaje de linfocitos CD4+ALL+ según el padecimiento alérgico. En los padecimientos alérgicos confinados a la mucosa respiratoria con



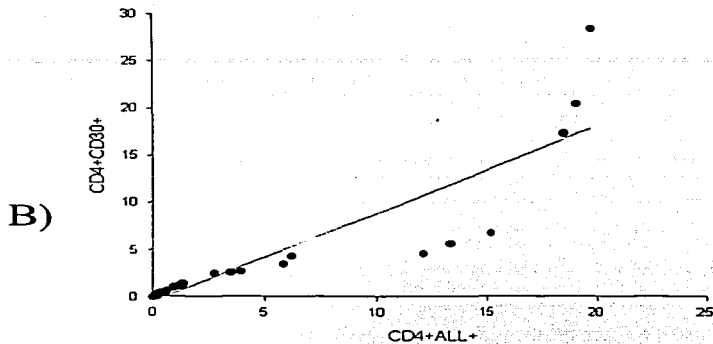


Figura 1B) Análisis de correlación de células CD4+ALL+ y células CD4+CD30+. En todos los procesos alérgicos y los estados de activación de las enfermedades. Las células fueron analizadas por citometría de flujo.

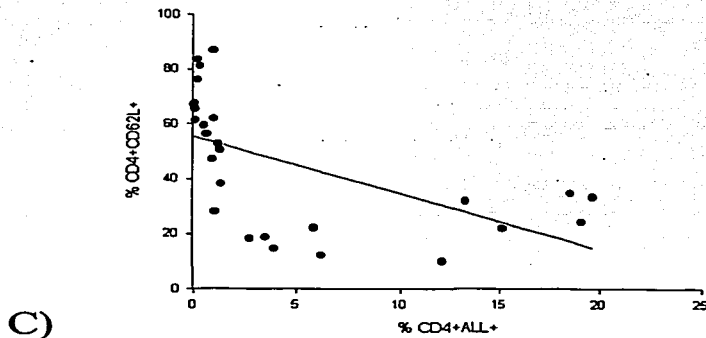


Figura 1C) Análisis de correlación de células CD4+ALL+ y células CD4+CD62L+. En todos los procesos y los estados de activación de las enfermedades. Las células fueron analizadas por citometría de flujo.

la enfermedad en fase activa, el porcentaje de los linfocitos CD4+ALL+ se encontró elevado con respecto a las células del grupo de pacientes que presentaron la enfermedad no activa, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual sugiere que hay otro tipo de células involucradas en el desequilibrio hacia una respuesta Th2. Las células presentadoras de antígeno podrían estar desempeñando un papel preponderante en la inmunopatología del padecimiento en virtud de las moléculas que coestimulan al CD28 (Burastero *et al.*, 1999; Djukanovic, 2000; Sato *et al.*, 1999). En la dermatitis atópica se observó un mayor número de células CD4+CD30+ y CD4+ALL+ en comparación con lo observado en el grupo de pacientes con dermatitis de contacto. Se ha propuesto que la dermatitis atópica está mediada por ambos tipos de citocinas Th1 o Th2, según el estado de activación del padecimiento (Hamid *et al.*, 1996). En la fase activa de la dermatitis atópica se ha sugerido que las citocinas Th2 son las que inducen la activación, mientras que las citocinas Th1 son las que favorecen la cronicidad del padecimiento (Hamid *et al.*, 1996). En algunos estudios, se ha encontrado que el CD30 es una molécula expresada en los linfocitos CD4+ de pacientes con dermatitis atópica y su expresión correlaciona con el estado de activación clínica y los niveles séricos de IgE (Yamamoto *et al.*, 2000). Además, estos linfocitos producen citocinas tipo Th2, por lo que el porcentaje de linfocitos CD4+CD30+ en la dermatitis atópica sugiere que se encuentra en una fase activa y que se está polarizando la respuesta hacia un perfil de citocinas Th2. En el presente trabajo se ha identificado que los linfocitos CD4+ALL+ se encuentran aumentados en sangre periférica principalmente en los pacientes con dermatitis alérgica, lo que sugiere la participación de esta subpoblación celular en la actividad del estado alérgico. Aunque no se demostraron diferencias estadísticas los porcentajes de los linfocitos CD4+ALL+ estuvieron elevados en relación con la actividad del padecimiento de las vías aéreas. Se han descrito fenómenos en los que la O-glicosilación se encuentra aumentada en los procesos de activación celular (Piller *et al.*, 1988). También se ha identificado una glicosiltransferasa relacionada con un fenotipo Th2 (Grable *et al.*, 2002), por lo que no se descarta la posibilidad de que

exista en esta patología alérgica la acción de glicosilaciones distintas para el desarrollo de la activación del fenómeno alérgico. Así mismo, se ha descrito que después de la activación mitogénica de linfocitos murinos TCD4+, la glicoproteína reconocida por ALL se expresa tres veces más de sus niveles basales, lo cual fue identificado por el aumento en el número de células y por el aumento en la densidad de esta glicoproteína en las células, datos que sugieren que se trata de un posible marcador de células activadas (Ortiz *et al.*, 2002).

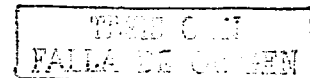
En este estudio también se observó distintos porcentajes de los linfocitos CD4+CD62L+ en los diferentes padecimientos. Algunos autores han encontrado baja densidad en la expresión del CD62L que se relaciona con activación celular (Lees *et al.*, 2000). En este trabajo, no fue posible determinar la densidad de expresión de este marcador, sin embargo, se observó disminución de las células CD4+CD62L+ en los grupos de padecimientos en estado de activación. Así mismo se observó una correlación negativa al realizar la comparación de la subpoblación de linfocitos CD4+CD62L+ y los linfocitos CD4+ALL+, lo que sugiere que los linfocitos CD4+ALL+ son una subpoblación celular relacionada a los estados de activación *in vivo* en la enfermedad alérgica, particularmente en la dermatitis atópica.

#### Referencias.

1. Bengtsson, A. The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* 2001; 56: 593-603.
2. Burastero, S. E., Magnani, Z., Confetti, C., Abbruzzese, L., Oddera, S., Balbo, P., Rossi, G. A., Crimi, E. Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1136-42.
3. Chávez, R. Purificación de una subpoblación de linfocitos tipo Th2, empleando la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. Tesis de Doctorado.

- Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 1999.
4. Djukanovic, R. The role of co-stimulation in airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 46-50
  5. Grabie, N., Delfs, M.W., Lim, Y.C., Westrich, J.R., Lusciuskas, F.W., Lichtman, A.H. Beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase-I gene expression during Th2 but not Th1 differentiation: implications for core2-glycan formation on cell surface proteins. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2766-2772
  6. Hamid, Q., Nasser, T., Minshall, E., Long, Y.L., Boguniewicz, M., Leung, D.Y. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 225-231.
  7. Holgate, S.T., Curch, M.K., Lichtenstein, L.M. *Allergy*. 2ª ed. Londres: Mosby, 2001.
  8. Latza, U., Davis, S., Wilhelm, D., McNight B., Seyfarth, M., Stein, H. Soluble cytokine receptor CD30 in atopic disorders: a case-control study. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 97-104.
  9. Lees, R. K., Ferrero, I., MacDonald, H. R. Tissue-specific segregation of TCR gamma delta+ NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status: parallels with TCR alpha beta+ NKT cells. *Eur J Immunol* 2000; 3: 2901-2909.
  10. Mitra, D.K., De Rosa, S.C., Luke, A., Balamurugan, A., Khaitan, B.K., Tung, J., Mehra N.K., ETR, A.I. O'Garra A, Herzenberg, L.A., Roederer, M. Different representations of memory T cell subsets are characteristic of polarize immunity in leprosy and atopic diseases. *Int Immunol* 1999; 11: 1801-1809.
  11. Ortiz, B., Porras, F., Jiménez-Martínez, M.C., Montaña, L.F., Martínez-Cairo, S., Lascrain, R., Zenteno, E. Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a posible marker for naive and early activated murine T cells. *Cell Immunol* 2002; 218: 34-45.

12. Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., Fukuda, M. Human T-Lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 1988; 263: 15146-15150.
13. Sato, J., Asakura, K., Murakami, M., Uede, T., Kataura, A. Topical CTLA4-Ig suppresses ongoing mucosal immune response in presensitized murine model of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 197-204.
14. Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., De Schutter, L., Bridts, C.H., Verbruggen, A., Stevens, W.J. Flow cytometric detection of type 1 (IL-2, IFN-gamma) and type 2 (IL-4, IL-5) cytokines in T helper and T suppressor/cytotoxic cells in rheumatoid arthritis, allergic asthma and atopic dermatitis. *Cytokine* 1999; 10: 783-788.
15. Vargas, J. Marcadores oligosacáridicos en linfocitos humanos asociados a la función celular. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, 2001.
16. Yamamoto, J., Adachi, Y., Onoue, Y., Kanegane, H., Miyawaki, T., Toyoda, M., Seki, T., Morohashi, M. CD30 expression on circulating memory CD4+ T cells as a Th2-dominated situation in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2000; 55: 1011-1018.



### **Capítulo 3. Análisis comparativo de diferentes marcadores de membrana en diversos procesos alérgicos**

En este capítulo se analizaron las diferencias de expresión de distintos marcadores de activación en linfocitos CD4 y de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno en diferentes procesos atópicos asociando la expresión de estos marcadores con la gravedad del padecimiento. Las células mononucleadas de pacientes del segundo grupo (ver material y métodos) se analizaron por citometría de flujo. Nuestros resultados mostraron que la expresión de las moléculas CD30, CD124 y CD152 en los linfocitos CD4+ estuvieron elevadas en los pacientes con dermatitis atópica en comparación con los pacientes con dermatitis de contacto ( $p < 0.05$ ). También fue interesante que la expresión del marcador CD80 sobre las células presentadoras de antígeno no se encontró elevado en la dermatitis atópica en comparación con los otros procesos atópicos analizados. Nuestros resultados sugieren que existen diferentes mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de las diversas entidades alérgicas y que la expresión del CD30 sobre linfocitos CD4+ podría ser un indicador de dermatitis atópica en fase activa. Así mismo, la subpoblación CD4+CD30+ puede ser útil como referencia en el estudio de la subpoblación de linfocitos CD4+ALL+ en el fenómeno alérgico. Las diferencias en la expresión de los marcadores de membrana en los linfocitos CD4+ durante la actividad del fenómeno alérgico sugieren diferente proceso inmunopatológico, con una base común, el desequilibrio hacia una respuesta Th2.

**Se anexa artículo publicado.**



IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS  
Vol. 32, Nos. 1 & 2, pp. 95-104, 2003

## Comparative Analysis of Mononuclear Cell Surface Markers in Atopic Processes-A Preliminary Study

Yonathan Garfias,<sup>1</sup> Enrique Rojas-Ramos,<sup>1</sup> María del Carmen Jiménez,<sup>1</sup>  
Salvador Martínez-Cairo,<sup>2</sup> Raúl Chávez,<sup>3</sup> Patricia Gorocica,<sup>1</sup>  
Edgar Zenteno,<sup>3</sup> and Ricardo Lascurain<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan, México

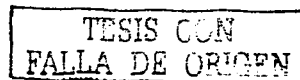
<sup>2</sup>Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

### ABSTRACT

Atopic disorders are driven by the Th2 cell subset. We have determined the expression of costimulatory molecules and cell surface markers on peripheral CD4 + T cells and antigen presenting cells, in different atopic diseases, and we have also tried to correlate the expression of these markers with the severity of the disease. Cells from patients with atopic and contact dermatitis, mild or severe asthma, and symptomatic and non-symptomatic atopic rhinitis were analyzed by flow cytometry. Our results showed that CD30, CD124, and CD152 expression on CD4 + T cells was significantly higher in atopic dermatitis than in contact dermatitis patients ( $p < 0.05$ ). It was interesting to observe that the cell surface expression of CD80 in T and B cells from atopic dermatitis patients was not enhanced as opposed to the other atopic diseases we analyzed. Our results suggest that there are differences in the immune mechanisms

\*Correspondence: Ricardo Lascurain, Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, P.O. Box 70159, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México; E-mail: lascurai@servidor.unam.mx.





involved in the different atopic diseases, and that expression of CD30 in CD4 + T cells might be a marker of disease activity in atopic dermatitis.

## INTRODUCTION

The incidence of atopic diseases has increased in the last decades (Schmid-Grendelmeier et al., 2001), among which atopic dermatitis is one of the most common forms of atopy (Leung, 1997). The most important cells in the atopic process are the Th2 cells and their secreted cytokines IL-3, IL-4, IL-5, and IL-13 (Farrell et al., 2001; Leung, 1997); however, antigen-presenting cells have also been recently implicated in this process (Garfias et al., 2001; Seder and Paul, 1994). Activation of CD4 + T cells require at least two activation signals, one mediated by the TCR-MHC complex and the other by the CD28 costimulatory molecule, which is the ligand of CD80 or CD86 in antigen-presenting cells. CD86 has been proposed as a possible marker of Th2 immune response polarization whereas expression of CD80 has been proposed as amplifier of the atopic response (Larche et al., 1998). There are reports that show elevated serum levels of CD30, a member of the TNF receptor family, in atopic dermatitis (Bengtsson et al., 1997). The aim of this study was to describe the main cell surface markers expressed by CD4 + T cells, B cells and monocytes isolated from atopic dermatitis patients and to compare the results with cells isolated from other atopic diseases, which served as control.

## MATERIALS AND METHODS

### Monoclonal Antibodies and Reagents

Quantum Red (QR)-, fluorescein isothiocyanate (FITC)-, or phycoerythrin (PE)-conjugated mouse monoclonal antibodies against surface molecules of human cells were used. FITC-mouse IgG1 anti-CD30 antibodies were obtained from DAKO (Carpinteria, CA, USA). FITC-mouse IgG2a anti-CD19, FITC-mouse IgG2a anti-CD14 and mouse IgG2a anti-CD152 antibodies were from Serotec Products. (Raleigh, NC, USA). PE-mouse IgG1 anti-CD28, FITC-mouse IgG1 anti-CD62L, PE-mouse IgM anti-CD80, PE-mouse IgG2b anti-CD86 antibodies, and all isotype controls were from PharMingen (San Diego, CA, USA). Mouse IgG2a anti-CD124 was from R&D Systems (Davies, CA, USA). QR-mouse IgG1 anti-CD4, FITC-goat anti mouse IgG antibodies, as well as hypotaque, bovine serum albumin type IV, trypan blue dye and sodium azide were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Skin prick tests to house dust mite extract (10,000 allergic units/ml of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*) were from Greer Labs. (Lenoir, NC, USA) and patch True-Test was from Glaxo-Welcome (Boston, MA, USA).

### Patients and Clinical Evaluation

Twenty-eight patients participated in the study and were distributed as follows (Table 1): four of them had non-symptomatic atopic rhinitis and four had symptomatic





## Mononuclear Cell Surface Markers

97

Table 1. Distribution of patient groups and their main characteristics.

	N	SPT	IgE > 300 UI/ml	Patch skin test	Active symptoms	FEV1*	Age
Atopic dermatitis	5	Positive	Positive	NA	Positive	ND	38±12
Contact dermatitis	3	Negative	Negative	Positive	Positive	ND	40±7
Mild asthma	5	Positive	Positive	ND	±	80-100%	35±10
Severe asthma	5	Positive	Positive	ND	Positive	< 60%	34±15
Non-symptomatic rhinitis	4	Positive	Positive	ND	Negative	ND	25±5
Symptomatic rhinitis	4	Positive	Positive	ND	Positive	ND	30±3
Non atopic healthy controls	4	Negative	Negative	Negative	Negative	ND	32±9

SPT: skin prick test to *Dermatophagoides pteronyssinus* and/or *D. farinae* 15 min after application; True test evaluated 72 h after application. FEV1: Forced Expiratory Volume at second 1. \*Compared vs. predicted value. ND Not determined.

atopic rhinitis; five had mild atopic asthma and five had severe atopic asthma; five showed atopic dermatitis and five showed contact dermatitis. The control group was composed of four non-atopic healthy individuals. All atopic individuals had atopic history, total serum IgE > 300 UI/ml, > 15% eosinophils in nasal mucus and > 10% blood eosinophils, and were either 3+ or 4+ positive to *Dermatophagoides pteronyssinus* and to *D. farinae* in skin prick tests. Patients with contact dermatitis and non-atopic individuals were negative to these tests. Patients with contact dermatitis were positive to nickel into patch True-Test (Glaxo-Wellcome), 72 h after application. The classification of asthma was based according to criteria of American Thoracic Society (ATS, 1987). All patients were informed and a written consent was obtained, and the protocol was approved by the Ethics Committee of the Institution.

## Cell Preparation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 10 ml of heparinized whole blood samples diluted 1:1 in phosphate buffered saline (PBS: 0.01 M sodium phosphate, 0.14 M sodium chloride, pH 7.2). This mixture was overlaid onto 5 ml hystopaque (1.077 density) in centrifuge tubes and centrifuged at 800 g at room temperature for 30 min. PBMC collected from the interface layer were washed twice in PBS with 0.2% bovine serum albumin, 0.2% sodium azide (PBA). The cell pellet was suspended in PBA and the viability was assessed under light microscopy by the trypan blue dye exclusion. The cells were counted in a hemocytometer obtaining > 95% of viability. Cells ( $5 \times 10^5$ ) were then suspended in  $50 \mu$ l of PBA for analysis.

## Flow Cytometry

Eppendorf tubes containing  $5 \times 10^5$  cells were incubated with  $5 \mu$ l of antibodies against cell surface markers, during 30 min at room temperature, protected from light,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



and subjected to only one incubation if meant for direct fluorescence, or two incubations for indirect fluorescence. After incubations, cells were washed in PBA and then fixed with 50  $\mu$ l of 0.1% *p*-formaldehyde in PBS and later analysed on a FACS flow cytometer (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). Lymphocytes and monocytes were identified on basis of forward and side light scatter characteristics, and expression of cell surface markers were analyzed separately by specific fluorescence. Staining controls either with fluorochrome-labelled isotype matched mouse antibodies of unrelated specificity, or with FITC-labelled secondary antibody were used.

### Statistical Analysis

Comparison of fluorescent cells percentage between groups was by the Sigma-Plot<sup>TM</sup> and Sigma-Stat<sup>TM</sup> programs. In order to compare many groups one way ANOVA was used, taking  $p < 0.05$  as statistical significance.

### RESULTS

CD30 expression on CD4 + T cells. The expression of CD30 in CD4 + T cells from PBMC showed a statistical difference among patients with atopic dermatitis, expressing 7 times higher than patients with contact dermatitis ( $p = 0.01$ ). CD4 + T cells from severe asthma patients had cell percentages higher in the expression of CD30, than cells from mild asthma patients. We observed the same tendency in percentage high of CD30 expression on CD4 + T cells from symptomatic rhinitis patients, when were compared to CD30 expression on CD4 + T cells from non-symptomatic rhinitis patients (Table 2, Figure 1A).

CD62L + expression on CD4 + T cells. CD62L showed to be useful to discriminate between non-symptomatic from symptomatic stages of either asthma or rhinitis. Mild asthma group and non-symptomatic rhinitis group patients had significant higher percentages in the CD62L expression than in both the severe asthma group and the symptomatic group, yielding statistical differences of  $p = 0.001$  and  $p = 0.01$  (Figure 1B). Comparison of the percentage of positive cells to CD62L in the atopic

Table 2. Comparison of cell surface markers expressed in CD4 + T cells in different atopic processes.

	CD30	CD124	CD152	CD62L
Atopic dermatitis	22.7 $\pm$ 7.8	19.0 $\pm$ 9.2	15.0 $\pm$ 6.0	29 $\pm$ 6.5
Contact dermatitis	3.0 $\pm$ 1.7	2.5 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 0.2	56 $\pm$ 15.5
Mild asthma	0.9 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	76 $\pm$ 13.3
Severe asthma	3.3 $\pm$ 2.3	0.9 $\pm$ 0.80	0.9 $\pm$ 0.8	11 $\pm$ 7.9
Non-symptomatic rhinitis	0.3 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 1.0	1.0 $\pm$ 1.0	68 $\pm$ 8.5
Symptomatic rhinitis	3.3 $\pm$ 2.3	2.9 $\pm$ 2.4	1.6 $\pm$ 0.9	30 $\pm$ 8.0
Non atopic	0.2 $\pm$ 0.02	1.1 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.6	50 $\pm$ 11.5



## Mononuclear Cell Surface Markers

99

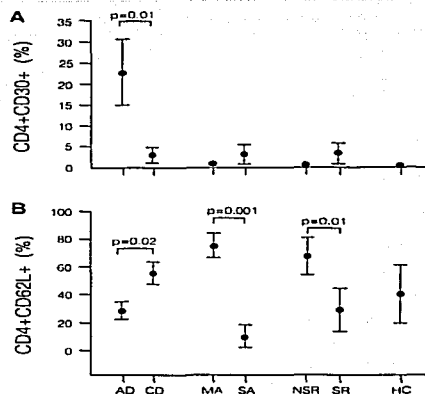


Figure 1. A. Comparison of CD4 + CD30 + T cells among all atopic processes, showing statistical differences ( $p < 0.05$ ). B. CD4 + CD62L + expression in T cells from atopic processes, showing statistical differences ( $p < 0.05$ ).

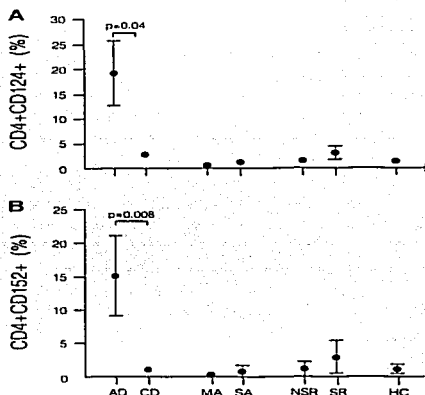
dermatitis group was 1.9 times higher than cells in the contact dermatitis group, and yielded a statistical significant difference ( $p = 0.02$ ) (Table 2).

CD124 expression on CD4 + T cells. CD124 showed only differences in its expression between atopic dermatitis and contact dermatitis, revealing a statistical significance ( $p = 0.04$ ). The comparison of CD124 expression between mild asthma and severe asthma, showed no statistical difference, nor did the comparison between non-symptomatic rhinitis against symptomatic rhinitis (Figure 2A).

CD152 expression on CD4 + T cells. CD152 expression showed the same tendency as the CD124 surface marker; cells from patients with atopic dermatitis had 13.6 times higher expression than cells from contact dermatitis ( $p = 0.008$ ). The expression of this marker in cells from other groups of patients showed no statistical difference (Figure 2B).

Costimulatory molecules (CD80 or CD86) on antigen-presenting cells. As shown in Table 3, the monocytes (CD14 + cells) from symptomatic rhinitis patients that expressed CD80 had higher percentages than in cells from patients with non-symptomatic rhinitis ( $p = 0.01$ ). Other groups had no statistically significant differences, however, we can observe that cells from airway atopic processes had high values in CD80 expression when they were compared either with other allergic processes such as atopic

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figure 2.** A. Comparison of CD4 + CD124 + T cells among all atopic processes, showing statistical differences ( $p < 0.05$ ). B. Comparison of CD4 + CD152 + T cells among all atopic processes, showing statistical differences ( $p < 0.05$ ).

dermatitis and contact dermatitis, or a healthy control group (Figure 3A). With respect to CD86 expression on CD4 + T cells, there was no statistical difference among monocytes from any group of patients (Table 3).

CD80 expression on CD19 + cells. Cells from mild asthma patients, showed high percentages of CD80 expression when comparing the expression of this marker against

**Table 3.** Comparison of cell markers on antigen-presenting cells in atopic processes.

	CD14		CD19	
	CD80	CD86	CD80	CD86
Atopic dermatitis	3.1±1.4	17.1±4.5	5.13±0.1	10.2±7.1
Contact dermatitis	2.1±1.1	16.1±4.1	2.94±1.7	1.1±0.2
Mild asthma	17.2±5.3	18.±3.8	5.9±2.4	0.2±0.2
Severe asthma	11.7±10.9	24.0±8.3	1.8±1.1	4.5±4.3
Symptomatic rhinitis	9.3±2.8	18.8±2.8	1.2±0.4	0.4±0.4
Non symptomatic rhinitis	3.2±2.5	15.5±7.9	6.3±1.7	3.6±2.9
Non atopic	2.0±1.6	13.6±3.3	0.5±0.12	1.4±1.5

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## Mononuclear Cell Surface Markers

101

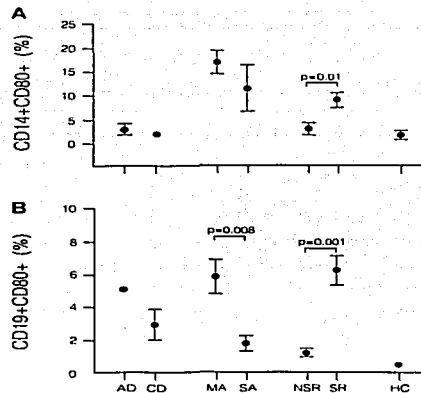


Figure 3. A. Comparison of CD14 + CD80 + cells among all atopic processes, showing statistical differences ( $p < 0.05$ ). B. Comparison of CD19 + CD80 + cells among all atopic processes, showing statistical differences ( $p < 0.05$ ).

those cells from severe asthma, revealed a statistical difference ( $p = 0.008$ ). In contrast, cells from non-symptomatic rhinitis patients, expressed a 5 times lower percentage expression of the marker than cells from symptomatic rhinitis patients ( $p = 0.001$ ). Comparison between percentage of cells from atopic dermatitis and contact dermatitis revealed no statistical difference (Figure 3B). Expression of CD86 on CD19 + cells showed no statistical difference among any groups (Table 3).

## DISCUSSION

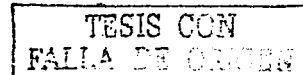
Our results showed that atopic dermatitis is the most unbalanced among the atopic diseases analyzed. The cell surface markers such as CD124 and CD30, as well as the cell activation marker CD152, were more strongly expressed on cells from atopic dermatitis than from other atopic diseases analyzed in this work. CD124 (IL-4 receptor) is essential for the Th2 deviation in atopic processes, the blocking of CD124 with mAb seems to be effective to reduce the allergic response in the lung in the asthmatic murine model (Gavett et al., 1997); moreover, it has been shown that mutations in IL-4R are associated with atopic diseases (Hershey et al., 1997; Izuhara et al., 2000). In allergic



contact dermatitis, the expression of CD124 provides a route for IL-4-mediated damage (Rowe and Bunker, 1998). In this work, we identified that the expression of CD124 and CD152 on CD4 + T cells was significantly higher in atopic dermatitis than in contact dermatitis patients. CD30 is a cell surface marker that belongs to the tumour necrosis factor receptor family (TNFR), and its expression in B cells is closely related with high IgE serum levels in atopic patients (Esnault et al., 1996). CD30 is preferentially associated with Th2 responses because the expression of CD30 by activated T cells is dependent on IL-4 (Nakamura et al., 1997). This marker seems to be useful to distinguish Th2 cells from Th1 cells in atopic disorders as well as in other non-atopic pathologies, such as Ommen's syndrome, systemic lupus erythematosus, or HIV infection (Del Prete et al., 1995; Romagnani et al., 1995). We identified more CD30 expressing cells in atopic dermatitis than in contact dermatitis, suggesting that CD30 has an important role in atopic dermatitis; furthermore, the possibility that CD30 could be another activation pathway through which these cells are regulating the immune response towards a Th2 profile, cannot be ruled out.

The expression of the L-selectin (CD62L), a lectin-like adhesion molecule, mediates lymphocyte homing and leukocyte accumulation at inflammation sites, indicating the activation status of the cell: the CD62L(lo) phenotype is present on activated cells at which CD62L(hi) is not in the activation status (Lees et al., 2001). We cannot observe differences in the expression density, but we observed a lower expression percentage of CD62L in CD4 + T cells from both severe asthma and symptomatic rhinitis patients, than in mild asthma or non-symptomatic rhinitis patients, suggesting that cells in severe asthma and active rhinitis CD4 + T cells are present in a more activated state. In atopic dermatitis, the increase in CD152 expression suggests that CD4 + T cells are activated; although, recent reports suggest that this marker is related with anergic processes (Hattori et al., 2001).

Analysis of cell surface costimulatory molecules from antigen-presenting cells showed that differences in their expression depend on the atopic process itself. Skin allergic pathologies, such as atopic dermatitis, are different from processes confined to the airway mucosa, such as asthma and atopic rhinitis. Costimulation by CD80 expressed by alveolar macrophages is probably involved in the amplification of the allergen-specific T-cell response in the airways of asthmatic subjects (Burastero et al., 1999; Djukanovic, 2000; Sato et al., 1999). In rhinitic patients, we identified significant differences between CD80 expression percentages in both CD19 + cells and CD14 + cells obtained from symptomatic when they were compared with similar cells from non-symptomatic rhinitic patients. This difference suggests their relevance in the unbalance, probably mediating the polarization state in atopy. The opposite was observed with the CD80 expression on CD19 + cells where the percentage of these cells was elevated in mild asthmatic processes, suggesting that B cells expressing this costimulatory molecule are mediating the symptomatic state through a reducing mechanism towards Th2. With respect to CD86 expression on antigen presenting cells, we do not observe differences. However, cells from patients with bronchial asthma, expressed CD86 as a possible marker of a Th2 polarization profile, and CD80, as an amplifier of the atopic response (Larche et al., 1998). Other studies have shown a co-relationship between CD86 + CD19 + cells and high IgE levels (Jirapongsananurak et al., 1998), and they also showed that CD86 + B cells have significantly higher levels of IL4-R and CD23 expression than CD80 + B cells; these data demonstrated the





predominant expression of CD86 in atopic dermatitis (Jirapongsananuruk et al., 1998). Our results were obtained with non activated cells and in these conditions we do not find differences. Taken together with our results allow suggesting that each one of the atopic diseases is mediated by different immunopathologic process.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Gisela Martínez (UNAM) for technical assistance. This work was financed in part by CONACyT (34814-M) and PAPIIT-UNAM, Mexico.

#### REFERENCES

- American Thoracic Society (1987). Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136(1):225-244.
- Bengtsson, A., Holm, L., Back, O., Fransson, J., Scheynius, A. (1997). Elevated serum levels of soluble CD30 in patients with atopic dermatitis (AD). *Clin. Exp. Immunol.* 109(3):533-537.
- Burastero, S. E., Magnani, Z., Confetti, C., Abbruzzese, L., Oddera, S., Balbo, P., Rossi, G. A., Crimi, E. (1999). Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103(6):1136-1142.
- Del Prete, G., Maggi, E., Pizzolo, G., Romagnani, S. (1995). CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link. *Immunol. Today* 16(2):76-80.
- Djukanovic, R. (2000). The role of co-stimulation in airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* 30(S 1):46-50.
- Esnault, S., Benbernou, N., Lavaud, F., Guenounou, M. (1996). Spontaneous CD30 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from atopic patients with high IgE serum levels. *Clin. Exp. Immunol.* 106(1):67-72.
- Farrell, A. M., Antrobus, P., Simpson, D., Powell, S., Chapel, H. M., Ferry, B. L. (2001). A rapid flow cytometric assay to detect CD4 + and CD8 + T-helper (Th) 0, Th1 and Th2 cells in whole blood and its application to study cytokine levels in atopic dermatitis before and after cyclosporin therapy. *Br. J. Dermatol.* 144(1):24-33.
- Garfias, Y., Rojas-Ramos, E., Lascurain, R., Chávez, R., Hernández, J., Zenteno, E. (2001). Avances recientes en la inmunopatología de las enfermedades atópicas. *Rev. Alerg. Mex.* 48(3):68-74.
- Gavett, S. H., O'Hearn, D. J., Karp, C. L., Patel, E. A., Schofield, B. H., Finkelman, F. D., Wills-Karp, M. (1997). Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am. J. Physiol.* 272(2 pt. 1):L253-L261.
- Hattori, H., Okano, M., Yoshino, T., Akagi, T., Nakayama, E., Saito, C., Satoskar, A. R., Ogawa, T., Azuma, M., Nishizaki, K. (2001). Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecule in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 31(8):1242-1249.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- Hershey, G. K., Friedrich, M. F., Esswein, L. A., Thomas, M. L., Chatila, T. A. (1997). The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N. Engl. J. Med.* 337(24):1720-1725.
- Izuhara, K., Yanagihara, Y., Hamasaki, N., Skirakawa, T., Hopkin, J. M. (2000). Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106(1 Pt. 2): S65-S71.
- Jirapongsananuruk, O., Hofer, M. F., Trumble, A. E., Norris, D. A., Leung, D. Y. (1998). Enhanced expression of B7.2 (CD86) in patients with atopic dermatitis: a potential role in the modulation of IgE synthesis. *J. Immunol.* 160(9):4622-4627.
- Larche, M., Till, S. J., Haselden, B. M., North, J., Barkans, J., Corrigan, C. J., Kay, A. B., Robinson, D. S. (1998). Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J. Immunol.* 161(11):6375-6382.
- Lees, R. K., Ferrero, I., MacDonald, H. R. (2001). Tissue-specific segregation of TCR gamma delta + NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status: parallels with TCR alpha beta + NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 31(10):2901-2909.
- Leung, D. Y. (1997). Atopic dermatitis: immunobiology and treatment with immune modulators. *Clin. Exp. Immunol.* 107(Suppl. 1):25-30.
- Nakamura, T., Lee, R. K., Nam, S. Y., Al-Ramadi, B. K., Koni, P. A., Bottomly, K., Podack, E. R., Flavell, R. A. (1997). Reciprocal regulation of CD30 expression on CD4 + T cells by IL-4 and IFN-gamma. *J. Immunol.* 158(5):2090-2098.
- Romagnani, S., Del Prete, G., Maggi, E., Chilosi, M., Caligaris-Cappio, F., Pizzolo, G. (1995). CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J. Leukoc. Biol.* 57(5):726-730.
- Rowe, A., Bunker, C. B. (1998). Interleukin-4 and the interleukin-4 receptor in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 38(1):36-39.
- Sato, J., Asakura, K., Murakami, M., Uede, T., Kataura, A. (1999). Topical CTLA4-Ig suppresses ongoing mucosal immune response in presensitized murine model of allergic rhinitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119(3):197-204.
- Schmid-Grendelmeier, P., Simon, D., Simon, H. U., Akdis, C. A., Wuthrich, B. (2001). Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy* 56(9):841-849.
- Seder, R. A., Paul, W. E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4 + T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12:635-673.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



#### **Capítulo 4. Expresión de CD30 en linfoblastos CD4+ no apoptóticos estimulados *in vitro* con el alérgeno específico.**

##### **Manuscrito en preparación**

En el presente capítulo, se analizó *in vitro* la expresión de la molécula CD30 en los linfoblastos alérgeno-específicos. Se realizó un ensayo de proliferación de células mononucleadas de pacientes alérgicos estimuladas con extracto proteico de *Dermatophagoides pteronyssinus*. Se estableció el tiempo de cultivo a los siete días, se evaluó la proliferación celular y la expresión del CD30 en linfoblastos CD4+. Además se determinó el efecto de la IL-4 en este sistema. Se observó que el 90% de los linfoblastos alérgeno-específicos CD30+ fueron CD4+. Así mismo, al determinar la producción de citocinas intracelulares en los linfoblastos CD4+CD30+, se observó que las cinéticas de expresión de IL-4 e IFN- $\gamma$ , en cuanto al tiempo, se comportaron de manera similar, con un máximo de síntesis a los 5 días. Sin embargo, se observó que la IL-5 tuvo su máxima expresión a los 7 días. Otros resultados mostraron que los linfoblastos CD4+CD30+ no estuvieron en procesos de apoptosis. Al neutralizar la actividad de la IL-4 con un anticuerpo contra la cadena alfa del receptor de la IL-4, se observó que disminuyó la proliferación celular al igual que el porcentaje de linfoblastos CD4+CD30+, mientras que se incrementó el porcentaje de células apoptóticas. Estos resultados sugieren que la expresión de la molécula CD30 en los linfoblastos CD4+ identifica una población protegida de apoptosis, además que su expresión está en relación con la IL-4.

## Abstract.

CD30 has been associated to atopic disorders, and, it has been associated to activation states on atopic dermatitis. CD30 belongs to the Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) family and it has been proposed that CD30 is able to mediate either apoptosis or cell proliferation, however its function on atopic diseases is not fully understood. The aim of this study was to know whether CD30 is associated with proliferation or apoptosis and to know how IL-4 is related to its expression on an *in vitro* system. We obtained peripheral blood mononuclear cells from a group of patients with airways allergy and cultured specifically with *D. pteronyssinus* for seven days and to inhibit the function of IL-4, we used a neutralizing antibody against CD124, which is the IL-4 receptor alpha chain. Intracellular cytokines, CD30 expression and apoptosis were evaluated. The results showed that around 90% of blasts generated in this system, were CD4+ cells and >90% of CD30+ cells were CD4+ cells. IL-4 and IFN $\gamma$  had their plateau of expression on CD4+CD30+ blast cells on day 5, whereas IL-5 had its plateau of expression at day seven. 7AAD and annexin V analysis, showed that CD30+ cells were negative to both. When anti-CD124 moAb was used, the expression of CD4+CD30+ was reduced by 50%, moreover, the number of apoptotic cells increased and the number of blast cells generated was decreased. These results suggest that CD30 in an allergic system is associated to cell proliferation rather than apoptosis.

## Introduction.

CD30 has been associated with Th2 related processes such as allergic disorders (Blanco *et al.*, 1999; Capproni *et al.*, 1997; Cavagni *et al.*, 2000; Dummer *et al.*, 1997; Dummer *et al.*, 1998; Esnault *et al.*, 1996; Folster-Holst *et al.*, 2002; Spinozzi *et al.*, 1995; Suzuki, 1999). CD30 function on allergic diseases has been associated with a Th2 pattern (Yamamoto *et al.*, 2000; Bengtsson, 2001). *In vitro* allergen-induced Th2 cytokine production correlated positively with CD30 expression on CD4+ T cells of atopic patients (Leonard *et al.*, 1997). CD30 expression is regulated by IL-4 (Gilfillan *et al.*, 1998), and has been described as an important costimulatory signal for the development of Th2 type responses (Del Prete *et al.*, 1995). It has been proposed that CD30 function is able to mediate either apoptosis or proliferation signals (Ducket and Thompson, 1997; Mir *et al.*, 2000; Schneider and Hubinger, 2002; Seah and Rook, 2001). TCR-independent CD30-mediated IL-13 release correlated with activation of NF $\kappa$ B that could have important implications in airway inflammation (Harlin *et al.*, 2002). There is evidence that a Th1/Th2 imbalance in asthmatic inflammation may be a result of premature apoptosis within the Th1 subset (Cormican *et al.*, 2001). In fact, peripheral mononuclear cells of atopic patients treated with specific immunotherapy, showed that *in vitro* allergen stimulation determined that CD4+IL4+ cells underwent rapid apoptosis, suggesting that a Th2 activated population is decreased because selective apoptosis on that cell population (Guerra *et al.*, 2001). Also, there is a selective resistance to Fas-dependent apoptosis on T cells from asthmatics, because an ineffective activation of Fas signal transduction which may contribute to T cell-dependent immunoinflammation in asthma (Jayaraman *et al.*, 1999). The aim of this study was to determine whether allergen-induced CD30 expression on CD4+ T cells is associated either with proliferation or apoptosis and to know if the blockade of the IL4R affects CD30 expression and cell survival or apoptosis on an atopic model.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Materials and Methods

**Subjects.** The group of subjects were organized as follows: 15 patients with atopic rhinitis and mild asthma (7 male and 8 female); age  $26 \pm 9$  years. Allergic condition was confirmed with a clinical history and physical examination, skin prick test positive to *Dermatophagoides pteronyssinus* (Allerstand, Mexico City, Mexico), total serum IgE  $875 \pm 225$  IU/ml, blood eosinophils  $>10\%$ . A control group: 7 non allergic subjects, (4 female and 3 male); age  $35 \pm 8$  years with no history of atopy. Skin prick test negative to *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*). All patients and controls were informed and accepted to participate in this study, the protocol was approved by the ethical committee of the health institution. Table 1.

**Cell isolation.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from whole blood by using a differential centrifugation gradient density (Lymphoprep Axis-Shield, Oslo Norway). Cells were suspended in RPMI-1640 (Sigma, St Louis MO, USA) and viability was determined by Tripan blue exclusion dye.

**Determination of cell proliferation.**  $1 \times 10^7$  PBMC diluted in 1 ml of RPMI were incubated for 10 min at room temperature ( $25 \pm 30^\circ\text{C}$ ) with  $15 \mu\text{l}$  of 0.5 mM Carboxy-Fluorescein-Succimidil-Ester (CFSE)(Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in the dark. After incubation cells were suspended in 8 ml of RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and centrifuged, the cell pellet was diluted in 1 ml of supplemented RPMI (10% heat-inactivated FCS, 2mM L-glutamine, 100 IU/ml of penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of streptomycin 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1M sodium pyruvate.

**Cell culture.**  $2.5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$  cells were cultured in supplemented RPMI and seeded in a 96 well cell culture plate (Nalgene Nunc International, Denmark), at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Cells were stimulated with *Der p* (Allerstand, México) at different concentrations and different time to establish the optimal time and dose

for the subsequent assays. Cells were stimulated with ConA (2 $\mu$ g/ml) as a stimulation control. At different time, cells were harvested and labelled with labelled monoclonal antibodies to cell surface markers and intracellular cytokines (see further).

**IL-4R Blockade.** To block the activity of the IL-4 receptor, 50 ng/ml of a blocking monoclonal antibody against IL4R $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used as recommended by the manufacturer to inhibit IL4 function in an *in vitro* system (Kitamura *et al.*, 1989).

**Cell surface staining and intracellular cytokines.** Before harvesting (4 h), 10 $\mu$ g/ml Brefeldin A was added to the cell culture to inhibit the transport of new cytokine production. Cells were washed with staining buffer (phosphate buffer saline 0.15 M (PBS), 0.2% bovine serum albumin (BSA), and 0.2% NaN<sub>3</sub>) and labelled with mouse anti human monoclonal antibodies to cell surface markers: CD3-FITC (BD Pharmingen, San Jose CA, USA), CD4-QR (Sigma, St. Louis MO, USA), CD8-RPE (Sigma), CD30-PE (Pharmingen, San José CA, USA). After membrane staining, cells were washed and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at 4°C, the cells were washed and permeabilized with 0.1% saponin in PBS with 10% BSA and 1% NaN<sub>3</sub>, for 15 minutes at room temperature, cells were stained with PE- or FITC- conjugated mouse moAb against human intracellular cytokines IFN $\gamma$ -FITC (BD Pharmingen, San José, CA, USA) IL-4-FITC (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IL-5-RPE and IL-5-FITC (BD Pharmingen, San José, CA, USA). Suitable conjugated isotype controls were used.

**Apoptosis.** Two methods were performed to determine apoptosis. One method is related to the expression of phosphatidylserine using Annexin-V (Santa Cruz Inc, Santa Cruz, CA, USA) and Propidium Iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the other is to determine the cell membrane permeability using the dye 7-Amino-Actinomycin-D (7AAD) which is also an intercalating DNA molecule Described by Lecoeur (Lecoeur *et al.*, 1998).

FITC-Annexin-V.  $1 \times 10^6$  cells were diluted in 50  $\mu$ l of binding buffer (10 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 140 mM NaCl) and incubated with 1  $\mu$ g FITC-Annexin-V for 15 min at RT in the dark; cells were incubated with 1  $\mu$ g PI or CD30-RPE. Cells were acquired on FACScalibur™ (Becton-Dickinson, San José CA, USA). Apoptotic cells were considered IP negative and Annexin-V positive. To estimate the apoptotic index (AI) apoptotic cells were divided by total of gated cells (blast cells).

7-AAD. After cell staining, samples were incubated with 7-AAD for 20 minutes at 4°C in the dark. The samples were acquired on FACScalibur™. A blast cells gate was created depending on FSC vs 7AAD features; we selected the blasts 7AAD negative gate to analyze the samples.

Flow Cytometry. For FCM analysis WinMDI 2.8 software for PC was used.

Statistical Analysis. The data obtained in this study were evaluated using the Mann Whitney "U" test  $p < 0.05$  was taken as statistically significant, and correlation coefficient was calculated with Pearson product.

**Table 1. Main characteristics of patients and controls.**

Subjects	n	Age	SPT*	IgE (UI/mL)	Blood Eosinophilis
Allergic	15	26 $\pm$ 9	++++	>300	>10%
Non allergic	7	35 $\pm$ 8	Negative	<300	<10 %

\*SPT: Skin Prick Test to *Dermatophagoides pteronyssinus*.

## Results.

**Cell Proliferation.** To determine the optimal time and allergen concentration cells were stained with CFSE. After 3, 5 and 7 days of culture and with different doses (from 10, to 40  $\mu\text{g/ml}$ ), cells were harvested and an analysis was made 1. according to their FSC and SSC features to determine the generation of blast cells and 2. A DI (Division Index) was calculated according to the reduction of CFSE fluorescence intensity as described by Angulo and Fulcher (Angulo and Fulcher, 1998) The results of the allergic group were as follows: The percentage of the blast cells after 3 days of stimulus was  $3.34 \pm 0.46\%$ , after 5 days was  $6 \pm 1.36\%$  and at seven days of stimulus the percentage of blasts cells was  $15.5 \pm 1.36\%$ . The optimal allergen concentration was determined in a dose response manner and analysed with percentage of blasts and Division Index as shown in figure 1. Choosing 20  $\mu\text{g/ml}$  of allergen as the optimal dose for further cell cultures.

Percentage of blast cells has a direct positive correlation (correlation coefficient =0.98,  $p=0.01$ ) with Division Index, which allowed to make analysis on blasts gate taking for granted that proliferating cells were analysed. The control group showed no change either in the blast percentage or Division Index, at any time and dose, which means that stimulus was allergen specific.

## CD30 Expression

To determine the optimal time which CD30 was expressed on CD4+ blast cells, blast cells were harvested at different time points and labelled with mouse anti human CD30-RPE and mouse anti human CD4-FITC and analysed in the blast cell gate. We found that 90% of CD30 cells are CD4+ cells after allergenic stimulation as well as we found that CD30 has a time dependent expression; during three days of stimulus  $1.1 \pm 0.31\%$  of expression, at day five  $8.2 \pm 0.8\%$  and at day 7 an expression of  $45.5 \pm 5.3\%$  on CD4+ blast cells culture with 20  $\mu\text{g/ml}$  of allergen (figure 2). The samples stimulated with Con A for 3 days, expressed on the allergic group  $9.68 \pm 1.11\%$ , whereas the samples of the control group stimulated with Con A expressed  $35.5 \pm 7.6\%$ . The stimulation with Con A showed a similar blasts

production between groups, however there was a lower expression of CD30 in activated cells on the allergic group, which means that the CD30 expression in the allergic group is allergen specific.

To determine if IL4 stimulated CD30 expression on CD4+ blasts, cells were incubated with or without allergen and with or without anti-CD124 at different time points at a concentration of 50 ng/ml (recommended by the manufacturer). We found a reduction around 30% (Figure 2) on CD30 expression on CD4+ blast cells as well as a reduction (9%) in the percentage of total blasts, which means that CD30 expression is dependent on IL4 and the necessity of IL4 in the production of blast cells.

#### Determination of apoptotic cells.

Blast cells were analysed taking into account Annexin-V/ IP staining features (IP negative Annexin-V positive) to calculate the Apoptotic Index (figure 3A and 3B). The allergic group showed an AI =  $0.12 \pm 0.03$ , whereas the control group showed an increase in the apoptotic index with  $0.58 \pm 0.13$  as shown in Figure 3C. After co-culture with anti-CD124 there was an increase in the AI in the allergic group similarly as seen in the control group (AI>0.50) (Data not shown). To identify the AnnexinV features on CD30+ cells, a gate of blast cells was analysed and we were able to distinguish that in the allergic group CD30 positive cells were AnnexinV negative as shown in Figure 3D; whereas in the control group it was hard to make an analysis because of the small number of CD30+ cells. Which means CD30+ cells were not expressing PS on their membrane as observed in apoptotic cells.

To evaluate the membrane integrity of CD4+CD30+ blasts, cells were incubated for 20 min at 4°C in the dark with 7-AAD after CD4-FITC and CD30RPE staining, and acquired in FACScalibur™. When cell membrane is permeable it becomes permissive to the 7-amino actinomycin D (7-AAD) which stains the nucleus of both early and late apoptotic cells. The analysis was made on blast cell gate. 7AAD negative, large lymphocytes were considered non apoptotic blast cells. After seven days of allergenic stimulus, blasts were generated only in the allergic group, and after cell surface labelling 7AAD was incubated in the cell samples to analyse the



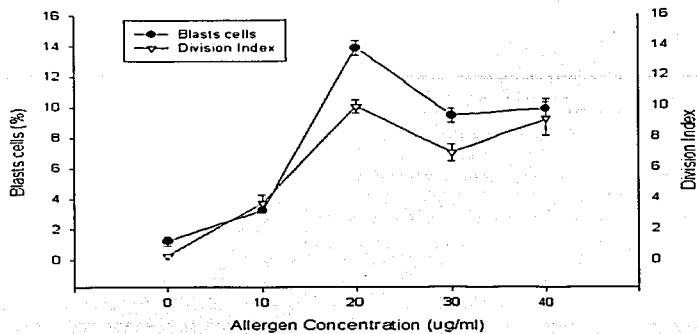


Figure 1. PBMC of atopics were stimulated with different concentrations of allergen, for 7 days, showing percentage of blast cells (circles) compared with the Division Index (inverted triangles).

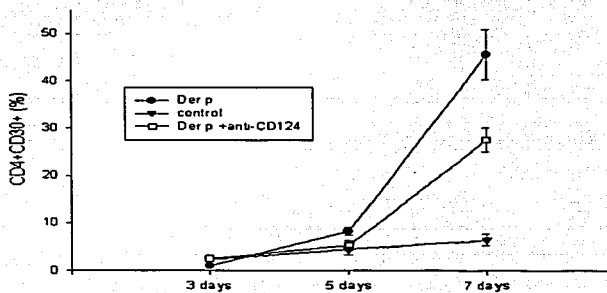
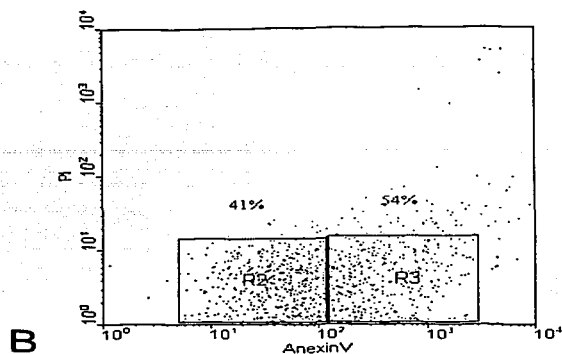
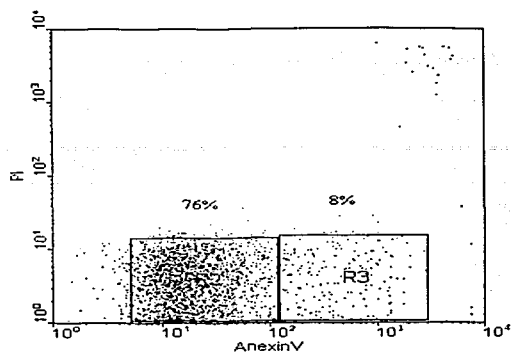
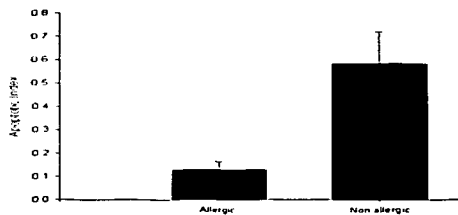


Figure 2. Expression of CD30+ on CD4+ blast cells. PBMC were stimulated with allergen (circles), or without stimulus (triangles) and with allergen and anti-CD124 (squares) at different time.



A



C

D

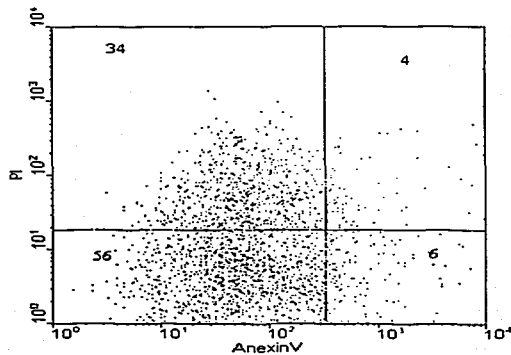


Figure 3. Representative dot plot comparing AnnexinV-FITC vs PI on blast cells gate of an allergic, after 7 days of allergen stimulation (A). Representative dot plot comparing AnnexinV-FITC vs IP on blast cells gate of a control non-allergic subject, after 7 days of allergen stimulation (B). A chart compaing between allergic (left) vs non allergic (right) subjects (C). A dot plot of blast cells of an allergic patient, after 7 days of allergen stimulation, the cells were stained with Annexin V-FITC and CD30 PE (D).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

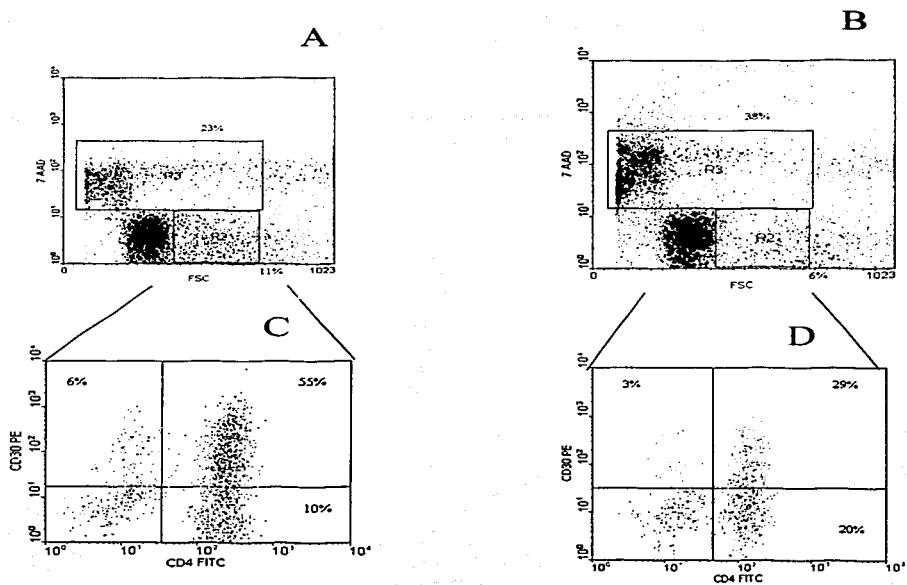


Figure 4.. A) Dot plot of PBMC stimulated 7 days with *Der p* (A), and with allergen plus anti-CD124 (B) analysed by Forward Scatter and 7-AminoActinomycin-D. Dot plots of the blast cells gated region comparing CD4 vs CD30. Cells stimulated 7 days with allergen (C) and cells stimulated with allergen plus anti-CD124 (D).

permeability of the cell membrane. The blasts CD4+CD30+ showed to be 7AAD negative, which means CD4+ blasts expressing CD30+ are not apoptotic. To know if the function of CD124 changed the non-apoptotic condition of CD4+CD30+ blasts, 50 ng/ml of anti-CD124 antibody were co-cultured with Der p and there was a decrease in CD30+ expression on CD4+ blasts. Analysing 7AAD cells we observed an increased of apoptotic cells when compared with the cells incubated with Der p in absence of anti-CD124 antibody but with Der p which indicates IL4 protects cells from passive apoptosis (Figure 4A and 4B).

Intracellular cytokines. After inhibiting cytokine transport with Brefeldin A, and after cell surface staining, cell samples were incubated with mouse FITC- or PE-conjugated moAb against human intracellular cytokines. The percentage of blast CD4+CD30+ cells producing IL4 had its maximum expression at day five ( $20.5 \pm 3.5\%$ ) as well as, the CD4+CD30+ cells producing IFN with a maximum expression at day five ( $25.95 \pm 10.07\%$ ) Whereas the percentage of CD4+CD30+ blast cells producing IL5 had its maximum production at day seven with  $45.5 \pm 5.3\%$ . (Figure 5).

#### Discussion.

It has been proposed CD30 as a Th2 marker in allergic disorders, and it has been associated to activation states, however its role in atopic diseases is not fully understood. There are controversial studies on the role of CD30 in several models. On allergic diseases has been proposed as a Th2 marker, however here we identified CD30 as a marker for non-apoptotic CD4+ allergen specific blasts. In this study there is evidence indicating CD30 is a Th2 marker related to IL-5, because and increase on IL-5 on a day 7 which is the day CD30 reaches its plateau, however, there is no direct association with IL-4, nor with IFN. We found CD4+ blast cells producing IL5 after specific allergen stimulation as reported by Till and Cols. (Till *et al.*, 1997). This confirms the prominent role of this cytokine in the patogenesis allergic inflammation. CD30 is a member of the TNFR family

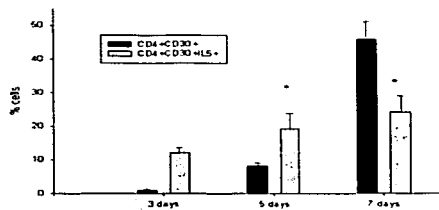
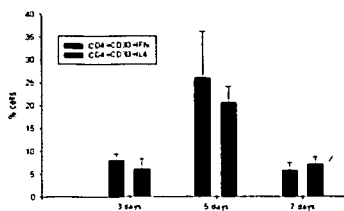


Figure 5. A) Cytokine expression of CD4+CD30+ determined on blasts, IFNgamma (dark bars) IL4, (light bars). Cells of allergic patients stimulated with allergen at different time points. Results expressed are the mean  $\pm$  SEM. B) Comparison between CD4+CD30+ (dark bars) and CD4+CD30+IL5+ (light bars) cells after allergen stimulation of cells of allergic patients. Results expressed are the mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$

(Armitage, 1994) in its cytoplasmic tail has a domain which allows TRAF proteins dimerization and TRAF proteins have been implicated in activation of NF $\kappa$ B (Wajat *et al.*, 1999), in absence of CD30-mediated degradation of TRAF-2, TNF or other related molecules preferentially drive cell proliferation rather than apoptosis (Kurts *et al.*, 1999). CD30 could mediate proliferation process rather than apoptosis because CD30 is present in CFSE negative cells, which means that CD30 is expressed on proliferating cells. In this work CD30 would mark non apoptotic cells since we identified CD30 is negative for AnnexinV, indicating that PS molecules are not been expressed in the cell membrane of CD4+CD30+ cells; moreover CD4+CD30+ blast cells are negative for 7AAD, which also supports the possibility that CD30, in this model, participates regulating cell proliferation, rather than apoptosis. Repeated antigen exposure may deplete Th1-polarized effectors leading to Th2 predominance (Zhang X *et al.*, 1997), which could explain the unbalance towards Th2 observed in allergic diseases and their characteristic Th2 inflammatory lesions. Allergic diseases are associated with reduced apoptosis of inflammatory cells, apoptosis signals in atopy and asthma measured with cDNA arrays showed a concerted up-regulation of several pro-survival cytokines and growth factors (Brutsche *et al.*, 2001). Immunotherapy did not change the profile of cytokine production by T cells, while induced the elimination of Th2 encouraging the preponderance of Th1 (Guerra *et al.*, 2001). IL-4 induces the expression of CD30 on activated T cells (Gilfillan *et al.*, 1998) and using a blocking antibody against CD124 (Bullens *et al.*, 1998) showed its utility in an *in vitro* model inhibiting IL4 function; in this study, adding a similar blocking CD124 antibody to the culture, the expression of CD30 on CD4+ blast cells and cell proliferation were reduced whereas apoptosis was increased, these results suggest that IL-4 contributes for CD30 expression on CD4+ blasts on an *in vitro* atopic model, also IL-4 can promote surviving on these cells rather than apoptosis. The reduction of CD30 expression was only the half, this could be due to not only that IL4 mediates CD30 expression but also co-stimulatory signal through CD28 mediates CD30 expression. CD30 can promote proliferation in this system because it can act as a positive regulator of activated T cell function. (Gilfillan *et al.*, 1998)

Our results indicate that CD30 seems to be able to identify a cellular population which seems to be protected from passive apoptosis through IL4.

## References

1. Angulo, R., Fulcher, D.A. Measurement of Candida-Specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 1998; 34: 143-151.
2. Armitage, R.J. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 407-413
3. Bengtsson, A., Lundberg, M., Avila-Cariño, J., Jacobsson, G., Holmgren, A., Scheynius, A. Thiols decrease cytokine levels and down-regulate the expression of CD30 on human allergen-specific T helper (Th) 0 and Th2 cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 350-360.
4. Blanco-Quirós, A., Arranz, E., Hoyos, C., Gómez-Carrasco, J., Andion, R. Different serum interleukin-12 and sCD30 levels in food- and pollen-sensitized children. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10: 235-240.
5. Brutsche, M.H., Brutsche, I.C., Wood, P., Brass, A., Morrison, N., Rattay, M., Mogulkoc, N., Simler, N., Craven, M., Custovic, A., Egan, J.J., Woodcock, A. Apoptosis signals in atopy and asthma measured with cDNA arrays. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 181-187.
6. Bullens, D., Kasran, A., Peng, X., Lorré, K., Ceuppens, J.L. Effects of anti-IL4 receptor monoclonal antibody on *in vitro* T cell cytokine levels: IL-4 production by T cells from non-atopic donors. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 320-326.
7. Caproni, M., Bianchi, B., D'Elíos, M., De Carli, M., Amedi, A., Fabri, P. *In vivo* relevance of CD30 in atopic dermatitis. *Allergy* 1997; 52: 1063-1070.
8. Cavagni, G., Caffarelli, C., Facchetti, E. Cutaneous CD30+ cells in children with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 224-228.

9. Cormican, L., O'Sullivan, S., Burke, S.M., Poluter, W. IFN $\gamma$  but not IL-4 T cells of the asthmatic bronchial wall show increased incidence of apoptosis. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 731-739.
10. Del Prete, G., De Carli, M., D'Elcios, M.M., Daniel, K.C., Almerigogna, F., Anderson, M., Smith, C.A., Thomas, E., Romagnani, S. CD30-mediated signaling promotes the development of human T-helper type 2-like T cells. *J Exp Med* 1995; 182: 1655-1661.
11. Duckett, C., Thompson, C. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes and Development* 1997; 11: 2810-2821.
12. Dummer, W., Brocker, E.B., Bastian, B.C. Elevated serum levels of soluble CD30 are associated with atopic dermatitis but not with respiratory atopic disorders and allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 1997; 137: 185-187.
13. Dummer, W., Rose, C., Bröcker, E. Expression of CD30 on T Helper cells in the inflammatory infiltrate of acute atopic dermatitis but not of allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 598-602.
14. Esnault, S., Benbernou, N., Lavaud, F., Guenounou, M. Spontaneous CD30 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from atopic patients with high IgE serum levels. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 67-72.
15. Folster-Holst, R., Henseler, T., Wehde, J., Lemke, H., Weichenthal, M., Christophers, E., Hansen, H.P. Soluble CD30 plasma concentrations correlate with disease activity in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2002; 82: 245-248.
16. Gilfillan, M.C., Noel P.J., Podack, E.R., Reiner, S.L., Thompson, C.B. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 1998; 160: 2180-2187.
17. Guerra, F., Carracedo, J., Solana-Lara, R., Guijo-Sánchez, P., Ramírez, R. Th2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy and Clin Immunol* 2001; 107: 647-653.



18. Harlin, H., Podack, E., Boothby, M., Alegre M. TCR-independent CD30 signaling selectively induces IL-13 production via a TNF receptor-associated factor/p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 169: 2451-2460.
19. Jayaraman, S., Castro, M., O'Sullivan, M., Bragdon, M.J., Holtzman, M.J. Resistance to Fas-mediated T cell apoptosis in asthma. *J Immunol* 1999; 162: 1717-1722.
20. Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., Takaku, F. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 1989; 140: 323-334.
21. Kurts, C., Carbone, F., Krummel, M., Koch, K., Miller, J., Heath, W. Signalling through CD30 protects against autoimmune diabetes mediated by CD8 T cells. *Nature* 1999; 398: 341-344.
22. Lecoq, H., Ledru, E., Gougeon, M.L. A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. *J Immunol Methods* 1998; 217: 11-26.
23. Leonard, C., Tormey, V., Burke, C., Poulter, L. Allergen induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 268-275.
24. Mir, S., Richter, B., Duckett, C. Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood* 2000; 96: 4307-4312.
25. Schneider, C., Hubinger, C. Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 1355-1366.
26. Seah, G., Rook, G., IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 2000; 167: 1230-1237.
27. Spinozzi, F., Agea, E., Bistoni, O., Forenza, N., Monaco, A., Falini, B., Bassoti, G., De Benedictis, F., Grignani, F., Bertotto, A. Local Expansion of

- allergen-specific CD30+ Th2-type  $\square\square$  T cells in bronchial asthma. *Mol Med* 1995; 1: 821-826.
28. Suzuki, H., Goto, S., Ikeda, K., Oshima, T., Furukawa, M., Takasaka, T. IL-12 receptor  $\square 2$  and CD30 expression in paranasal sinus mucosa of patients with chronic sinusitis. *Eur Respir J* 1999; 13: 1008-1013.
29. Till, S., Dickason, R., Huston, D., Humbert, M., Robinson, D., Larche, M., Durham, S., Kay, A.B. Corrigan, C. IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4+ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 563-569.
30. Wajant, H., Grell, M. and Scheurich. TNF receptor associated factors in cytokine signalling. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10:15.
31. Yamamoto, J., Adachi, Y., Onoue, Y., Kanegane, H. Miyawaki, T., Toyoda, M., Seki, T., Morohashi, M. CD30 expression on circulating memory CD4+ T cells as a Th2-dominated situation in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2000; 55: 1011-1018.
32. Zhang, X., Brunner, T., Carter, L., Dutton, R., Rogers, P., Bradley, L., Sato, T., Reed, J., Green, D., Swain, S. Unequal death in T helper cell (Th) 1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997; 185:1837-1849.

## DISCUSIÓN GENERAL.

Se ha propuesto que en las enfermedades alérgicas hay un desequilibrio de la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th2, que se refleja como hipersensibilidad tipo I. También se ha identificado que las células presentadoras de antígeno (CPA) desempeñan una función importante en este desequilibrio. En las enfermedades alérgicas, se ha encontrado que los linfocitos CD4+ de circulación sanguínea y de tejido, se encuentran en un estado de activación presentando marcadores como CD25 o CD30 (Bengtsson, 2001; Hamid *et al.*, 1992) y con un perfil de citocinas Th2 (Lee *et al.*, 2001). En el asma alérgico se ha descrito que existe una sobreactivación de los linfocitos CD4+ en sangre periférica y en vías aéreas (Corrigan y Kay, 1990; Robinson *et al.*, 1992; Walker, 1992).

Por otra parte, la sobreactivación celular conlleva a la expresión de estructuras sacarídicas relacionadas con procesos de inflamación, que se observan en las lesiones provocadas por alergia (Varki *et al.*, 1999). Las modificaciones en la glicosilación se han identificado usando lectinas (Lis y Sharon, 1986) y anticuerpos (Galván *et al.*, 1998).

En este trabajo utilizamos la lectina de la semilla de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) para reconocer una subpoblación celular de linfocitos CD4+ en enfermedades alérgicas. Esta lectina es capaz de reconocer una pequeña subpoblación de linfocitos CD4+ de sangre periférica de individuos sanos (Lascurain *et al.*, 1997) y que esta subpoblación expresa transcritos para IL-4 e IL-10 (Chávez, 1999). En modelo animal, la población de linfocitos TCD4+ aumenta 48 h después de la activación policlonal (Ortiz *et al.*, 2002). Por lo tanto, esta lectina fue útil para analizar linfocitos TCD4+ de pacientes con enfermedad atópica: En pacientes con asma y rinitis alérgicos el análisis de linfocitos activados *in vitro* con el activador policlonal PMA, mostró que la población de linfocitos CD4+ reconocidos por ALL fue mayor que la de individuos no alérgicos. Mediante la determinación de citocinas intracelulares en la población linfocitos CD4+ se encontró una correlación de la expresión de la estructura sacarídica reconocida por ALL y el perfil Th2 obtenido por el índice IL-4/IFN $\gamma$ . Los datos indican que el

actividad en la dermatitis atópica (Kato *et al.*, 2000), y que el CD30 se encuentra en células con un perfil de citocinas tipo Th2 (Bengtsson, 2001). La correlación positiva que encontramos entre los porcentajes de células CD4+CD30+ y los de células CD4+ALL+, sugiere activación celular. Así mismo la disminución del CD62L es indicativo de activación celular (Lees *et al.*, 2001). CD62L es una glicoproteína que presenta diferente tamaño molecular de acuerdo al tipo de leucocito en el que se encuentre. CD62L es escindida de la superficie celular cuando los leucocitos se activan y esta escisión de 283 o 284 aminoácidos se lleva a cabo mediante un proceso proteolítico adyacente a la porción externa de la membrana celular por una metaloproteínasa (Kansas, 1996; Lasky *et al.*, 1989; Siegelman *et al.*, 1989; Stoolman, 1989). De manera interesante el mayor porcentaje de linfocitos CD4+ALL+ fue identificado en los pacientes con dermatitis atópica en relación con los otros padecimientos. No obstante que dermatitis atópica y la dermatitis de contacto son padecimientos confinados a la piel, en la dermatitis de contacto la población CD4+ALL+ está disminuida. Hay que recordar que la dermatitis de contacto es un padecimiento considerado como hipersensibilidad tipo IV con un predominio de la respuesta Th1 en su patogenia. Los datos sugieren que la expresión de la estructura sacarídica reconocida por ALL en linfocitos CD4+ está en relación con la respuesta Th2. También se exploraron otros marcadores de activación relacionados con la actividad de células tipo Th2, analizando la expresión de estas moléculas en los linfocitos CD4+ y moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno procedentes de sangre periférica de pacientes con diferentes procesos alérgicos, tanto en estados de actividad como en estados no activos. Nuestros resultados mostraron que el porcentaje de los linfocitos CD4+CD30+, CD4+CD124+ y CD4+CD152+ de pacientes con dermatitis atópica (DA), estuvo elevado en comparación con el grupo de pacientes con dermatitis de contacto así como en los otros procesos alérgicos. Con respecto a las moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígeno, observamos que la expresión de CD80 en linfocitos B y fue mayor en la rinitis activa y en el asma moderado, lo que sugiere que tienen participación en el mecanismo de alergia confinado a la mucosas de las vías

estado de activación de alergia condiciona a un mayor número de linfocitos que expresan este marcador sacarídico, sugiriendo la expresión de O-glicosiltransferasas. Piller *et al.* encontraron que existe una mayor actividad de glicosiltransferasas en linfocitos activados en comparación con los linfocitos en reposo (Piller *et al.*, 1988). Otros autores demostraron mayor actividad de la glicosiltransferasa ST3Gal1 en linfocitos Th2 (Grabie, 2002); estos datos concuerdan con nuestros resultados. Con respecto a la activación celular existen evidencias que demuestran que los linfocitos de sangre periférica de pacientes alérgicos, se encuentran activados y cuando se realizan ensayos *in vitro* la activación es mayor en los linfocitos de individuos alérgicos en comparación con los no alérgicos (Corrigan, *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1992; Walker, 1992; Gemou-Engesaeth *et al.*, 2002). La expresión de la molécula reconocida por ALL en los linfocitos de los pacientes alérgicos podría ser consecuencia de la activación celular observada en el proceso alérgico. Cabe mencionar que los linfocitos de estos pacientes ya se encuentran con una polarización hacia Th2. Sin embargo, esta polarización no es consecuencia de la estimulación con PMA, ya que no se presenta en los linfocitos CD4+ de los individuos no atópicos.

En el estudio comparativo de la actividad de las diferentes manifestaciones de la enfermedad alérgica, se identificaron diferencias en la expresión de la molécula reconocida por ALL y marcadores de activación celular (CD30 y CD62L). Hubo un incremento en la subpoblación de linfocitos CD4+ reconocidos por ALL en los pacientes con actividad del padecimiento alérgico. Los linfocitos CD4+CD62L+ de los pacientes en estado activo de la enfermedad disminuyeron, con respecto a los individuos con el padecimiento no activo. También hubo una correlación positiva entre los linfocitos CD4+ALL+ y linfocitos CD4+CD30+ y en contraparte encontramos una correlación negativa con los linfocitos CD4+ALL+ y linfocitos CD4+CD62L+, en todos los padecimientos alérgicos. Diversos estudios han relacionado los marcadores de activación celular con los estados de agudos en la alergia, donde se ha encontrado que el CD30 y su fracción soluble (sCD30) correlacionan con el estado de activación de la enfermedad y los niveles séricos de IgE (Esnault *et al.*, 1996). Se ha sugerido que el sCD30 es un marcador de

aéreas. Observamos que la población CD4+CD124+ se encuentra elevada en los pacientes con dermatitis atópica. El CD124 es la cadena alfa del receptor de IL4 (Izuhara, *et al*, 2000) y la IL-4 es una citocina característica de la respuesta Th2. El CD152 (CTLA-4), es una molécula que se encuentra en linfocitos en estado de activación, nuestros datos mostraron que el porcentaje de linfocitos CD4+CD152+ está elevado en la dermatitis atópica, sugiriendo el estado de activación celular existente en este padecimiento alérgico. Para el estudio de las enfermedades alérgicas se deberá tomar en cuenta, el órgano de choque, pues nosotros observamos que el mecanismo de la enfermedad alérgica confinada a la piel es diferente al mecanismo de la confinada a la mucosa respiratoria.

Con respecto a la presencia de CD30 en los procesos alérgicos se analizó su posible función. El CD30 es una molécula de activación celular, que pertenece a la familia de los receptores del TNF (TNFR), su expresión está relacionada principalmente a células B y T activadas aunque también se ha identificado su expresión en células tumorales. Su identificación inicial fue en las células Reed-Stenberg que se expresan en la enfermedad de Hodking. Estructuralmente es una molécula de 120 kDa, que puede regular procesos tanto de muerte celular o promover la proliferación celular (Ellis *et al.*, 1993; Froese *et al.*, 1987; Latza *et al.*, 1995). El porcentaje de las células CD4+CD30+ se encuentra elevado en los procesos atópicos (Bengtsson, 2001), sin embargo todavía no se ha asociado la presencia de este marcador con alguna función en las enfermedades alérgicas. En el presente trabajo, observamos que el CD30 se expresa en los linfoblastos CD4+ alérgico-específicos que no están en apoptosis; así que este marcador está relacionado con procesos de activación celular, quizá funcionando como una molécula coestimuladora e incluso promoviendo la proliferación (Gilfillan *et al.*, 1998). Además el CD30 se ha asociado también con la actividad del padecimiento alérgico (Bengtsson, 2001). De acuerdo con estos resultados se ha seleccionado a la subpoblación CD4+CD30+ como referencia para comparar los resultados encontrados con ALL, por lo que el modelo de estimulación antígeno-específica ante el *Dermatophagoides pteronyssinus* que se realizó en este trabajo, se permitirá observar el comportamiento de la subpoblación celular CD4+ reconocida

por ALL en el modelo de atopia *in vitro* y así comprender más acerca de su posible función en el fenómeno atópico.

Finalmente, los linfocitos CD4+ reconocidos, se encuentran desempeñando una papel en la activación celular en el fenómeno alérgico, debido a su asociación con otras moléculas de activación celular y el perfil de citocinas en el microambiente. Las posibles funciones de la estructura sacarídica reconocida por ALL son: conferir la protección a proteasas, facilitar la comunicación entre células o favorecer la adherencia celular (Kobata, 1992; Rasmussen, 1992; Zanetta *et al.*, 1992; Lis y Sharon, 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **PERSPECTIVAS**

Para analizar la participación de la subpoblación CD4+ALL+ ante un estímulo alérgeno-específico:

1. Se realizarán ensayos de estimulación in vitro y se analizará el cambio en el porcentaje de las células CD4+ALL+.
2. Se analizará la cinética de expresión y su asociación con citocinas en sobrenadante.
3. Se analizará esta subpoblación con respecto a indicadores de proliferación celular y apoptosis, para saber si se trata de una población reguladora o activadora del fenómeno alérgico.
4. Se realizarán ensayos de captura de citocinas (IL4 e IFN $\gamma$ ) para estudiar la posible función de estas citocinas en el aumento o disminución de los linfocitos reconocidos por ALL+.

Para estudiar acerca de la molécula reconocida por ALL:

1. Se identificará la estructura proteica O-glicosilada en los diferentes procesos de activación celular.
2. Se realizarán ensayos de activación mediante ALL, para definir si esta molécula está directamente involucrada en los fenómenos de activación celular.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Angulo, R., Fulcher, D.A. Measurement of Candida-Specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 1998; 34: 143-151.
2. Alvarez, G., Lascurain, R., Perez, A., Degand, P., Montano, L.F., Martínez-Cairo S., Zenteno, E. Relevance of sialoglyconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol Invest* 1999; 28: 9-18.
3. Alvarez, G. Identificación de estructuras glicosiladas expresadas durante la regulación de la apoptosis en la ontogenia del linfocito T. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 2001.
4. ATS. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:225-244.
5. Azuma, Y., Sakanashi, M., Matsumoto, K. The effect of  $\alpha$ 2,6 -linked sialic acid on anti-IgM antibody-induced apoptosis in Ramos cells. *Glycoconjugate J* 2001; 18: 419-424.
6. Bengtsson, A. The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* 2001; 56: 593-603.
7. Cister, J.G., Goodnow, C.C. Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues from antigens and the microenvironment. *Immunity* 1992; 6: 509-517.
8. Codrington, J.F. and Haavik, S. Epiglycanin-A carcinoma-specific mucin-type glycoprotein of the mouse TA3 tumor. *Glycobiology* 1992; 2: 173-180.

9. Corrigan, C.J. Kay, A.B. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma: relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 970-977.
10. Coyne, K.E., Hall, S.E., Thompson, S., Arce, M.A., Kinoshita, T., Fujita, T., Anstee, D.J., Rosse, W., Lublin, D.M. Mapping of epitopes, glycosylation sites, and complement regulatory domains in human accelerating factor. *J Immunol* 1992; 149: 2906-2913.
11. Chapman, B.S., Eckart, M.R., Kaufman, S.E., Lapointe, G.R. O-linked oligosaccharide on the 75-kDa neurotrophin receptor. *J Neurochem* 1996; 66: 1707-1716.
12. Chávez, R. Purificación de una subpoblación de linfocitos tipo Th2, empleando la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 1999.
13. Daughaday, W.H., Trivedi, B., Baxter, R.C. Serum "big insulin-like growth factor II" from patients with tumor hypoglycemia lacks normal E-domain O-linked glycosylation, a posible determinant of normal propeptide processing. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90: 5823-5827.
14. De Dios, I., Manso, M., León, V., López-Borrasca, A. Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particules. *Biochem Med Metab Biol* 1986; 35: 12-17.
15. Drickamer, K. Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* 1991; 67: 1029-1032.
16. Druilhe, A., Wallaert, B., Tsiopoulos, A., Lapa e Silva, J.R., Tillie-Leblond, I., Tonnel, A.B., Pretolani, M. Apoptosis proliferation, and expression of Bcl-2, FAS, and FAS ligand in bronchial biopsies from asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 747-757.
17. Esnault, S., Benbernou, N., Lavaud, F., Guenounou, M. Spontaneous CD30 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from atopic patients with high IgE serum levels. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 67-72.

18. Ellis, T.M., Simms, P.E., Slivnick, D.J. CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. *J Immunol* 1993; 151: 2380-2389.
19. Froesse, P., Lemke, H., Gerdes, J. Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus-transformed human B and T lymphoid cell lines. *J Immunol* 1987; 139: 2081-2087.
20. Galvan, M., Murali-Krihsna, K., Ming, L.L., Baum, L., Ahmed, R. Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+T cells from naive cells. *J Immunol* 1998; 161: 641-648.
21. Garfias, Y., Rojas-Ramos, E., Lascurain, R., Chávez, R., Hernández, J., Zenteno, E. Avances recientes la inmunopatología de las enfermedades atópicas. *Rev Alerg Mex* 2001; 48: 68-74.
22. Gemou-Engesaeth, V., Fagerhol, M.K., Toda, M., Hamid, Q., Halvorsen, S., Groegaard, J.B., Corrigan, C.J. Expression of activation markers and cytokine mRNA by peripheral blood CD4 and CD8 T cells in atopic and nonatopic childhood asthma: effect of inhaled glucocorticoid therapy. *Pediatrics* 2002; 109: E24.
23. Gilfillan, M.C., Noel P.J., Podack, E.R., Reiner, S.L., Thompson, C.B. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 1998; 160: 2180-2187.
24. Gorocica, P., Lascurain, R., Hernández, P., Porras, F., Bouquelet, S., Vázquez, L., Zenteno, E. Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. *Glycoconj J* 1998; 15: 809-814.
25. Grabie, N., Delfs, M.W., Lim, Y.C., Westrich, J.R., Luscinikas, F.W., Lichtman, A.H. Beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase-I gene expresión during Th2 but not Th1 differentiation: implications for core2-glycan formation on cell surface proteins. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2766-2772.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

26. Hajjar, K.A. and Reynolds, C.M. Alpha-fucose mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells. *J Clin Invest* 1994; 93:703-710.
27. Hamid, Q., Barkans, J., Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B. Co-expression of CD25 and CD3 in atopic allergy and asthma. *Immunology* 1992; 75: 659-663.
28. Hamid, Q., Nasser, T., Minshall, E., Long, Y.L., Boguniewicz, M., Leung, D.Y. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 225-231.
29. Hernández, J., Garfias, Y., Reyco-Leyva, J., Chávez, R., Lascrain, R., Zenteno, E. Peanut agglutinin (PNA) and *Amaranthus leucocarpus* (ALL) lectins discriminate between memory and naive porcine lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 84: 71-82.
30. Holgate, S.T., Curch, M.K., Lichtenstein, L.M. *Allergy*. 2<sup>a</sup> ed. Londres: Mosby, 2001.
31. Hooper, L.V., Manzella, S.M., Baenzinger, J.U. From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *FASEB J* 1996; 10: 1137-1146.
32. Jin, L., McLean, P.A., Neel B.G., Wortis, H.H. Sialic acid binding domains of CD22 are required for negative regulation of B cell receptor signaling. *J Exp Med* 2002; 195:119-1205
33. Kansas, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-3287.
34. Katoh, N., Hirano, S., Suehiro, M., Ikenaga, K., Yamashita, T., Sugawara, N., Yasuno, H. Soluble CD30 is more relevant to disease activity of atopic dermatitis than soluble CD26. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 187-192.
35. Kelso, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995; 16: 374-379.
36. Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., Takaku, F. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 1989; 140: 323-334.

37. Kobata, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. Eur J Biochem 1992; 209: 483-501.
38. Kodama, S., Tsujimoto, M., Tsuruoka, N., Sugo, T., Endo, T., Kobata, A. Role of sugar chains in the in-vitro activity of recombinant human interleukin 5. Eur J Biochem 1993; 211: 903-908.
39. Kramerov, A.A., Arbatsky, N.P., Rozovsky, Y.M., Mikhaleva, E.A., Polesskaya, O.O., Gvozdev, V.A., Shibaev, V.N. Mucin-type glycoprotein from *Drosophila melanogaster* embryonic cells: characterization of carbohydrate component. FEBS Lett 1996; 378: 213-218.
40. Lascurain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaña, L.F. Zenteno, E. Recognition of CD4+ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. Immunology 1994; 83: 410-413.
41. Lascurain R., Porrás, F., Baez, R., Chávez, R., Martínez-Cairo, S., Alvarez, G., Zenteno, E. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. Immunol Invest 1997; 26: 579-587.
42. Lasky, L.A., Singer, M.S., Yednock, T.A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodríguez, H., Nguyen, T., Stachel, S., Rosen, S.D. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. Cell 1989; 56: 1045-1055.
43. Latza, U., Foss, A.D., Dürkop, H. CD30 antigen in embryonal carcinoma and embryogenesis and release of the soluble molecule. Am J Pathol 1995; 146: 463-471.
44. Lee, S.Y., Kim, S.J., Kwon, S.S., Kim, Y.K., Kim, K.H., Moon, H.S., Song, J.s., Park, S.H. Distribution and cytokine production of CD4 and CD8 T-Lymphocyte subsets in patients with acute asthma attacks. Ann Allergy Asthma Immunol 2001; 86: 659-664.
45. Lees, R. K., Ferrero, I., MacDonald, H. R. Tissue-specific segregation of TCR gamma delta+ NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status: parallels with TCR alpha beta+ NKT cells. Eur J. Immunol 2001; 31: 2901-2909.

46. Lis, H., Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 35-67.
47. Lis, H., Sharon, N. Protein glycosylation - structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 1993; 218: 1-27.
48. Lis, H., Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev* 1998; 98: 637-674.
49. Lowe, B.J. Glycosylation, Immunity and Autoimmunity. *Cell* 2001; 104: 809-812.
50. Maldonado, G., Gorocica, P., Agundis, C., Pérez, A., Molina, J., Zenteno, E. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconj* 1998; 15: 615-622.
51. Marchalonis, J.J. Lectins in the isolation of receptors on lymphocytes. *Methods Enzymol* 1987; 150: 463-477.
52. Matzuk, M.M., Keene, J.L., Boime, I. Site specificity of the chronic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J Biol Chem* 1989; 264: 2409-2414.
53. Metha, A., Zitzmann, N., Rudd, P.M., Block, T.M., Dweck, R.A. A glucosidase inhibitors as a potential broad based anti-viral agents. *FEBS Lett* 1998; 430: 17-22.
54. Mossman, T.R., Cherwinski, H.M., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I: Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136 : 1348-1357.
55. Muraille, E., Leo, O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 1998; 47: 1-9.
56. Nemansky, M., de Leeuw, R., Wijnands, R.A., Van den Eijnden. Enzymic remodelling of the N- and O- linked carbohydrate chains of human chorionic gonadotropin. Effects on biological activity and receptor binding. *Eur J Biochem* 1995; 227: 880-888.
57. Ortiz, B., Porras, F., Jiménez-Martínez, M.C., Montaña, L.F., Martínez-Cairo, S., Lascurain, R., Zenteno, E. Differential expression of a 70 kDa O-

68. Rosen, S. Cell surface lectins in the immune system. *Sem Immunol* 1993; 5: 237-247.
69. Roth, J. Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochem Biophys Acta* 1987; 906: 405-436.
70. Rudd, P.W., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Huang, M., Mattsson, N., Spier, J.A., DiGennaro, J.A., Fetrow, J.S., Dwek, R.A., Wilson, I.A. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* 1999; 293: 351-366.
71. Sagara, H., Okada, T., Okumura, K., Ogawa, H., Ra, C., Fukuda, T., Nakao, A. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 249-254.
72. Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S., Conklin, E. *Avidin-Biotin Chemistry: A handbook*. 1<sup>st</sup> ed. Rockford Illinois, USA: Pierce Chemical Company, 1992.
73. Schachter, H. The clinical relevance of glycobiology. *J Clin Invest* 2001; 108: 1579-1582.
74. Siegelman, M.H., van de Rijn, M., Weissman, I.L. Mouse lymph node home receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science* 1989; 243: 1165-1172.
75. Sinha, D., Mandal, C., Bhattacharya, D.K. Identification of 9-O acetyl sialoglycoconjugates (9-OacSGs) as biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia using a lectin, AchatininH, as a probe. *Leukemia* 1999; 13: 119-125.
76. Spinozzi, F., Fizzotti, M., Agea, E., Piattoni, S., Droetto, S., Russano, A., Forenza, N., Grignani, F., Bertotto, A. Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary T cells from patients with asthma. *Ann Intern Med* 1998; 128: 363-369.
77. Spiro, R.G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002; 12: 43R-56R.

78. Stamper, H.B., and Woodruff, J.J. an in vitro model of lymphocyte homing. I. Characterization of the interaction between thoracic duct lymphocytes and specialized high-endothelial venules of lymph nodes. *J Immunol* 1997; 119: 772-780.
79. Stoolman, L.M. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989; 56: 907-910.
80. Takeuchi, M, Kobata, A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glicobiology* 1991; 1: 337-346.
81. The, T.H., Feltkamp, T.E.W. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. *Immunology* 1970; 18: 865-873.
82. Ugorski, M., Blackall, D.P., Pahlsson, P., Shakin-Eshleman, S.H., Moore, J., Spitalnik, S.L. Recombinant Miltenberger I and II human blood group antigens: the role of glycosylation in cell surface expression and antigenicity of glycophorin A. *Blood* 1993; 82: 1913-1920.
83. Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dweck, R.A., Opdenakker, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998; 33: 151-208.
84. Van den Steen, P.E., Rudd, P.M., Wormald, M.R., Dweck, R.A., Opdenakker, G. O-linked glycosylation in focus. *Trends Glycosci Glycotech* 2000; 12: 35-49.
85. Vargas, J. Lascuraín, R., Zenteno, E. Marcadores oligosacarídicos en linfocitos humanos asociados a la función celular. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
86. Varki A, Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Marth, J. *Essentials of Glycobiology*. 1ª ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
87. Walker, C., Bode, E., Boer, L., Hansel, T.T., Blaser, K., Virchow, J.C. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-Cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 109-15.



- glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cell Immunol* 2002; 218: 34-45.
58. Panka, D.J. Glycosylation is influential in murine IgG3 self-association. *Mol Immunol* 1997; 34 (8-9): 593-598.
59. Pieper, J., Ott, K.H., Meyer, B. Stabilization of the T1 fragment of glycophorin A (N) through interactions with N- and O- linked glycans. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 228-232.
60. Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., Fukuda, M. Human T-Lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 1988; 263: 15146-15150.
61. Porras, F., Lascurain, R., Chávez, R., Ortiz, B., Hernández, P., Debray, H., Zenteno, E. Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naïve thymocytes. *Glycobiology* 2000; 10: 459-465.
62. Powrie, F., Coffman, R.L. Cytokine regulation of T-cell function : potential for therapeutic intervention. *TIPS* 1993 ; 14 : 164-168.
63. Rasmussen, J.R., Effect of glycosylation on protein function. *Curr Opin Struct Biol.* 1992; 2: 682-686.
64. Reisner, Y., Linker-Israeli, M., Sharon, N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol* 1976a; 25: 129-135.
65. Reitter, J.N., Means, R.E., Desrosiers, R.C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nature Med* 1998; 4: 679-684.
66. Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Hernández, J., Zenteno, R., Vallejo, V., Hernández-Jáuregui, P., Zenteno, E. NeuAc $\alpha$ 2,3Gal-Glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *comp. Biochem Physiol* 1997; 118B: 327-332.
67. Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tscopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, R., Kay, A.B. Predominant Th2 like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326: 298-304.

88. Watkins, W.M. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group system. *Adv Human Gent* 1980; 10: 1-136.
89. Watkins, W.M. Biochemical genetics of blood group antigens: retrospect and prospect. *Biochem Soc Trans* 1987; 15: 620-624.
90. Zanetta, J.P. Kuchler, S., Lehmann, S., Badache, A., Maschke, S., Thomas, D., Dufourcq, P., Vincendon, G. Glycoproteins and lectins in cell adhesion and cell recognition processes. *Histochem J* 1992; 24: 791-804.
91. Zhang, X., Brunner, T., Carter, L., Dutton, R., Rogers, P., Bradley, L., Sato, T., Reed, J., Green, D., Swain, S. Unequal death in T helper cell (Th) 1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997; 185:1837-1849.
92. Zenteno, E., Ochoa, J.L. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry* 1988; 27: 313-317.
93. Zenteno, E., Lascurain, R., Montaña, L.F., Vázquez, L., Debray, H., Montreuil, J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J* 1992; 9: 204-208.