



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**FRECUENCIA Y PERFIL DE ACTIVACIÓN DE
LINFOCITOS T INVARIANTES ASOCIADOS
A MUCOSAS (MAIT) EN SANGRE PERIFÉRICA
DE PACIENTES ALÉRGICOS.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ANGÉLICA INIESTA SILVA



TUTOR: DR. EN C. MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO.

Ciudad Universitaria, CDMX., 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Profesor: **ENRIQUE ORTEGA SOTO.**

Vocal: Profesor: **MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO.**

Secretario: Profesor: **JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ.**

1er Suplente: Profesora: **ROSA CAMACHO SANDOVAL.**

2do Suplente: Profesor: **LUIS ÁNGEL FLORES MEJÍA.**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INMUNIDAD E INFLAMACIÓN (UIININ) DEL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO

SUSTENTANTE

ANGÉLICA INIESTA SILVA

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Inmunidad e Inflamación (UIININ) de la División de Investigación del Hospital Juárez de México.

El proyecto fue parcialmente financiado por el FOSISS SALUD-2012-182209, otorgado al Dr. Mario Adán Moreno Eutimio.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Epidemiología de asma.....	9
Epidemiología de asma en México.....	12
Definición de asma.....	12
Clasificación del asma.	14
Tipos de asma.	18
Fisiopatología.....	19
Inmunología del asma.....	20
Células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT)	22
Distribución de las células MAIT en los tejidos.	26
Fenotipo y funciones efectoras de las células MAIT.	27
Células MAIT y enfermedades.....	29
JUSTIFICACIÓN	31
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
Universo de estudio.	35
Criterios de inclusión.....	35
Criterios de no inclusión.....	35
Criterios de exclusión.....	35
Criterios de eliminación.....	35
Toma y procesamiento de las muestras.	36
Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	36
Análisis de Citometría de flujo multiparamétrica.	37
Ensayos de activación de las células MAIT.	38
Tinción del ensayo de activación de células MAIT.....	39
Consideraciones éticas.	40

RESULTADOS	42
Células MAIT	42
Producción de citocinas en células MAIT después de estar sometidas a un estímulo policlonal (PMA/Ionomicina)	49
LINFOCITOS T cooperadores (T CD4+).....	51
Producción de citocinas en Linfocitos T cooperadores (T CD4+) de sangre periférica después de estar sometidos a un estímulo policlonal (PMA/Ionomicina)	54
DISCUSIÓN.	56
CONCLUSIÓN.	61
ANEXO ANEXO 1. Producción de citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10 en células MAIT de sangre periférica de individuos sanos y pacientes alérgicos antes y después de estar sometidas a estimulación (PMA/Ionomicina) con sus respectivos histogramas.....	68

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de gravedad del asma según la GINA, 2017.....	15
Tabla 2. Clasificación del asma de acuerdo a niveles de control según la GINA, 2006.	17
Tabla 3. Anticuerpos monoclonales específicos para marcadores de superficie de células MAIT.....	38
Tabla 4. Anticuerpos monoclonales específicos para marcadores intracelulares de las células MAIT activadas.....	40

Índice de figuras

Figura 1. Fisiopatología de las vías respiratorias en el asma alérgico. Tomada y modificada de Holgate ST. et al (2008) [8]	20
Figura 2. Representación esquemática de la cascada de inflamación en asma alérgico. Tomada y modificada de de Holgate ST. et al (2008) [8]	22
Figura 3. Célula MAIT humana, dos posibles vías de activación. Tomada y modificada de Wong EB, et al. (2016) [26]	24
Figura 4. Representación del proceso posterior a la activación de la célula MAIT. Tomada y modificada de Wong EB, et al. (2016) [26]	25
Figura 6. Fenotipo de células MAIT humanas y su mecanismo de activación. Tomada y modificada de Kurioka A. et al. (2016). [34]	28
Figura 7. Estrategia para el análisis por citometría de flujo de células MAIT y Linfocitos T cooperadores	43
Figura 9. Perfil de citocinas en células MAIT en estado basal de A) individuos sanos, B) pacientes alérgicos	45
Figura 10. Porcentaje de células MAIT productoras de IFN- γ en pacientes alérgicos e individuos sanos	46
Figura 11. Porcentaje de células MAIT productoras de IL-17 en pacientes alérgicos e individuos sanos	46
Figura 12. Porcentaje de células MAIT productoras de IL-4 en pacientes alérgicos e individuos sanos	47
Figura 13. Porcentaje de células MAIT productoras de IL-10 en pacientes alérgicos e individuos sanos	47
Figura 14. Activación de células MAIT de sangre periférica de pacientes alérgicos e individuos sanos	50
Figura 15. Porcentaje de células T CD4 ⁺ (cooperadoras) productoras de IFN- γ en pacientes alérgicos e individuos sanos.	51
Figura 16. Porcentaje de células T CD4 ⁺ (cooperadoras) productoras de IL-17A en pacientes alérgicos e individuos sanos.	52
Figura 17. Porcentaje de células T CD4 ⁺ (cooperadoras) productoras de IL-4 en pacientes alérgicos e individuos sanos.	52
Figura 18. Porcentaje de células T CD4 ⁺ (cooperadoras) productoras de IL-10 en pacientes alérgicos e individuos sanos.	53
Figura 19. Activación de células T CD4 ⁺ de sangre periférica de pacientes alérgicos e individuos sanos	55

Figura 20. Activación de células MAIT de pacientes alérgicos.....	68
Figura 21. Activación de Linfocitos T CD4+ de pacientes alérgicos e individuos sanos.....	69

ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno.
CE	Con estímulo.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FEV1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
FMO	Control de mínima intensidad de fluorescencia.
GINA	Iniciativa Global para el Asma.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
HLA	Antígeno leucocitario humano.
ICS	Corticoesteroides inhalados.
IFN-	Interferón.
Ig-	Inmunoglobulina.
IGF	Intensidad geométrica de fluorescencia.
IL-	Interleucina.
ISAAC	Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Niñez.
MAIT	Células T invariantes asociadas a mucosa.

MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
MR1	Molécula MHC de clase I no clásica.
NHLBI	Instituto de Corazón, Pulmón y Sangre de Estados Unidos.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica.
PEF	Flujo espiratorio máximo.
PMA	Acetato de forbol miristato.
SE	Sin estímulo.
TCR	Receptor de linfocitos T.
TNF-	Factor de necrosis tumoral.

RESUMEN

Las células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT), se consideran linfocitos T innatos que inicialmente se les atribuyó un papel en la respuesta contra infecciones bacterianas, no obstante, existe evidencia que éstas células participan en enfermedades autoinmunes, autoinflamatorias y en cáncer. Recientemente, se ha observado la participación de las células MAIT en la respuesta inmunitaria de pacientes con enfermedades alérgicas y otras enfermedades de inflamación crónica, lo que ha estimulado a la realización de diversos experimentos con el objetivo de elucidar el papel que juegan estas células y de qué manera podrían ayudar en la mejora del paciente alérgico.

En este estudio se determinó la frecuencia de células MAIT mediante citometría de flujo, identificando a las células con marcadores de superficie: CD3, CD4, CD161, TCRV α 7.2, los pacientes alérgicos contaban con una frecuencia de células MAIT en sangre periférica menor que los individuos sanos. Igualmente se evaluó la funcionalidad de estas células mediante estimulación policlonal *in vitro* con PMA/Ionomicina y posteriormente realizando el marcaje de las citocinas vía intracelular: IL-17A, IFN- γ , IL-4 e IL-10, para su análisis por citometría de flujo, encontrando que la funcionalidad de las células MAIT en pacientes alérgicos se ve afectada, ya que no son capaces de producir IFN- γ después de estar sometidas a la estimulación ($p= 0.0020$), sucediendo lo mismo con las citocinas IL-4 ($p= 0.0312$) e IL-10 ($p= 0.0005$); para IL-17A es posible percibir que la citocina se sigue produciendo aunque en menores cantidades después del estímulo policlonal tanto en alérgicos como en sanos, la cantidad producida no es estadísticamente significativa ($p=0.2905$). En cuanto a las células CD4⁺ de sangre periférica se observa que la funcionalidad es menor en pacientes alérgicos presentando baja expresión de IFN- γ ($p= 0.0009$), IL-4 ($p<0.0001$) e IL-10 ($p<0.0001$) en comparación con los individuos sanos. Se concluyó que los pacientes alérgicos poseen menor frecuencia de células MAIT y alterada su función en sangre periférica en comparación con sujetos sanos.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas son padecimientos crónicos los cuales afectan notablemente la calidad de vida del paciente, además de que generan un gran impacto económico. Estas enfermedades, tales como el asma y la rinitis alérgica, son problemas de salud pública de importancia en todo el mundo, independientemente del nivel de desarrollo del país y con tendencia global en aumento en cuanto a su prevalencia.[1]

El asma alérgica se caracteriza por una inflamación crónica de las vías respiratorias, en donde incrementa la producción de moco en los bronquios y la hiperreactividad a una variedad de estímulos específicos y no específicos en las vías respiratorias. [2]

El asma es una enfermedad con diferentes fenotipos clínicos causados por diversos desencadenantes y mecanismos fisiopatológicos.[3]

Las enfermedades alérgicas son las entidades crónicas más frecuentes de la infancia, además de que se ha observado que con el paso del tiempo la prevalencia y gravedad de las mismas van en aumento; al igual que el impacto en la calidad de vida de las personas que las padecen. [4]

Para el control de estas patologías es necesario el diagnóstico preciso y la instauración de tratamiento, para un adecuado manejo por parte del paciente en la farmacoterapia y de la misma forma en la adopción de hábitos que permitan llevar una vida libre de episodios el mayor tiempo posible. [2]

Epidemiología de asma.

Se calcula que existen 235 millones de personas con asma la cual se considera la enfermedad no transmisible más frecuente en niños. El asma es un problema que está presente en todos los países independientemente de su nivel de desarrollo, pero la mayoría de las muertes por asma se producen en países de ingresos bajos y medianos bajos. [1]

La prevalencia del asma en niños ha sido incrementada durante las últimas dos décadas, de acuerdo con un estudio realizado en niños de nivel primaria. Los niños con un alto índice de masa corporal tienen una mayor prevalencia de presentar asma desde la infancia hasta la adolescencia. [5]

La prevalencia que se presenta en diferentes ambientes y a diferentes edades puede depender de diversos factores, entre ellos la predisposición genética es claramente evidente, la interacción de los genes con el ambiente probablemente explica mucho de la variación internacional en la prevalencia de alergia y asma. Los factores ambientales tales como las infecciones y la exposición a endotoxinas pueden ser protectores o pueden actuar como factores de riesgo dependiendo, en parte, del momento de exposición en la infancia y en la adolescencia. [3]

La prevalencia del asma se mantuvo estable o decreció del año 1991 a 1993 en algunas áreas del mundo, pero incrementó substancialmente en muchas otras áreas, especialmente en niños de 13-14 años de edad. Los estudios tanto de niños y adultos han revelado rangos de prevalencia del 2% al 4% en países asiáticos tales como India y China, y rangos altos del 15% al 20% en el Reino Unido, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, y otros países desarrollados. [6]

La prevalencia doméstica del asma ha incrementado un 2.9% cada año desde el año 2001 hasta el 2010, aproximadamente 20.3 millones de personas en Estados Unidos presentaron asma en 2001 comparado con 25.7 millones en el 2010. La prevalencia actual de asma es mayor en personas de raza negra (11.2%) que en las personas de raza blanca (7.7%), y es mayor en la población Puertorriqueña (17.0%) y menor en la población Mexicana-Americana (3.9%). [7]

Se sabe que más del 40% de la población occidental es atópica, es decir, muestran elevada la Inmunoglobulina E (IgE) contra alérgenos ambientales que son comunes; mientras tanto el 7% de los individuos atópicos lo expresa en forma de asma [8,9]

El diagnóstico de asma es predominante en hombres antes de la pubertad, pero en la edad adulta es mayor la prevalencia en mujeres, así como los casos más

severos de asma se presentan con mayor frecuencia en mujeres en comparación con los hombres. [7]

Interesantemente, dentro de los países desarrollados el asma es más común que en los países que se encuentran en vías de desarrollo o que se encuentran en desventaja con estos, aún en los países desarrollados el diagnóstico de asma es más común entre las personas de clase alta. [10]

Desde el año 2008 hasta el 2010, el promedio anual de la prevalencia de asma fue mayor en niños de 0-17 años (9.5%) que en adultos de 18 años en adelante (7.7%). [11]

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que afecta a 300 millones de personas y aún en la actualidad es causa de muerte en todo el mundo, estimando 250 000 muertes por asma al año. [12] En las últimas décadas la prevalencia aumentó de forma importante, principalmente en las ciudades industrializadas.[13] Sin embargo, en los últimos 10 años, no se han reportado incrementos.[14]

Los estudios epidemiológicos en América Latina han expuesto diferencias en la prevalencia del asma, se han mostrado cifras de 5.7 a 16.5% en la población pediátrica, estas variaciones pueden deberse al uso de distintas metodologías o a la influencia de diversos factores geográficos, demográficos, y ambientales. [10]

La prevalencia global del asma es aproximadamente 300 millones de personas o el 4.3% de la población mundial y esto va en aumento. [7] La Iniciativa Global para el Asma (GINA) estima que habrá 100 millones de personas más con asma para el año 2025. [7,10]

Epidemiología de asma en México.

En México, la prevalencia del asma va en aumento desde la década de 1980, describiendo como causas los factores ambientales y genéticos, y en consecuencia del aumento de la prevalencia se han descrito mejores medidas de higiene. [4]

En los últimos años se han realizado estudios en la Ciudad de México, aplicando la metodología del ISAAC, determinando que la prevalencia de asma en diferentes ciudades de México va del 2.7 al 21.8%, la prevalencia fue de 5.7% en el grupo de escolares y de 5.9% en el de adolescentes, a lo largo del estudio se observó mayor frecuencia y gravedad de asma en las mujeres adolescentes.[16]

En cuanto a la mortalidad, se ha observado que es más frecuente en invierno, con un predominio discreto en las mujeres, y México es uno de los países con tasas más elevadas. [15]

Como anteriormente se mencionaba los estudios epidemiológicos sobre el asma pueden llegar a variar notablemente debido a las diferentes condiciones en las que la población vive, características genéticas o simplemente por la metodología que se haya empleado para definir la misma. Actualmente, el asma se ha descrito como la enfermedad pediátrica crónica de vías respiratorias más frecuente, por ello la importancia de su estudio.[4]

Definición de asma.

Según la Organización Mundial de la Salud, OMS, el asma es una enfermedad crónica, la cual provoca inflamación y estrechamiento de las vías respiratorias. Las causas del asma aún no se encuentran completamente claras, pero se ha observado que los principales factores de riesgo son la combinación de una

predisposición genética con la exposición ambiental a sustancias y partículas inhaladas, conocidas como alérgenos. [1]

La Iniciativa Global para el Asma (Global Initiative for Asthma) define al asma como una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por una inflamación crónica de las vías respiratorias. La inflamación crónica está definida por la historia de síntomas respiratorios tales como, sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho, tos que varía en tiempo e intensidad, junto con una limitación variable del flujo de aire espiratorio.[GINA, 2017]

El asma alérgica, puede ser desencadenada debido a la exposición a aeroalérgenos, que inducen respuestas de hipersensibilidad inmediata, además de que pueden intervenir factores no específicos, tales como, los irritantes, la contaminación ambiental, el humo del tabaco, los polvos, vapores químicos, cambios climáticos, infecciones respiratorias virales, estrés, etcétera, pudiendo estar asociados con factores genéticos de susceptibilidad, por lo que el asma es considerada una enfermedad multifactorial. [17]

Clasificación del asma.

Desde el año de 1997, el Instituto de Corazón, Pulmón y Sangre de Estados Unidos (National Heart, Lung and Blood Institute, NHLBI) junto con la Organización Mundial de la Salud publicaron el segundo informe del grupo de expertos “Directrices para el Diagnóstico y tratamiento del asma”; en donde se incluía un enfoque de tratamiento de acuerdo a la gravedad clínica del asma considerando tres variables: frecuencia de síntomas respiratorios diurnos, frecuencia de síntomas respiratorios nocturnos y estado de la función pulmonar. Esto permitió que se definieran cuatro categorías de esta enfermedad: [17]

1. Asma intermitente.
2. Asma persistente leve.
3. Asma persistente moderada.
4. Asma persistente grave.

Desde entonces el asma ha sido clasificada en función de estas variables con adaptaciones de acuerdo a las características de cada población donde el asma represente un problema de atención médica.

Una de las guías clínicas más empleadas por su difusión en diferentes idiomas y su constante actualización, es la guía Global Initiative for Asthma (GINA), quienes clasifican al asma de acuerdo a la severidad para que los pacientes sean tratados de acuerdo a ésta. (Ver Tabla 1.)

Tabla 1. Clasificación de gravedad del asma según la GINA, 2017.

Clasificación	Frecuencia de los síntomas	Función pulmonar
Asma intermitente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas < 1 vez por semana. • Exacerbaciones breves. • Síntomas nocturnos no más de 2 veces por mes. 	<ul style="list-style-type: none"> • FEV1 ó PEF >80% del predicho. • Variabilidad del *FEV1 ó *PEF < 20%
Asma leve persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas > 1 vez por semana pero < 1 vez al día. • Las exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño • Síntomas nocturnos >2 veces al mes. 	<ul style="list-style-type: none"> • FEV ó PEF > 80% del predicho. • Variabilidad del FEV1 ó PEF 20-30%
Asma moderada persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas diariamente. • Las exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño. • Síntomas nocturnos >1 vez a la semana. • Uso diario de β2-agonista inhalado, de acción rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> • FEV ó PEF 60-80% del predicho. • Variabilidad del FEV1 ó PEF > 30%
Asma grave persistente	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas diariamente. • Exacerbaciones frecuentes. • Síntomas nocturnos frecuentes. • Limitación de actividad física. 	<ul style="list-style-type: none"> • FEV1 ó PEF \leq 60% • Variabilidad FEV1 ó PEF >30%

*Abreviaturas: FEV1: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo, PEF: Flujo espiratorio máximo (Peak-flow).

Esta clasificación se basa en aspectos clínicos y funcionales, en donde el monitoreo funcional se realiza con flujómetro, que es un aparato portátil que permite medir la máxima cantidad de aire exhalado, ésta medición permite evaluar en forma rápida y sencilla el grado de obstrucción de las vías respiratorias; y se

realiza basado en su menor costo y mayor accesibilidad en situaciones de limitación económica. [17]

Las clasificaciones del asma que se han realizado, se fundamentan en las características fisiopatológicas de este padecimiento, ya que cursa grados variables de inflamación, y por tanto, en grados variables de obstrucción al flujo de aire y manifestaciones clínicas. Significa que la gravedad no es una característica constante, sino que puede cambiar en el tiempo, por lo que es necesario mantener al paciente en seguimiento hasta revalorarlo clínica y funcionalmente y así reclasificarlo. [8,17]

En el año 2004, el Comité Ejecutivo de GINA enfatizó sobre el manejo del asma de acuerdo al grado de control clínico y fue por lo que en el año 2006, presentó esta clasificación, considerando además de la frecuencia de los síntomas y la función pulmonar, la frecuencia de las exacerbaciones; y separando la enfermedad en tres categorías: controlado, parcialmente controlado y no controlado.[10]

Tabla 2. Clasificación del asma de acuerdo a niveles de control según la GINA, 2006.

Característica	Controlado	Parcialmente controlado	No controlado
Síntomas durante el día	Ninguno (menos de dos veces por semana)	Más de dos veces por semana.	Tres o más características de parcialmente controlado en cualquier semana.
Limitación de las actividades	No	Sí	
Síntomas nocturnos	No	Sí	
Uso de medicamentos de rescate	No (menos de dos veces por semanas)	Más de dos veces por semana	
Función pulmonar FEV1 ó FEM	Normal	< 80% de predicho	
Exacerbaciones	Ninguna	Una o más por año	

* Abreviaturas: FEV1: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

Además la clasificación por grado de control clínico también tiene implicaciones terapéuticas, esto quiere decir que dependiendo del grado de control en el que se encuentra el paciente, recibirá la dosis adecuada de antiinflamatorio no esteroideo y se observará si necesita de un medicamento controlador. [17]

Tipos de asma.

El asma es una enfermedad heterogénea, que tiene diferentes procesos patológicos subyacentes, Una agrupación de características reconocibles demográficas, clínicas y/o fisiopatológicas son a menudo llamadas “fenotipos del asma”. [2,8]

Muchos tipos han sido identificados, algunos de los más comunes son: [2]

- **Asma alérgico:** este fenotipo es el más fácil de identificar, a menudo inicia en la infancia y es asociado con una historia de enfermedades alérgicas en la familia tales como, eccema, rinitis alérgica, alergia a comida o fármacos. En la examinación que se les realiza a los pacientes antes de dar algún tratamiento, esputo inducido, revela inflamación eosinofílica de vías respiratorias. Como tratamiento para los pacientes con este fenotipo se emplean corticoesteroides inhalados (ICS) al que se ha observado responden bien.
- **Asma no alérgico:** Algunos adultos tienen asma que no está asociada con ningún tipo de alergia. El perfil celular del esputo de estos pacientes podría contener neutrófilos, eosinófilos o solo unas pocas células inflamatorias. A menudo responden menos a los corticoesteroides (ICS).
- **Asma tardía:** Algunos adultos, particularmente mujeres, presentan asma por primera vez en la vida adulta. Estos pacientes tienden a ser no alérgicos, y a menudo requieren altas dosis de ICS o son relativamente resistentes al tratamiento con corticoesteroides.
- **Asma con limitación en la reparación de vías respiratorias:** Algunos pacientes que tienen largo tiempo padeciendo asma, desarrollan una limitación en la reparación de las vías respiratorias que se piensa que es debido a la remodelación de la pared de las vías respiratorias.
- **Asma con obesidad:** Algunos pacientes obesos con asma han presentado síntomas respiratorios prominentes y baja inflamación eosinofílica de vías respiratorias.

Fisiopatología

La epigenética es considerada como un contribuidor importante de la patogénesis del asma. [3]

La inflamación de las vías respiratorias es fundamental para la patogénesis del asma. La inflamación de las vías respiratorias en el asma es un proceso multicelular que involucra la participación de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T CD4⁺ y mastocitos. [17]

El tipo Th2 de inflamación es común en las respuestas inflamatorias alérgicas crónicas en múltiples sitios del tejido y de hecho se observa en pacientes con asma, quienes frecuentemente expresan comorbilidades, tales como rinitis crónica, sinusitis, dermatitis atópica y alergia a ciertos alimentos. [8]

Empleando células epiteliales diferenciadas en cultivo de vías respiratorias normales y asmáticas, se ha demostrado que la permeabilidad (filtración) del epitelio en asmáticos es altamente aumentada, dando lugar a un mayor acceso de alérgenos inhalados, contaminantes y otros irritantes a las células basales y a los tejidos de vías respiratorias subyacentes. [8]

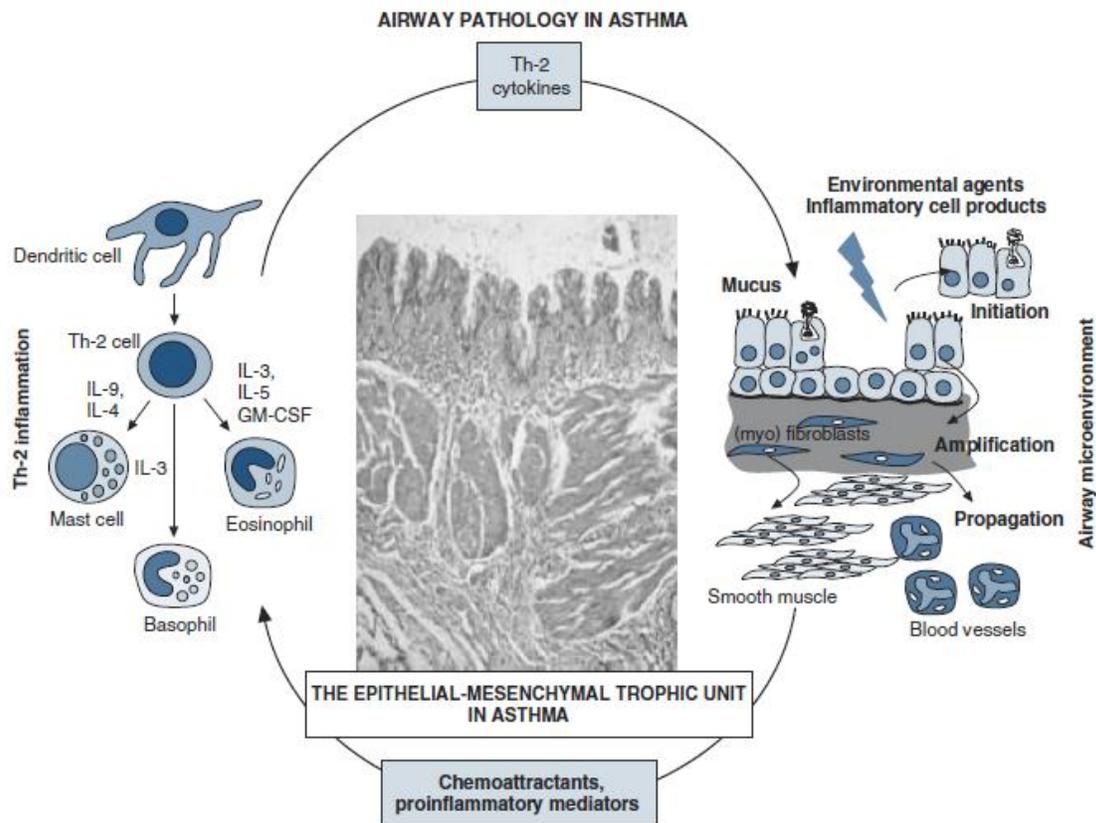


Figura 1. Fisiopatología de las vías respiratorias en el asma alérgico. Tomada y modificada de Holgate ST. et al (2008) [8]

Inmunología del asma.

Una característica fundamental del asma asociado con la sensibilización alérgica es la habilidad de las vías respiratorias de reconocer alérgenos comunes en el medio ambiente y generar una respuesta de citocinas tipo Th₂ contra estas. [8]

Varios tipos de células se encuentran involucradas en la inflamación de vías respiratorias, sin embargo, la respuesta inmunitaria adquiere un perfil tipo Th₂, en donde se secretan citocinas tipo Th₂ tales como la IL-4, IL-5 e IL-13 (Ver Figura 1), que podrían determinar la patobiología del asma.[19]

La respuesta inmune tipo Th₂ también media la producción de moco que se lleva a cabo por el epitelio de las vías respiratorias, la cual contribuye a la obstrucción de las vías respiratorias y que constituye un componente importante de la patología de la inflamación de vías respiratorias por alergia.[19]

Bajo circunstancias normales el epitelio forma una barrera altamente regulada e impermeable, a través de uniones estrechas. La integridad estructural es también mantenida a través de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que involucra la participación de caderina-E, desmosomas y hemidesmosomas. Pero la permeabilidad del epitelio en asmáticos está altamente incrementada, permitiendo el acceso de alérgenos inhalados a las células basales y al tejido subyacente de las vías respiratorias. [14]

Una parte esencial de la sensibilización alérgica es la captación y procesamiento de alérgenos inhalados por las células dendríticas situadas en el epitelio de las vías respiratorias y la submucosa y que extienden sus procesos a la superficie de las vías respiratorias. [8,20]

La absorción de alérgenos se incrementa mediante la unión de IgE a receptores de alta afinidad en células dendríticas que facilitan la internalización del alérgeno. Una vez dentro de la célula dendrítica, el procesamiento de alérgenos por catepsina S y la selección posterior de péptidos cargados y presentados por moléculas de HLA (MHC clase II) es fundamental para la capacidad de estas células como células presentadoras de antígeno hacia los linfocitos T. [21]

Se puede observar que cuando existe asma leve o moderada, la presencia de las células tipo Th₂, es la población dominante de todas las células T en vías respiratorias. [8]

Una vez sensibilizadas, las células T no sólo migran a las vías respiratorias desde el sitio de presentación de antígeno bajo la influencia de la quimiocinas CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 y CCL22, sino que también se convierten en potentes productores de una serie de citocinas, tales como, IL-3, IL-4, IL-5, IL-

6, IL-9, IL-13 y granulocito-macrófago factor estimulante del colon (GM-CSF) (Ver figura 2). [8]

Se ha observado que en pacientes asmáticos la frecuencia de las células MAIT en sangre periférica se reduce, ésta característica se encuentra relacionada con la severidad del asma, reduciendo igualmente la frecuencia de células T reguladoras (Treg) en la enfermedad severa y un incremento en los niveles de mediadores de mastocitos. [5]

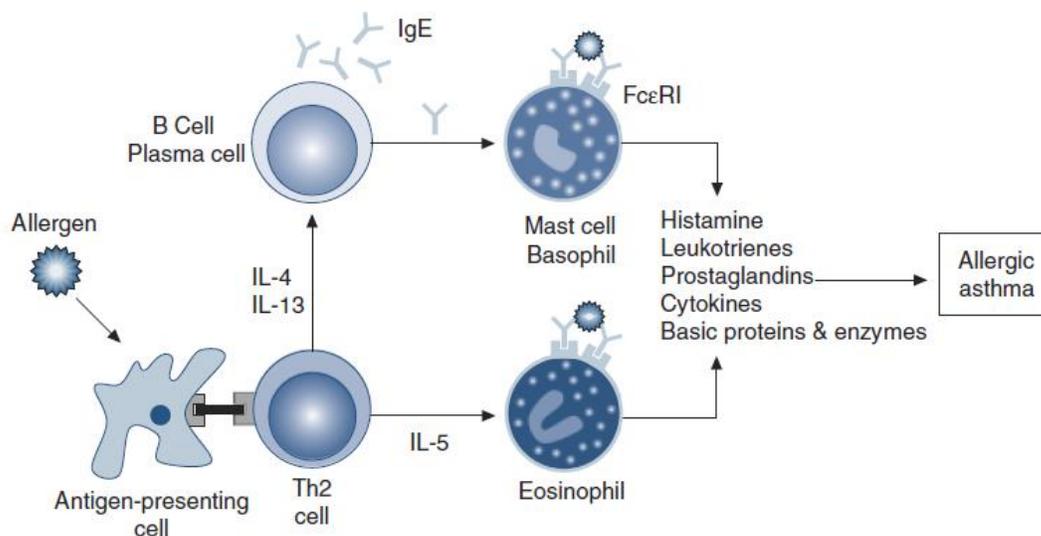


Figura 2. Representación esquemática de la cascada de inflamación en asma alérgico. Tomada y modificada de de Holgate ST. et al (2008) [8]

Células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT)

Las células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT), constituyen una población abundante de células T innatas que expresan un receptor semi-invariante de células T (TCR) de cadena $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$ y un arreglo limitado de $V\beta 2$ o $V\beta 13$ en humanos. Las células MAIT que se encuentran en circulación y en tejido infiltrado

pueden ser caracterizadas por la expresión de un segmento de V α 7.2, ya sea con CD161 o IL-18R α en la superficie de la célula. [22]

Muchas subpoblaciones de linfocitos con un repertorio limitado de la diversidad, han sido identificadas como células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT). Ha sido reportada su actividad en varias condiciones de enfermedad, incluyendo infecciones, enfermedades autoinmunes y otras respuestas inflamatorias. [3]

Tanto el receptor de antígeno de células T (TCR) como el expresado por células MAIT (MR1) se conservan evolutivamente, lo que sugiere una fuerte presión selectiva para mantener la inmunidad mediada por células MAIT. Las células MAIT representan del 5-50% aproximadamente de las células T en varios tejidos humanos, aunque sus números varían ampliamente entre la población [3].

Se conoce poco sobre el desarrollo de las células MAIT, se encuentra reportado que salen de Timo con restricción a moléculas no clásicas del MHC como la molécula MR1 y adquieren su fenotipo efector en la periferia. Aunque se han definido subgrupos fenotípicamente distintos de las células MAIT, incluidas las poblaciones CD4⁺, CD4⁻CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺, la vía de desarrollo que sustenta la producción y maduración de la célula MAIT ha permanecido incierta. [23]

En contraste con las células T convencionales que reconocen péptidos antígeno-específicos, las células MAIT pueden reconocer y responder a metabolitos de la vitamina B producidos por bacterias en contexto de la Molécula Relacionada al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (MR1). MR1 es una molécula presentadora de antígeno, que a diferencia de las moléculas del MHC de clase I que son altamente polimórficas, es una molécula muy conservada entre mamíferos (Ver figura 3). [23]

Algunas investigaciones en 2010 mostraron que las células MAIT restringidas a MR1 podían ser activadas por diferentes especies de bacterias y levaduras, además de que observaban que eran fundamentales para la protección temprana contra las infecciones bacterianas. [24,25]

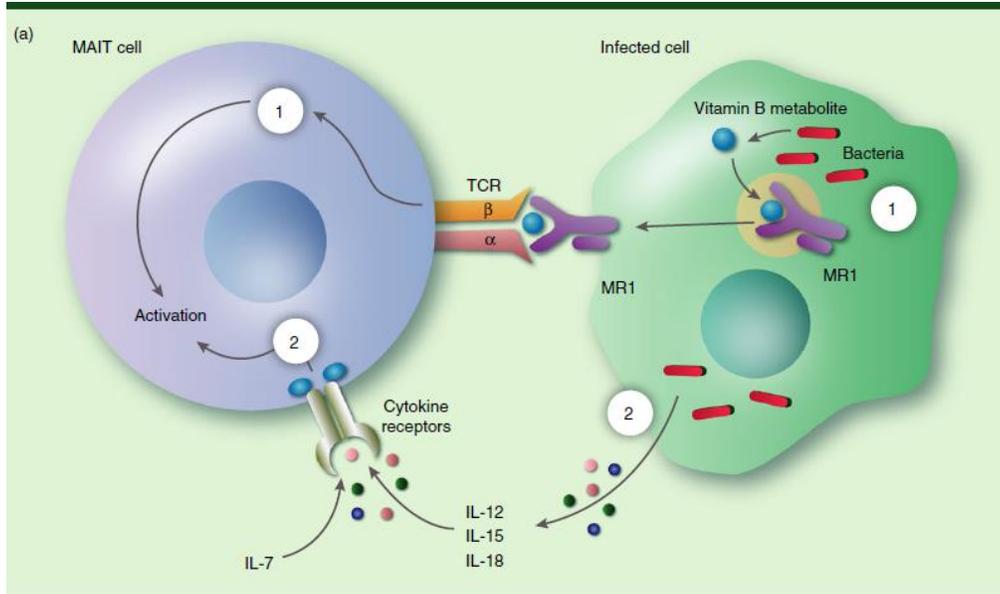


Figura 3. Célula MAIT humana, dos posibles vías de activación. Tomada y modificada de Wong EB, et al. (2016) [26]

La naturaleza del ligando MR1 fue descubierta después por Kjer-Nielsen *et al.* quien mostró que MR1 puede presentar derivados altamente conservados de las vías de síntesis de riboflavina y ácido fólico.[27]

El ligando activador de células MAIT más potente encontrado hasta la fecha es 5-OP-RU (5- (2-oxopropilideneamino) -6-D ribitilaminouracilo), generado a partir de la condensación no enzimática de un intermedio temprano de la vía de síntesis de riboflavina con glioxal o subproductos de metilglioxal. Se demostró que MR1 se acumula en el retículo endoplasmático en una forma incompletamente plegada, y en ausencia de ligandos unidos, solo unas pocas moléculas de MR1 transitan a la superficie. El aumento de la disponibilidad de ligandos conduce a la asociación de MR1 con microglobulina $\beta 2$ y salida del complejo MR1 $\beta 2$ -microglobulina-ligando, lo que induce la expresión rápida en superficie de MR1.[28, 29,30] La expresión en superficie de MR1 también aumenta con la activación dependiente de factor nuclear- κB en células presentadoras de antígeno.[31] Esto contrasta con MHC de clase II y CD1, que capturan sus ligandos exógenos en compartimentos

endosómicos y están altamente expresados incluso en ausencia de infección.[28] También fue posible encontrar que en co-cultivos con Células Presentadoras de Antígeno (APC) infectadas con bacterias, activan a las células MAIT permitiéndoles producir diversas citocinas, incluyendo interferón- γ (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) e Interleucina-17A (IL-17A) (Ver figura 4).[28,31]

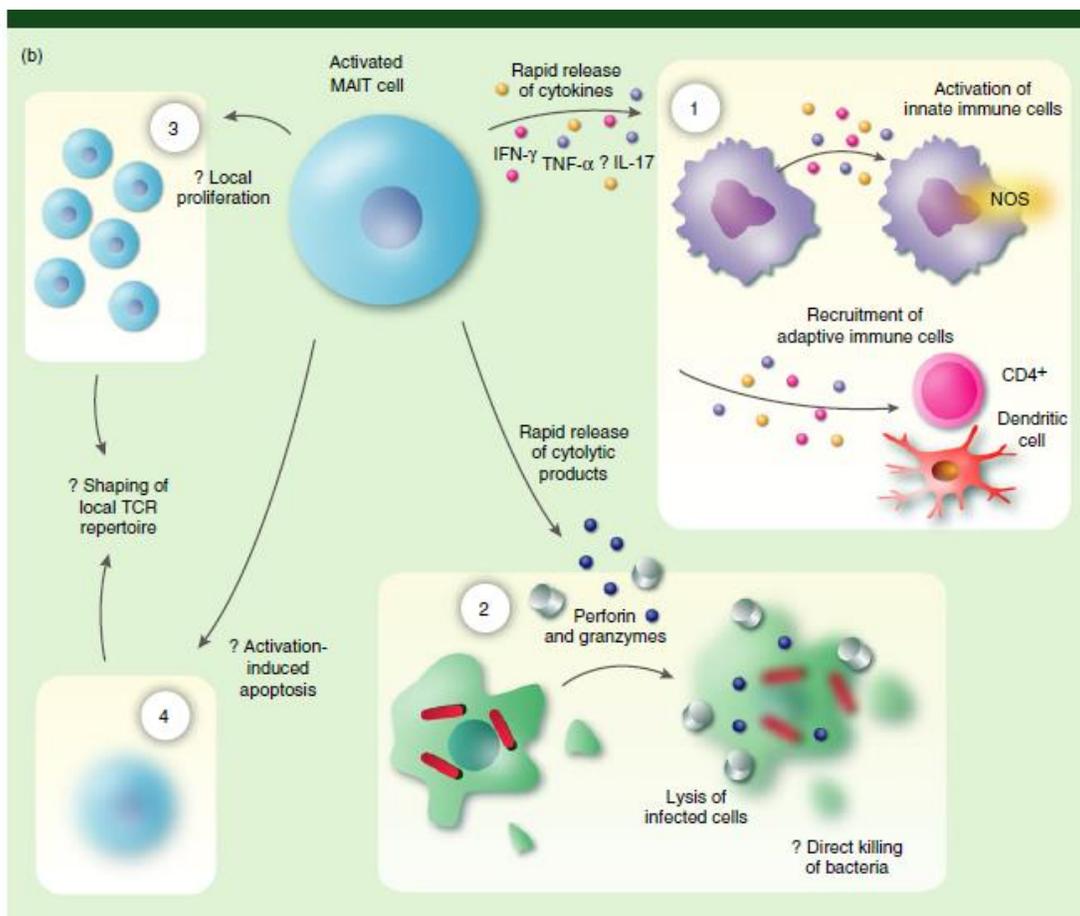


Figura 4. Representación del proceso posterior a la activación de la célula MAIT. Tomada y modificada de Wong EB, et al. (2016) [26]

Distribución de las células MAIT en los tejidos.

Es muy raro encontrar las células MAIT en los tejidos linfoides [32,33] debido a la falta de expresión de CCR7 y de CD62L, requeridas para la localización en los ganglios linfáticos. Sin embargo, las células MAIT preferentemente se albergan en los tejidos periféricos, mediados por la expresión de los receptores de las quimiocinas CCR6 y CXCR6, por la integrina $\alpha 4\beta 7$ que se encuentra en el intestino y bajos niveles de CCR9. [34]

De hecho a estas células se les denomina “asociadas a la mucosa”, ya que el transcrito V α 7.2-J α 33 se encontraba enriquecido en el intestino humano en comparación con los tejidos cutáneos cuando inicialmente se caracterizaron. [35]

Diversos estudios han confirmado que el tetrámero de MR1 se encuentra enriquecido en el intestino con diferentes frecuencias de células MAIT localizadas en varias ubicaciones anatómicas dentro del tracto gastrointestinal; informando una mayor frecuencia de estas células en el yeyuno con aproximadamente un 60% de las células T CD4⁻ [23] en comparación con la frecuencia en íleon (1.5% de células T) [36], en colon (10% de células T) [37,38] y en recto (2% de células T) (Ver figura 5). [34]

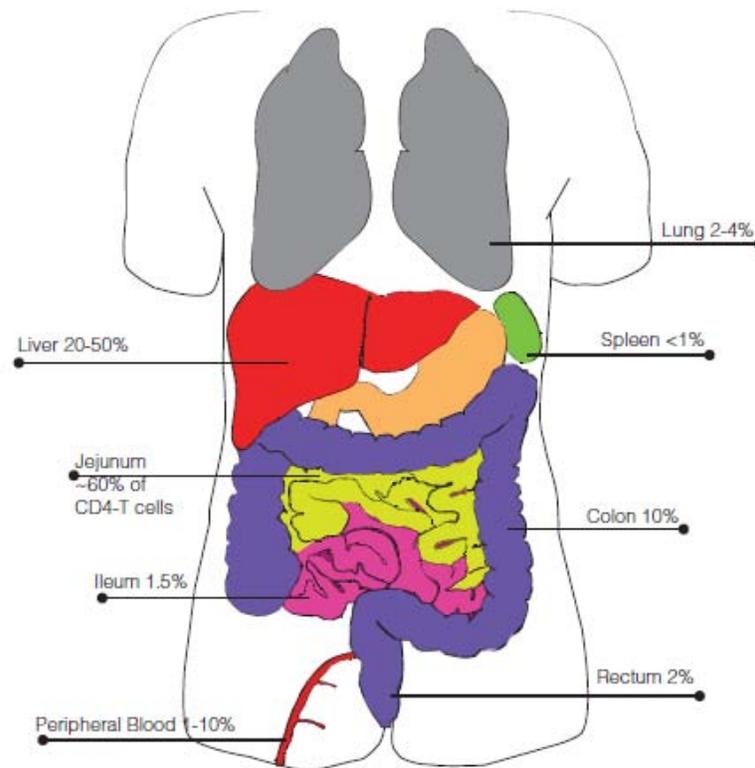


Figura 5. Distribución de las células MAIT en los diversos tejidos humanos. Tomada y modificada de Kurioka A. et al. (2016). [34]

Fenotipo y funciones efectoras de las células MAIT.

En adultos, las células MAIT expresan un fenotipo de memoria efectora uniforme; aunque las células MAIT de sangre de cordón umbilical son naive, comparten una firma transcripcional pre-programada con células MAIT adultas, en línea con la adquisición de su reactividad innata y fenotipo activado durante el desarrollo. [34,35]

Otra característica clave de las células MAIT humanas es la alta expresión del receptor de tipo lectina-C, CD161, y en estado estacionario se ha demostrado que las células T CD161⁺⁺ Va7.2⁺ se superponen con las células teñidas por el tetrámero MR1. [23,34,35] Además, CD161 es uno de los primeros marcadores

que se expresan en las células MAIT, en timo y órganos fetales, así como en la sangre de cordón umbilical. También las células MAIT expresan altos niveles de interleucina-18R (IL-18R), lo que les permite liberar rápidamente Interferón- γ (IFN- γ) [40,41] y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) en respuesta a citocinas innatas como IL-12 e IL-18 (Ver figura 6). [23]

Las células MAIT también cuentan con la capacidad de ser independientes de la señalización de MR1 y ser activadas sólo por citocinas, característica que comparten con otras células T innatas, pero no con las células T convencionales que requieren señalización del TCR antes de la expresión de receptores de citocinas como IL-18R. [34]

Además de IFN- γ y TNF- α los cuales pueden ser inducidos de manera dependiente o independiente del TCR; las células MAIT tienen una alta expresión constitutiva de RAR relacionado al receptor γ t y la habilidad asociada de expresar IL-17A [42,43,44] además de que constituye la principal población de células T productoras de IL-17 en el hígado humano. [45]

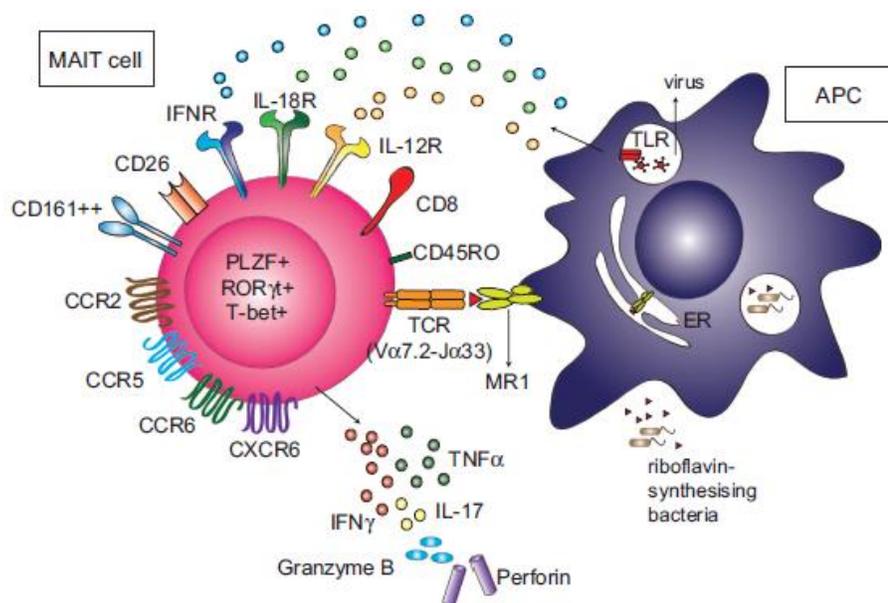


Figura 6. Fenotipo de células MAIT humanas y su mecanismo de activación. Tomada y modificada de Kurioka A. et al. (2016). [34]

La expresión de IL-10 de las células MAIT es particularmente alta en el tejido adiposo, lo que sugiere una función inmunosupresora para las células MAIT en ciertos tejidos. [42]

Las funciones efectoras de las células MAIT también incluyen su capacidad para degranular y terminar con infecciones bacterianas o células sensibilizadas, lisar células infectadas con BCG y *Shigella*. [46]

Finalmente, a pesar de la expansión de las células MAIT después del nacimiento, las células MAIT adultas carecen de expresión de Ki67 en la periferia y por tanto se llegó a pensar que estas eran poco proliferativas [42, 47, 48]. Sin embargo, estudios recientes han confirmado la capacidad de las células MAIT de murino y humano para proliferar tanto en forma dependiente de MR1 como en respuesta a citocinas in vitro [49,50,51] e in vivo. [52] Dado que las células MAIT son altamente sensibles a la muerte celular inducida por activación, una posible explicación de la discrepancia entre los estudios puede ser que la sobreestimulación de células MAIT condujo a la pérdida de células MAIT antes de que pudieran proliferar. [53]

Células MAIT y enfermedades.

La alta conservación evolutiva de MR1 y su reconocimiento de intermediarios de la ruta de riboflavina, conservados en varias especies de bacterias y de levaduras, sugiere que las células MAIT tienen un crítico y no redundante papel en la protección microbiana. De hecho, en varios documentos se sugiere que las células MAIT juegan un papel protector en las infecciones bacterianas. [27, 52]

Los modelos de infección con aerosoles han demostrado que las células MAIT son esenciales para el control temprano de la carga bacteriana en el pulmón. [46,54] También se ha observado que incluso en la ausencia de células T $\alpha\beta$ convencionales, podían actuar las células MAIT y se ha sugerido que estas células

pueden ser importantes para el control microbiano en pacientes inmunocomprometidos. [37]

El rol de las células MAIT sigue siendo enigmático, los hallazgos sobre las células MAIT donde reconocen a las células infectadas de manera MR1 dependiente y su dependencia de la microbiota señalan hacia un papel potencial de las células MAIT en la respuesta inmune contra las bacterias. [47, 48]

Además, se ha demostrado la severa disminución en el número de células MAIT en sangre de pacientes infectados por bacterias además de encontrar una relación con el aumento de la susceptibilidad de los pacientes hospitalizados con infecciones nosocomiales secundarias [55].

En la actualidad las células MAIT se asocian con enfermedades inflamatorias como esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, así como presentar un papel antimicrobiano, e igualmente combatir enfermedades virales. Algunos estudios han sugerido que las células MAIT tienen un papel en el desarrollo de anticuerpos protectores contra polisacárido.[56]

Actualmente no se cuentan con muchos estudios que involucren el papel de las células MAIT en enfermedades alérgicas tal como lo es el asma alérgica, pero se ha encontrado que la frecuencia de las células MAIT se ve disminuida, esta situación se encuentra relacionada con la severidad de la enfermedad alérgica [5] Esto podría ser parecido a lo que se observa con pacientes que presentan enfermedades inflamatorias del intestino ya que tienen una frecuencia reducida de las células MAIT en sangre periférica que se asocia con un enriquecimiento de las células MAIT en el tejido inflamado [55].

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha observado un aumento importante en los casos de diagnóstico de asma y según la Iniciativa Global para el Asma (GINA) se proyecta que para el año 2025 habrá 100 millones de personas más con asma.

El asma se considera una enfermedad multifactorial donde el sistema inmunológico participa de forma activa. Inicialmente se entendía que una respuesta de linfocitos T cooperadores Th2 era la responsable de esta enfermedad, sin embargo, el avance en el estudio del sistema inmunológico nos ha mostrado que existen otras poblaciones celulares que pudieran estar participando en esta enfermedad, tales como las células MAIT (linfocitos T innatos asociados a mucosas), las cuales podrían afectar el proceso inflamatorio mediante la producción de citocinas.

Existen pocos estudios que evalúan el papel de las células MAIT en los sujetos alérgicos, por ello en el presente estudio se busca analizar la frecuencia y función de las células MAIT en sangre periférica de pacientes alérgicos y comparar con un grupo de voluntarios sanos para observar la participación de dichas células en el proceso alérgico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia y función de las células MAIT y linfocitos T cooperadores de sangre periférica en pacientes alérgicos con respecto a sujetos sanos?

HIPÓTESIS

Las células MAIT de sangre periférica de pacientes alérgicos se encuentran disminuidas comparadas con individuos no alérgicos y son productoras de IFN- γ .

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la frecuencia y función de las células MAIT y Linfocitos T cooperadores en sangre periférica de pacientes con diagnóstico inicial de asma alérgica.

Objetivos particulares

- Establecer una estrategia de análisis para la identificación de las células MAIT y Linfocitos T cooperadores en PBMC de pacientes alérgicos mediante Citometría de Flujo Multiparamétrica.
- Determinar la frecuencia de las células MAIT y Linfocitos T cooperadores en mononucleares de sangre periférica en pacientes con diagnóstico inicial de asma alérgica mediante Citometría de Flujo Multiparamétrica.
- Determinar el perfil de citocinas que producen las células MAIT y Linfocitos T cooperadores en PBMC de pacientes con diagnóstico inicial de asma alérgica mediante Citometría de Flujo Multiparamétrica.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Universo de estudio.

Para el estudio se reclutaron pacientes con diagnóstico primario de asma alérgica por parte del Servicio de Alergia e Inmunología clínica del Hospital Juárez de México, los cuales no recibieron tratamiento previo, que cumplieron con los demás criterios de inclusión del estudio, y que proporcionaron su firma de consentimiento informado y aviso de protección de datos personales. Este trabajo forma parte de un protocolo de investigación evaluado por los comités de Ética, Bioseguridad e Investigación del Hospital Juárez de México.

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico inicial de asma alérgica y sin tratamiento farmacológico previo.
- Pacientes atendidos en el Servicio de Alergia e Inmunología clínica del Hospital Juárez de México.
- Hombres o mujeres.
- Mayores de 18 años y menores de 68 años.
- Que deseen participar y firmen el consentimiento informado.

Criterios de no inclusión

- Mujeres embarazadas.
- Sujetos con enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias.

Criterios de exclusión

- Pacientes en tratamiento farmacológico.
- Sujetos que ya no deseen participar en el estudio.

Criterios de eliminación

- Pacientes que retiren el consentimiento informado.

- Pacientes con muestra insuficiente o inadecuada (hemólisis, lipémica) para el procesamiento.
- Pacientes con expediente clínico incompleto.

Toma y procesamiento de las muestras.

Los pacientes donaron 4 ml de sangre venosa, la muestra de sangre periférica fue recolectada en tubos con Etilen-diamino-tetraacetatodisódico (EDTA) como anticoagulante por personal técnico calificado. Se tomó muestra a 16 pacientes que presentaron diagnóstico de asma alérgico. Posteriormente se obtuvieron muestras de donadores sanos sin ningún tipo de diagnóstico de alergia, como grupo control.

Las muestras se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos a 10°C (Centrífuga Heraeus™ Megafuge™, ThermoScientific™, Langensbold), se retiró el suero y el paquete celular se resuspendió con solución salina isotónica (v/v).

Obtención de células mononucleares de sangre periférica.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica mediante un gradiente de densidad, FICOLL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upsala, Suecia), en donde se tomaba la sangre del tubo con EDTA como anticoagulante, y se diluía con Solución Salina Isotónica (SSI) hasta 12 ml, después en un tubo Falcon® de 15 ml se colocaron 2 ml de la solución de FICOLL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upsala, Suecia) adicionando poco a poco la sangre diluida, se centrifugó a 600 g por 20 minutos a 10°C (Centrífuga Heraeus™ Megafuge™, ThermoScientific™, Langensbold), al terminar ésta se separaron las células realizando 2 lavados con SSI consecutivamente. Posteriormente se determinó el número y porcentaje de viabilidad mediante un equipo automatizado “Automated Cell Count” (BIO RAD, Singapur), que posteriormente fueron criopreservadas en medio de

criopreservación (SFB, DMSO, Medio RPMI sin suplementar) en alícuotas de 3×10^6 células/ml a -70°C hasta su análisis.

Análisis de Citometría de flujo multiparamétrica.

Tinción del fenotipo inicial de células MAIT.

Se descongeló una alícuota de células mononucleares, se lavó (centrifugación a 600g por 5 minutos a 10°C , decantando el sobrenadante) con medio RPMI suplementado (RPMI, SFB 5%, 100 mg/ml Estreptomicina-Penicilina). El paquete celular fue resuspendido en 1 ml de medio RPMI sin suplementar, del cual se tomó una alícuota y se realizó una dilución 1:10 con PBS y 1:2 con azul tripano; posteriormente se realizó un conteo celular en el equipo automatizado (Automated Cell count, BIO RAD, Singapur). 1×10^6 células fueron teñidas con anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos (Anti-CD161 humano acoplado a Brilliant Violet BV510 (BD Horizon, CA, EUA), Anti-TCRV α 7.2 humano acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Anti-CD3 humano acoplado a Alofococinina H-7 (APC-H7), Anti-CD4 humano acoplado a Violet 450 (V450) a diluciones previamente estandarizadas en el laboratorio (Ver Tabla 3). Se incubaron las suspensiones celulares con los anticuerpos respectivos durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavaron las muestras (centrifugación a 600g por 5 min a 10°C y decantación del sobrenadante) con Buffer de Tinción (Solución Buffer de Fosfatos (PBS) + Albúmina Sérica Bovina) para retirar el exceso de anticuerpo. Finalmente, las suspensiones celulares se llevaron a un volumen de 300 μL para su adquisición en el citómetro de flujo FACS VERSE (BD Biosciences, CA, EU). Se identificaron las células MAIT mediante la estrategia previamente estandarizada en el laboratorio, adquiriendo al menos 5,000 eventos por muestra. El análisis se realizó en el programa Flow Jo V10.5 (FlowJo LLC, EU).

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales específicos para marcadores de superficie de células MAIT.

Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución	Marca	No. Catálogo
TCR V α 7.2	FITC	1:250	BIOLEGEND	351704
CD3	APC-H7	1:250	BD Pharmingen™	560176
CD4	V450	1:250	BD Horizon™	561838
IFN- γ	PE-Cy7	1:100	BD Pharmingen™	557643
IL-17A	PerCP-Cy5.5	1:100	BD Pharmingen™	560799
IL-4	PE	1:100	BD Pharmingen™	551774
IL-10	PE	1:100	BD Pharmingen™	559337
CD161	BV510	1:250	BD Horizon™	563212

Ensayos de activación de las células MAIT.

Se descongeló una alícuota de células mononucleares, se lavó (centrifugación a 600g por 5 min a 10°C, decantación del sobrenadante) con medio DMEM suplementado (DMEM, SFB 10%, Penicilina/Estreptomina 100 mg/ml + Piruvato + Glutamina), posteriormente el paquete celular se re-suspendió en 1 ml de medio DMEM sin suplementar, tomando una alícuota y realizando una dilución 1:10 con PBS y 1:2 con Azul Tripano, para realizar el conteo de las células en el equipo Automated cell counter (Bio Rad).

Un millón de células mononucleares de sangre periférica fueron depositadas en placas de 24 pozos (SARSTEDT, NC, USA) en medio de cultivo DMEM (Biowest, EUA) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino + Penicilina/Estreptomina + Piruvato + Glutamina. Las células se estimularon con Forbol 12-miristato 14-acetato, 5 ng/ μ l (PMA Sigma Aldrich) más Ionomicina, 50 ng/ μ l (Sigma Aldrich), en donde se colocaban 5 μ L de PMA y 5 μ L de Ionomicina mezcladas perfectamente con pipeta antes de adicionarse a las células. Todo esto en presencia de BD Golgi

Stop™ (BD Biosciences), adicionado 6 horas antes de terminar el tiempo de estimulación. Al mismo tiempo se corrieron los controles de mínima intensidad de fluorescencia (FMO) y sin estímulo. Las células fueron incubadas a 37°C por 6 y 24 horas a una atmósfera al 5% de CO₂ y 70% de humedad. Transcurridas las 6 y 24 horas, las células se cosecharon de cada pozo empleando PBS 1x más EDTA 10 nM para despegar las células adheridas a la placa, esto se transfirió a tubos eppendorff de 1.5 ml preparándolos para la tinción.

Tinción del ensayo de activación de células MAIT.

Al finalizar la incubación las células se cosecharon para realizar el marcaje de marcadores de superficie, para la identificación de células MAIT (previamente descrito), se lavaron con 1 ml de buffer de tinción (PBS 1x + albúmina al 0.2%) centrifugando a 600g por 5 minutos a 10°C y decantando el sobrenadante y re-suspendiendo las células en el remanente para adicionar los anticuerpos monoclonales para moléculas de superficie (Tabla 3) y se incubó por 30 minutos protegiendo de la luz.

Terminando la incubación las células se lavaron como anteriormente se ha mencionado con 1 ml de Buffer de tinción, se re-suspendió el paquete celular en 300µl de BD Cytotfix/Citoperm™ (BD Biosciences) y se incubó por 30 minutos protegiendo de la luz; al finalizar la incubación se lavó con 300µl de BD Perm/Wash™ (BD Biosciences) al 1x, se re-suspendió el paquete celular en el volumen restante, por último se adicionaron los anticuerpos monoclonales para las citocinas intracelulares. (Tabla 4)

Para finalizar, las células, fueron adquiridas en el citómetro FACS Verse (BD, EUA) con el programa BD FACSuite Software Application.

El análisis de la intensidad media de fluorescencia para cada citocina evaluada se realizó con la ayuda del programa Flow Jo V10.5.

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales específicos para marcadores intracelulares de las células MAIT activadas.

Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución	Marca	No. Catálogo
Anti-IL-17A	PerCP-Cy5.5	1:100	BD Pharmigen	560799
Anti-IL-4	PE	1:100	BD Pharmigen	551774
Anti-IL-10	PE	1:100	BD Pharmigen	559337
Anti-IFN- γ	PE-Cy7	1:100	BD Pharmigen	557643

Consideraciones éticas.

El presente trabajo requirió de la toma de una muestra por paciente de 4 mL de sangre periférica, por lo que se considera un estudio con riesgo mayor al mínimo según la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3_2012. La toma de muestra fue realizada por el personal médico responsable, por punción venosa. La información de los pacientes fue manejada conforme a la norma de protección de datos personales y se le informo al paciente del aviso de privacidad de sujetos que participan en protocolos de investigación en el Hospital Juárez de México. Los resultados obtenidos del presente estudio no afectaron de ninguna manera la atención al paciente, responsabilidad del personal médico correspondiente.

Antes de realizar la toma de muestra, el paciente firmó una carta de consentimiento informado en la que decidió de manera voluntaria participar en el estudio, consentimiento que puede ser revocado en el momento que el paciente lo desee sin dar ninguna explicación sobre la decisión.

Análisis estadístico.

Para este estudio la información recabada se capturó en una base de datos electrónica diseñada específicamente para el mismo, el análisis se realizó con el paquete estadístico GraphPadPrism.

RESULTADOS

Células MAIT

Se analizaron 16 pacientes que ingresaron al servicio de Alergología del Hospital Juárez de México con diagnóstico inicial de asma alérgica, al igual que individuos sanos utilizados como controles (n=6) durante el periodo de julio a noviembre de 2016, los datos sociodemográficos no son mostrados en el presente trabajo. Se almacenaron en promedio dos o tres viales con aproximadamente 3×10^6 células con medio de criopreservación para su futuro análisis por Citometría de Flujo. Se logró la identificación de las células MAIT en muestras de PBMC criopreservadas mediante el inmunofenotipo de células ($CD3^+CD4^-TCRV\alpha 7.2^+CD161^+$), la estrategia de análisis se indica en la Figura 7, con una muestra representativa.

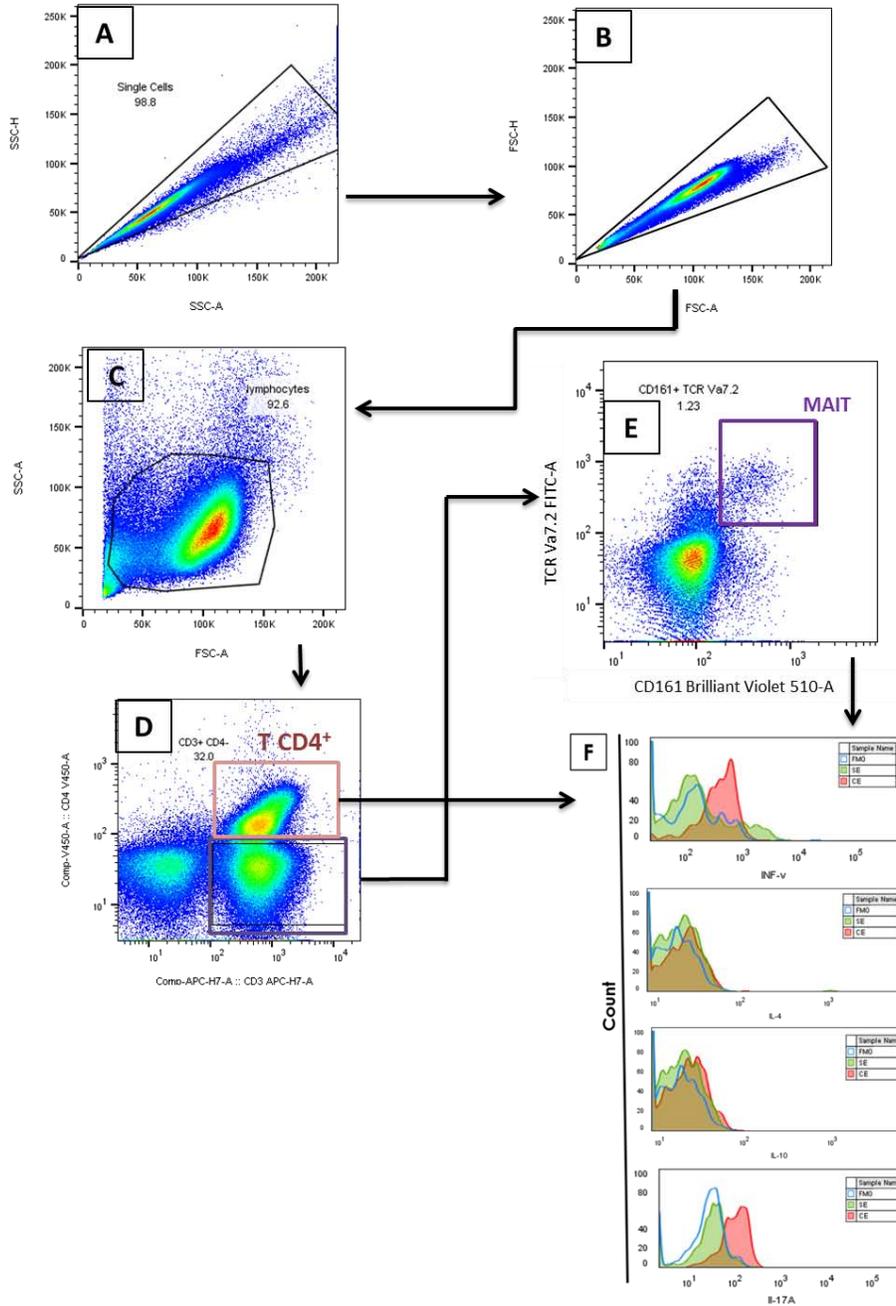


Figura 7. Estrategia para el análisis por citometría de flujo de células MAIT y Linfocitos T cooperadores. Muestras obtenidas de sangre periférica de pacientes con asma alérgica. **A)** Se selecciona el singulete con respecto a tamaño; posteriormente se selecciona **B)** singulete respecto a complejidad. De **B)** se obtiene **C)** la gráfica de complejidad contra tamaño de la cual se seleccionan los linfocitos presentes en la muestra, que posteriormente en **D)** se observan los Linfocitos T cooperadores ($CD3^+CD4^+$) y se seleccionan las células $CD3^+CD4^-$ para que finalmente **E)** se separen las células MAIT ($TCR Va7.2^+ CD161^+$). **F)** Se realiza un histograma respecto a cada citocina intracelular (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A) cuantificada para observar funcionalidad de las células MAIT y Linfocitos T cooperadores.

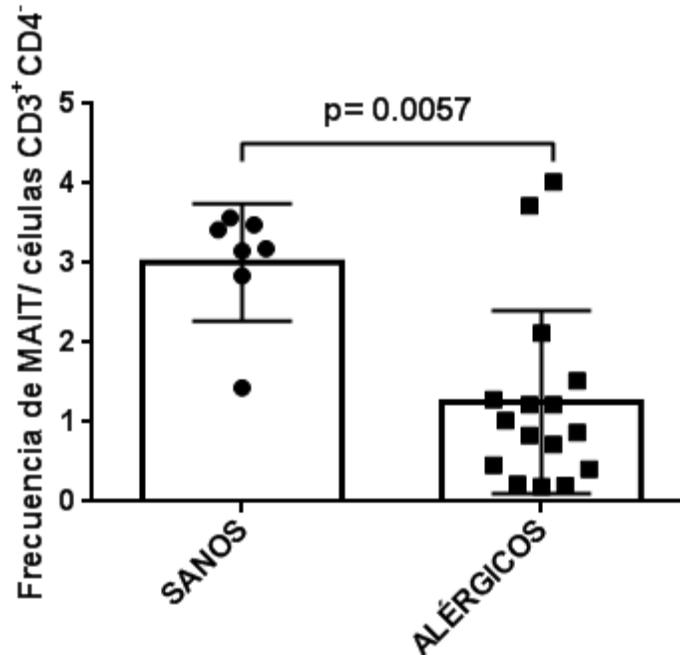


Figura 8. Frecuencia de células MAIT en estado basal en sangre periférica. Se determinó la frecuencia de las células MAIT en estado basal en mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 16 pacientes alérgicos y seis individuos sanos mediante citometría de Flujo. Se analizaron las diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba no paramétrica por un análisis de U de Mann-Withney. Se consideraron diferencias significativas con una $p \leq 0.05$.

Después de realizar la estrategia de análisis para células MAIT, se realizó un análisis de manera basal en donde se midió la frecuencia de las células MAIT con respecto a las células $CD3^+CD4^-$. Se encontró que los pacientes alérgicos muestran una disminución estadísticamente significativa ($p=0.0057$) en la frecuencia de células MAIT (Ver Figura 8) en comparación con un grupo control de voluntarios sanos.

Posteriormente se determinó el perfil de las citocinas ($IFN-\gamma$, IL-17A, IL-4 e IL-10) intracelulares en células MAIT de sangre periférica, para conocer los niveles en los que se encuentran estas citocinas en un estado basal tanto de los individuos sanos como de los pacientes alérgicos.

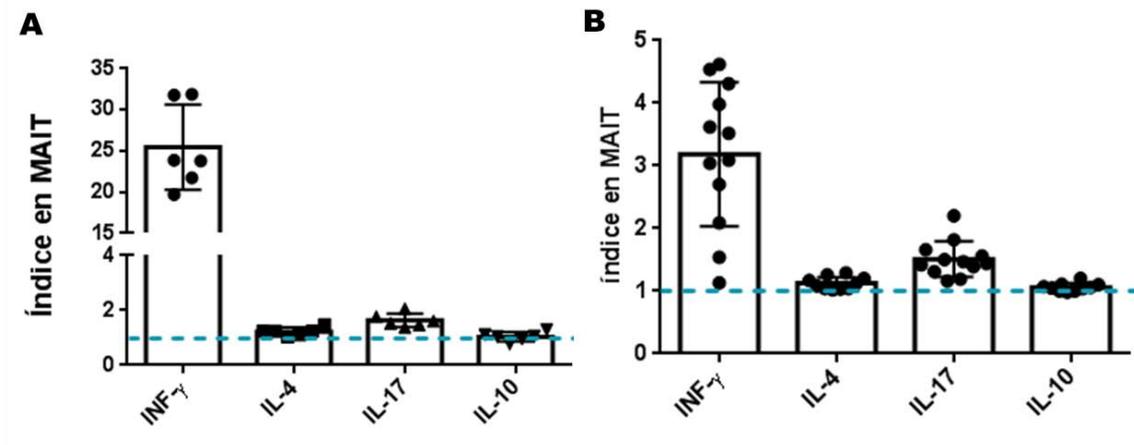


Figura 9. Perfil de citocinas en células MAIT en estado basal de A) individuos sanos, B) pacientes alérgicos. Se determinó el índice de fluorescencia para las citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-4 e IL-10 intracelulares en las células MAIT mediante Citometría de Flujo. El índice respectivo fue calculado mediante la intensidad media de fluorescencia (IMF) del fluorocromo respectivo de cada citocina entre fluorescencia menos uno de control (FMO).

En cuanto al estado basal de activación de células MAIT en individuos sanos (Ver Figura 9A) podemos observar que presentan niveles altos de la citocina IFN- γ y un ligero aumento de la citocina IL-17, algo que no se presenta con la IL-4 e IL-10.

Como anteriormente se mencionó, existe una frecuencia menor de células MAIT en pacientes alérgicos en comparación con los individuos sanos. En estado basal de activación, las células MAIT de los pacientes alérgicos (Ver Figura 9B) presenta un índice mayor de IFN- γ seguido en menor cantidad de la IL-17.

A continuación se determinó el porcentaje de las células MAIT sin estímulo que eran productoras de las diferentes citocinas por analizar a las 6 h y 24 h, IFN- γ e IL-17A y para IL-4 e IL-10, respectivamente, en pacientes alérgicos (n=16) y en un grupo de individuos sanos (n=6).

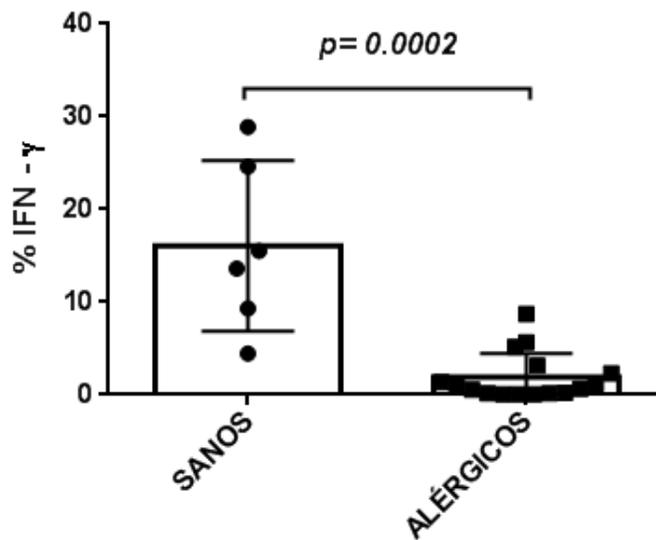


Figura 10. Porcentaje de células MAIT productoras de IFN- γ en pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la frecuencia de células positivas para la presencia de IFN- γ de forma intracelular en células $CD3^+ CD4^- CD161^+ TCRV\alpha 7.2^+$ (MAIT) en sangre periférica de pacientes alérgicos (n=16) y un grupo de sujetos sanos (n= 6) mediante citometria de flujo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba de Mann-Whithney. Se consideraron diferencia significativas con una $p \leq 0.05$

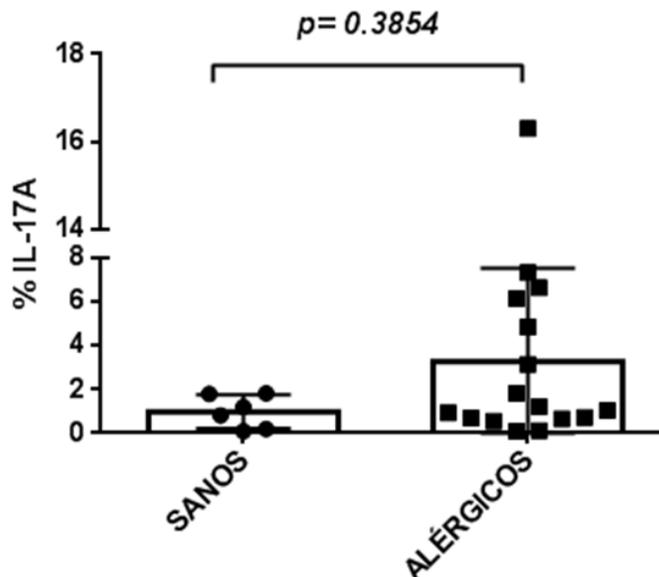


Figura 11. Porcentaje de células MAIT productoras de IL-17 en pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la frecuencia de células positivas para la presencia de IL-17 de forma intracelular en células $CD3^+ CD4^- CD161^+ TCRV\alpha 7.2^+$ (MAIT) en sangre periférica de pacientes alérgicos (n=16) y un grupo de sujetos sanos (n= 6) mediante citometria de flujo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba de Mann-Whithney. Se consideraron diferencia significativas con una $p \leq 0.05$

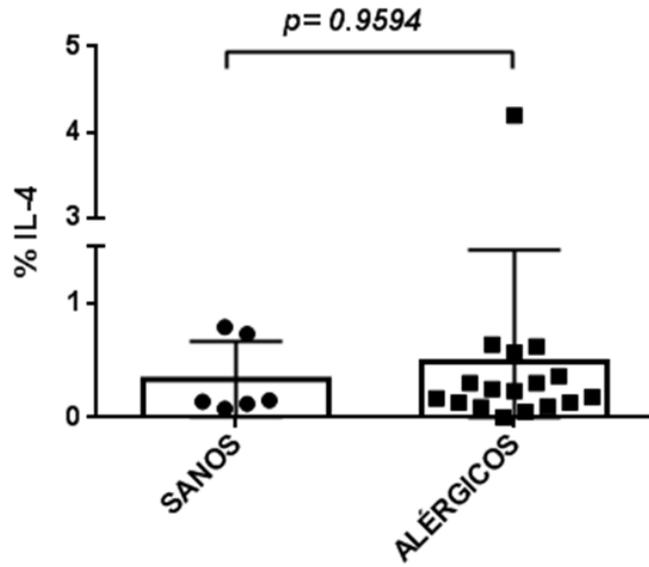


Figura 12. Porcentaje de células MAIT productoras de IL-4 en pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la frecuencia de células positivas para la presencia de IL-4 de forma intracelular en células CD3⁺ CD4⁺ CD161⁺ TCRV α 7.2⁺ (MAIT) en sangre periférica de pacientes alérgicos (n=16) y un grupo de sujetos sanos (n= 6) mediante citometria de flujo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba de Mann-Whithney. Se consideraron diferencia significativas con una p \leq 0.05

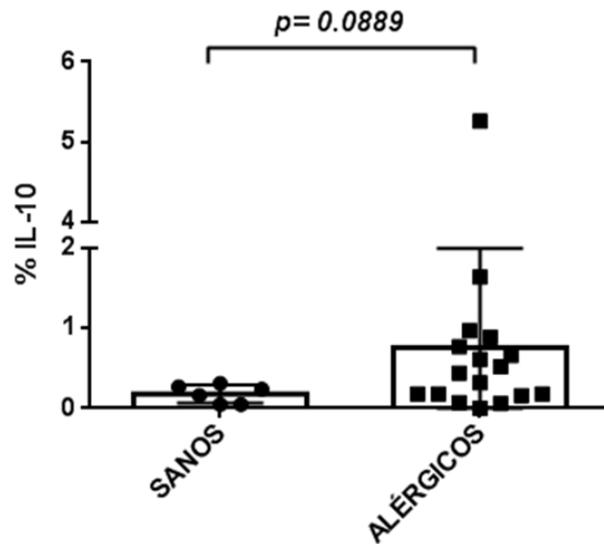


Figura 13. Porcentaje de células MAIT productoras de IL-10 en pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la frecuencia de células positivas para la presencia de IL-10 de forma intracelular en células CD3⁺ CD4⁺ CD161⁺ TCRV α 7.2⁺ (MAIT) en sangre periférica de pacientes alérgicos (n=16) y un grupo de sujetos sanos (n= 6) mediante citometria de flujo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba de Mann-Whithney. Se consideraron diferencia significativas con una p \leq 0.05

Se encontró que el porcentaje de células MAIT de los individuos sanos productoras de IFN- γ es mayor en comparación con los pacientes alérgicos (Ver Figura 10), presentando diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0002$).

Mientras que para las células MAIT productoras de IL-17A (Ver Figura 11), IL-4 (Ver Figura 12) e IL-10 (Ver Figura 13) se observa tendencia a un aumento en los pacientes alérgicos en comparación con los sanos, sin observar alguna diferencia significativa entre ellos ($p=0.3854$, $p=0.9594$ y $p=0.0889$, respectivamente).

Producción de citocinas en células MAIT después de estar sometidas a un estímulo policlonal (PMA/Ionomicina).

Se realizó un índice normalizado de la Intensidad Geométrica de Fluorescencia (IGF), mediante un cociente calculado de la siguiente manera: IGF de las células MAIT estimuladas policlonalmente (PMA + Ionomicina) entre el IGF de las células MAIT Sin Estímulo (Figura 14.)

Como resultado fue posible apreciar que las células MAIT de los individuos sanos para el caso de la citocina IFN- γ tienen la capacidad de seguir produciendo esta citocina después de estar sometidos al estímulo policlonal (Figura 14A), en cambio las células MAIT de los pacientes alérgicos ya no tienen la habilidad de seguir produciendo más IFN- γ ($p=0.0020$), lo mismo se observa para la citocina IL-10 (Ver Figura 14D) la cual presenta una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.0005$.

Para el caso de la citocina IL-4 (Figura 14B) la diferencia en la producción de esta citocina no es tan marcada como en los casos anteriores pero si se observa que las células MAIT de los individuos sanos son capaces de producir más IL-4 después de estar sometidas al estímulo policlonal en comparación con los pacientes alérgicos, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.0312$.

Para la citocina IL-17A (Figura 14C), aunque es posible apreciar que tanto en individuos sanos como en pacientes alérgicos se sigue produciendo esta citocina en menores cantidades después del estímulo, la cantidad producida no es estadísticamente significativa ($p=0.2905$).

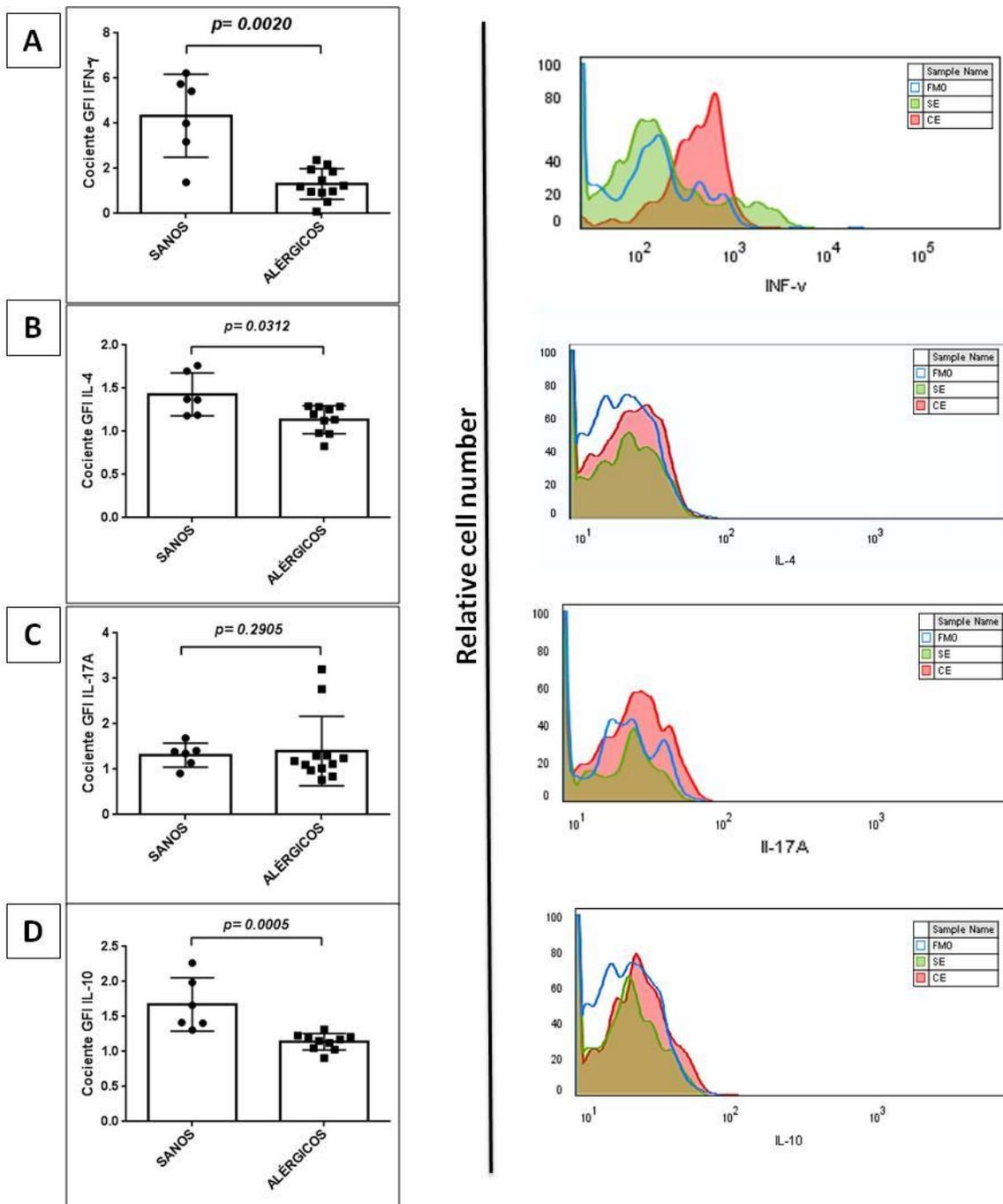


Figura 14. Activación de células MAIT de sangre periférica de pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la Intesidad Geométrica de Fluorescencia para IFN- γ (A), IL-4(B), IL-17(C), IL-10(D) de forma intracelular en las células MAIT después de 6 horas para el caso de IFN- γ e IL-17A y 24 horas para el caso de IL-4 e IL-10, luego de un estímulo policlonal (PMA-Ionomicina), mediante citometría de flujo multiparamétrica. El índice normalizado de IGF para cada citocina fue determinado mediante la IGF de las células estimuladas con el activador policlonal entre las células que no fueron estimuladas. A la derecha se muestra un histograma representativo de la producción de cada citocina. Diferencias entre los grupo se determinaron mediante la prueba estadística T de student. Se consideró $p \leq 0.05$ como significativa.

LINFOCITOS T cooperadores (T CD4+)

En la misma estrategia de análisis de donde fue posible separar las células MAIT, se separaron los Linfocitos T cooperadores (T CD4⁺) (Ver Figura 7D) y de la misma manera se determinó el porcentaje de estas células sin estimulación, que eran productoras de las diferentes citocinas por analizar a las 6 h y 24 h, IFN- γ e IL-17A y para IL-4 e IL-10 respectivamente, en pacientes alérgicos (n=16) y en un grupo de individuos sanos (n=6).

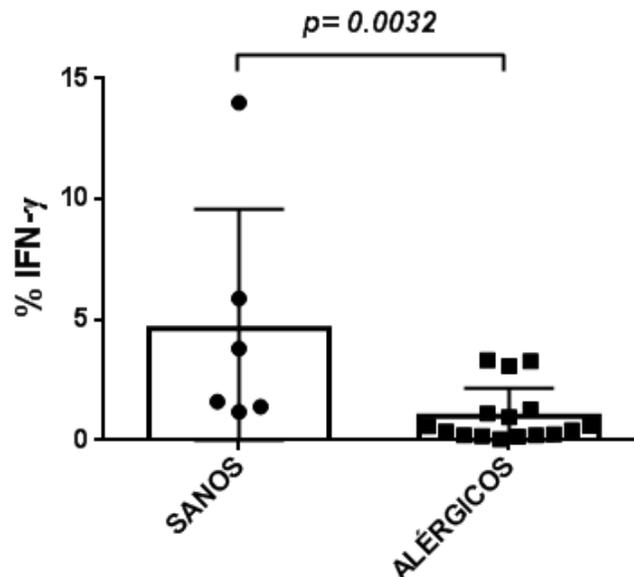


Figura 15. Porcentaje de células T CD4⁺ (cooperadoras) productoras de IFN- γ en pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la frecuencia de células positivas para la presencia de IFN- γ de forma intracelular en células CD4⁺ en sangre periférica de pacientes alérgicos (n=16) y un grupo de sujetos sanos (n= 6) mediante citometría de flujo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba de Mann-Whitney. Se consideraron diferencia significativas con una $p \leq 0.05$.

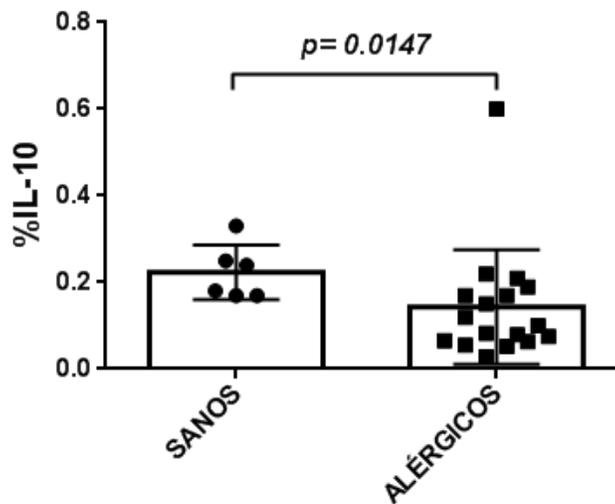


Figura 18. Porcentaje de células T CD4+ (cooperadoras) productoras de IL-10 en pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la frecuencia de células positivas para la presencia de IL-10 de forma intracelular en células CD4+ en sangre periférica de pacientes alérgicos (n=16) y un grupo de sujetos sanos (n= 6) mediante citometría de flujo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba de Mann-Whithney. Se consideraron diferencia significativas con una $p \leq 0.05$.

Se encontró que el porcentaje de células T CD4+ productoras de IFN- γ es mayor en individuos sanos en comparación con los pacientes alérgicos (Ver Figura 15) mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0032$).

Para el caso del porcentaje de Linfocitos T cooperadores productores de IL-17A (Figura 16) se observa una tendencia a mayor producción en los pacientes alérgicos pero no existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0.4157$) en comparación con el porcentaje de células productoras en individuos sanos. Algo que también se pudo observar para el porcentaje de células TCD4+ productoras de IL-4 ($p=0.7982$) (Ver figura 17).

En cuanto al porcentaje de células T CD4+ productoras de IL-10 (Ver Figura 18) en individuos sanos es mayor ($p=0.0147$) en comparación con el porcentaje de células T CD4+ productoras de esta citocina en pacientes alérgicos.

Producción de citocinas en Linfocitos T cooperadores (T CD4+) de sangre periférica después de estar sometidos a un estímulo policlonal (PMA/Ionomicina)

Se realizó un índice normalizado de la Intensidad Geométrica de Fluorescencia, mediante un cociente calculado de la siguiente manera: Linfocitos T cooperadores estimulados policlonalmente (PMA + Ionomicina) entre los Linfocitos T cooperadores Sin Estímulo. (Figura 19.)

En el presente análisis se logró observar que las células T CD4⁺ de los individuos sanos son capaces de seguir produciendo IFN- γ después del estímulo policlonal (Ver Figura 19A), algo que las células T CD4⁺ de los pacientes alérgicos no pueden hacer o lo hacen en cantidades poco apreciables ($p=0.0009$). Lo mismo sucede con la producción de las citocinas IL-4 ($p<0.0001$) e IL-10 ($p<0.0001$) (Ver Figura 19B y 19D respectivamente).

En el caso de la citocina IL-17A (Ver Figura 19C), las células T cooperadoras tanto de los individuos sanos como de los pacientes alérgicos tienen la habilidad de seguir produciendo esta citocina pero en cantidades poco apreciables después de estar sometidos a estimulación, no se observa diferencia estadísticamente significativa ($p>0.9999$).

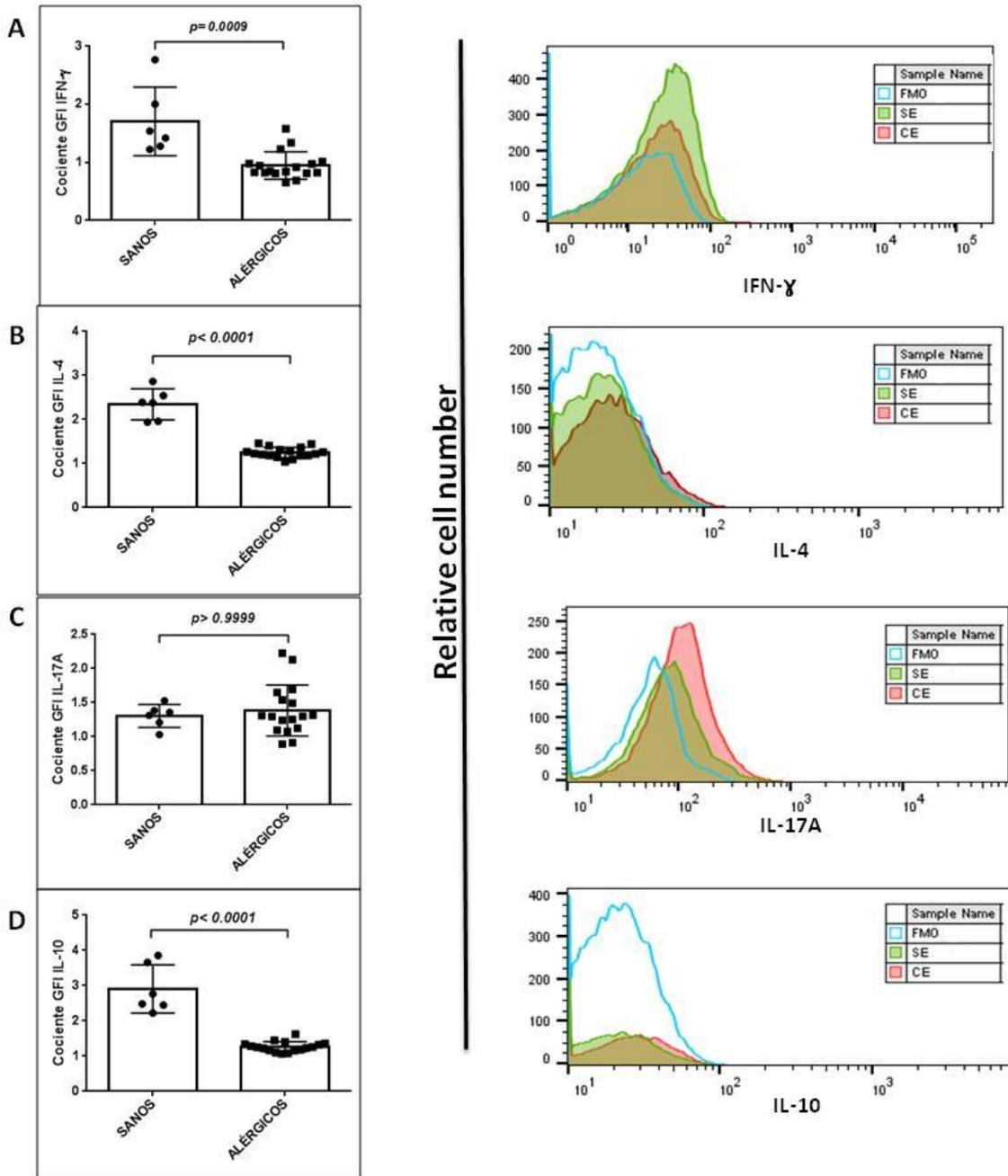


Figura 19. Activación de células T CD4+ de sangre periférica de pacientes alérgicos e individuos sanos. Se determinó la Intesidad Geométrica de Fluorescencia para IFN- γ (A), IL-4(B), IL-17(C), IL-10(D) de forma intracelular en las células TCD4+ después de 6 horas para el caso de IFN- γ e IL-17A y 24 horas para el caso de IL-4 e IL-10, luego de un estímulo policlonal (PMA-Ionomicina), mediante citometría de flujo multiparamétrica. El índice normalizado de IGF para cada citocina fue determinado mediante la IGF de las células estimuladas con el activador policlonal entre las células que no fueron estimuladas. A la derecha se muestra un histograma representativo de la producción de cada citocina. Diferencias entre los grupo se determinaron mediante la prueba estadística T de student. Se consideró $p \leq 0.05$ como significativa.

DISCUSIÓN.

Se han descrito a las células MAIT como un grupo relativamente nuevo de células pertenecientes a la respuesta inmune innata, capaces de participar en la respuesta inmunitaria, esto a través de la producción de citocinas tales como IFN- γ , TNF- α , IL-17, entre otras; su notable presencia en enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas despertó gran interés por estudiar y elucidar su participación en dichos padecimientos. Por tanto, debido a que el asma alérgica se caracteriza por una inflamación crónica de las vías respiratorias [2], siendo la entidad crónica más frecuente en la infancia, y que con el paso del tiempo tanto su prevalencia como gravedad van en aumento, ocasionando un impacto negativo en la calidad de vida de las personas que la padecen [4] en el presente trabajo se buscó estudiar este padecimiento con la participación de las células MAIT en el mismo.

Se estudió la frecuencia de las células MAIT y su funcionalidad en pacientes alérgicos no tratados, se estableció como estrategia del estudio, emplear pacientes con asma alérgica los cuales no estuvieran recibiendo ningún tipo de tratamiento, para permitir examinar el estado del sistema inmunitario de los pacientes, sin confundir los resultados con la influencia de algún tratamiento. Por tanto, el grupo de estudio se separó en dos partes: los sujetos sanos (controles) individuos que no presentaran ningún tipo de diagnóstico de alguna enfermedad alérgica, y pacientes con algún tipo de enfermedad alérgica proveniente de la Clínica de Alergia del Hospital Juárez de México.

Las células MAIT son caracterizadas por la expresión de TCR V α 7.2⁺ y de CD161⁺ en su superficie.[4] Estas células adquieren su fenotipo de memoria antes del nacimiento y por tanto, antes de la exposición a microorganismos. Para realizar una caracterización adecuada de las células MAIT en el estudio, se colocaron anticuerpos acoplados a fluorocromos tales como Anti-CD161, Anti-TCRV α 7.2, Anti-CD3, Anti-CD4, permitiendo la identificación de las células MAIT con el inmunofenotipo, CD3⁺CD4⁻TCRV α 7.2⁺CD161⁺ y gracias a ello fue posible evaluar la frecuencia de células MAIT. (Figura 7)

En estudios previos se ha observado un número reducido de la frecuencia de células MAIT en sangre periférica de pacientes alérgicos no tratados, indicando que se encontraba relacionado con la severidad de la enfermedad alérgica; además de reducir la frecuencia de otro conjunto de células tales como las células T reguladores (Treg) [2] pero no así la frecuencia de otros subconjuntos de células T (células Th2, Th17) presentes en pacientes asmáticos graves, algo que no se observaba en individuos sanos. [57] De la misma manera se ha mencionado que la frecuencia de las células MAIT en pacientes con enfermedades inflamatorias como colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, se ve disminuida en comparación con sujetos sanos [58]. Lo cual concuerda con nuestro estudio donde se observó una disminución en sangre periférica de las células MAIT con respecto a las células con inmunofenotipo $CD3^+CD4^-$ (Ver Figura 8) en pacientes con asma alérgica en comparación con individuos sanos, con lo cual podemos constatar que la disminución de las células puede deberse al estado de inflamación crónico al cual se encuentran sometidos los pacientes.

Posteriormente se realizó un análisis del estado basal de las células MAIT analizando el perfil de las citocinas, tanto en pacientes alérgicos como en individuos sanos, (Figura 9.) fue posible apreciar un índice alto de la citocina IFN- γ tanto en sanos como en alérgicos, habiendo mayor frecuencia de células MAIT en individuos sanos.

Para comprobar y complementar lo anterior se realizó el porcentaje de células MAIT no estimuladas capaces de producir las citocinas INF- γ , IL-17, IL-4 e IL-10 (Ver de la figura 10 a la 13) donde podemos apreciar que el porcentaje de células MAIT productoras de IFN- γ es mayor en individuos sanos en comparación con pacientes alérgicos, algo que no se observa para las demás citocinas, ya que sólo es apreciable la tendencia a un aumento en los pacientes alérgicos de las células MAIT productoras de las citocinas antes mencionadas, pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

Por tanto podemos decir que a pesar que en la figura 9 se puede observar un índice similar de la citocina IFN- γ tanto en alérgicos como en sanos, en la figura 10 se muestra que el porcentaje de células MAIT productoras de la citocina mencionada es considerablemente mayor en sanos que en alérgicos.

Además de conocer el perfil de las citocinas, tanto en individuos alérgicos como en sanos, necesitábamos observar cómo era la función que realizaban las células MAIT en estos individuos, por tanto, para determinar la funcionalidad de las células MAIT, se evaluó la capacidad de respuesta de las mismas ante un estímulo policlonal (PMA/Ionomicina). Los resultados de la figura 14 nos muestran que la producción de la citocina IFN- γ (Figura 14A) es mayor en individuos sanos en comparación con los alérgicos después de estar sometidos al estímulo policlonal, de modo que podemos decir que los alérgicos ya no cuentan con la capacidad de producir esta citocina, aún después de someterlo a algún estímulo, algo que no sería benéfico para el paciente, ya que necesita contrarrestar la respuesta inflamatoria (respuesta tipo Th2) a la que se encuentra sometido y una alternativa de hacerlo sería a través de esta citocina. El mismo patrón se presenta para la IL-10 (Figura 14D), donde se muestra que existe mayor producción de la misma en individuos sanos no así para los alérgicos después de someterlos a estimulación, algo que no resulta favorable para los alérgicos ya que esta citocina cumple una función antiinflamatoria que sería muy útil para reducir el estado de inflamación crónica en la que se encuentra el paciente. Asimismo podemos decir que la producción de la citocina IL-4 (Figura 14B) es mayor en individuos sanos que en alérgicos, algo que pudiera ser favorecedor para el paciente, ya que ésta es una de las citocinas responsables del estado inflamatorio en alérgicos. Mientras que para IL-17A (Figura 14 C) es posible percibir que la citocina se sigue produciendo aunque en menores cantidades después del estímulo policlonal tanto en alérgicos como en sanos, la cantidad producida no es estadísticamente significativa.

Como segundo aspecto que se estudió en el presente trabajo, se analizaron las células TCD4⁺, en las cuales se empleó la misma estrategia de análisis que para las células MAIT (Ver figura 7D) que posteriormente nos sirvió para determinar el porcentaje de linfocitos T cooperadores productores de las diferentes citocinas tanto en individuos sanos como en pacientes alérgicos.

Los resultados presentados en la figura 15 nos muestran que el porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ es mayor en los individuos sanos comparadas con los pacientes alérgicos, tal como sucede con el porcentaje de las células T CD4⁺ productoras de IL-10 (Ver figura 18). Mientras que para el porcentaje de los linfocitos T cooperadores productores de las citocinas IL-17A (Figura 16) e IL-4 (Figura 17) se presenta una tendencia a mayor producción en pacientes alérgicos, sin embargo no hay diferencia significativa entre alérgicos y sanos.

A continuación se llevó a cabo el índice normalizado de los linfocitos T cooperadores, que como anteriormente se explicó, el mismo se determinó a través de la IGF de los linfocitos T CD4⁺ estimulados policlonalmente entre los no estimulados, para que de esta manera pudiéramos saber si las células T CD4⁺ tanto de alérgicos como de sanos eran capaces de seguir produciendo las citocinas después de estar sometidos a un estímulo policlonal.

Los resultados mostrados en la figura 19A nos presentan que las células de los individuos sanos sí son capaces de seguir produciendo la citocina IFN- γ después del estímulo con PMA/Ionomicina algo que las células de los alérgicos ya no pueden realizar y que resulta perjudicial para el paciente, ya que esta citocina podría aminorar el daño que está causando la respuesta tipo Th2 en el alérgico. En el caso de la IL-4 (Figura 19B) se observa que se sigue produciendo en los individuos sanos después del estímulo, algo que no se observó en los alérgicos, esto nos puede decir que los pacientes no se encontraban con el asma alérgico activo, porque de lo contrario se vería mayor producción en estos individuos y no en los sanos. Sin embargo, la producción de la citocina IL-17A (Figura 19C) por

las células T cooperadoras tanto de los individuos sanos como de los pacientes alérgicos tienen la habilidad de seguir después de estar sometidos a estimulación, pero es poco apreciable y no se observa diferencia estadísticamente significativa. Por último, las células T cooperadoras de los individuos sanos son capaces de seguir produciendo IL-10 (Figura 19D) aún después de estar sometidas a estimulación, algo que no se observa para los pacientes alérgicos, esto podría estar afectando a las células T reguladoras disminuyendo su número y por tanto su actividad, pudiendo provocar algún mecanismo autorreactivo y seguir perjudicando al paciente alérgico.

CONCLUSIÓN.

Fue posible establecer una estrategia de análisis para identificar células MAIT en mononucleares de sangre periférica de pacientes con asma alérgica mediante el inmunofenotipo de células CD3⁺CD4⁺TCRV α 7.2⁺CD161⁺.

Los pacientes alérgicos tienen menor proporción de células MAIT en sangre periférica con respecto a individuos clínicamente sanos. Estas células son productoras de IFN- γ en estado basal, no obstante al ser activadas con un estímulo policlonal no son capaces de producir más citocinas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud. [sede Web]. Centro de prensa; 2017. [actualizada Abril 2017; acceso 12 de diciembre de 2018]. Asma: nota descriptiva. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/es>
- [2] Arakawa H, Hamasaki Y, Kohno Y, Ebisawa M, Kondo N, Nishima S, et al. The Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology. Japanese guidelines for childhood asthma 2017. 2016: 1-15.
- [3] Alizadeh Z, Mortaz E, Adcock I, Moin M. Role of Epigenetics in the Pathogenesis of Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2017;16(2):82-91.
- [4] Mancilla Hernández E, Medina Ávalos MA, Barnica Alvarado RH, Soto Candia D, Guerrero Venegas R, ZecuaNájera Y. Prevalence of asthma and determination of symptoms as risk indicators. *Revista Alergia México.* 2015; 62: 271-278.
- [5] Timothy SC, Hinks MD, Xiaoying Z, Staples KJ, Borislav D. et al. Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: Relationship to severity and disease mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:323-333.
- [6] Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ,* 2009;181:(9).
- [7] Loftus PA, Wise SK. Epidemiology of asthma. Wolters Kluwer Health, Inc. 2016;24: 3.
- [8] Holgate ST. Pathogenesis of Asthma. *Clinical and Experimental Allergy.* 2008;38: 872–897.
- [9] Beasley R, Pekkanen J, Pearce, N. Has the role of atopy in the development of asthma been over-emphasized. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 2001; 23: 149–50.
- [10] Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global Initiative for Asthma Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA. Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004; 59:469–478.
- [11] Moorman JE, Akinbami LJ, Bailey CM, et al. National surveillance of asthma: United States 2001–2010. *Vital Health Stat.* 2012; 3:1–58.
- [12] The Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Definition and Overview; 2006; 2-13.
- [13] Braman SS. The global burden of asthma. *Chest.* 2006; 30 Suppl 1: 45-125.

- [14] del Río NBE, Hidalgo CEM, Sienra MJJL, et al. Asthma. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2009; 66: 3-33.
- [15] Neffen H, Baena-Cagnani C. Asthma mortality in Latin America. *ACI International.* 1999; 11: 171-5.
- [16] Cid Del Prado ML, Piedras Gutiérrez B, Visoso Salgado Á, BecerrilÁngeles M. Aerobiological study of anemophilous pollens in the city of Toluca, Mexico. *RevAlergMex.* 2015;62(1):8-14.
- [17] Salas Hernández J, Fernández Vega M, Almeida Arvizu VM. Clasificación del asma. *NEUMOLOGÍA Y CIRUGÍA DE TÓRAX.* 2009; S2:68.
- [18] Kay, A.B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 11.2005; 148–52.
- [19] Ishimori A, Harada N, Chiba A, Harada S, Matsuno K, Makino F, et al. Circulating activated innate lymphoid cells and mucosal-associated invariant T cells are associated with airflow limitation in patients with asthma. *AllergologyInternational.* 2016; 30: 1-8.
- [20] Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy ClinImmunol.* 2006; 118: 331–336.
- [21] Riese RJ, Chapman HA. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *CurrOpinImmunol.* 2000; 12: 107–113.
- [22] Chiba, A., et al. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(1):153-61.
- [23] Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z, et al. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J Exp Med.* 2013; 210: 2305–2320.
- [24] Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, Guihot A, Froux N, Coré M et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 2010; 11: 701–708.

- [25] Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delepine J, et al. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* 2010; 8: e1000407.
- [26] Wong EB, Ndung'u T, Kasprowicz VO. The role of mucosal-associated invariant T cells infectious diseases. *Immunology.*2016; 150: 45–54.
- [27] Kjer Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature.*2012; 491: 717–723.
- [28] McWilliam HEG, Eckle SBG, Theodossis A, Liu L, Chen Z, Wubben JM, et al. The intracellular pathway for the presentation of vitamin B-related antigens by the antigen-presenting molecule MR1. *Nat Immunol.* 2016; 5: 531–517.
- [29] Eckle SBG, Birkinshaw RW, Kostenko L, Corbett AJ, McWilliam HEG, Reantragoon R, et al. A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells. *J Exp Med.* 2014; 211: 1585–1600.
- [30] Harriff MJ, Karamooz E, Burr A, Grant WF, Canfield ET, Sorensen ML, et al. Endosomal MR1 trafficking plays a key role in presentation of mycobacterium tuberculosis ligands to MAIT cells. *PLoSPathog.* 2016; 12: e1005524.
- [31] Ussher JE, Van Wilgenburg B, Hannaway RF, Ruustal K, Phalora P, Kurioka A, et al. TLR signalling in human antigen-presenting cells regulates MR1-dependent activation of MAIT cells. *Eur J Immunol.*2016; 46: 1600–1614.
- [32] Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Péguillet I, Premel V, Louis D. et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood.*2011; 117: 1250–1259.
- [33] Leeansyah E, Loh L, Nixon DF, Sandberg JK. Acquisition of innate-like microbial reactivity in mucosal tissues during human fetal MAIT-cell development. *Nat Commun.*2014; 5: 3143.
- [34] Ayako Kurioka, Lucy J Walker, Paul Klenerman, Christian B Willberg et al. MAIT cells: new guardians of the liver. *Clinical & Translational Immunology.* 2016;5(8): e98.

- [35] Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, Bessoles S, Venteclef N, Kiaf B, et al. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest.* 2015; 125: 1752–1762.
- [36] Serriari N-E, Eoche M, Lamotte L, Lion J, Fumery M, Marcelo P et al. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *ClinExpImmunol.* 2014; 176: 266–274.
- [37] Cosgrove C, Ussher JE, Rauch A, Gärtner K, Kurioka A, Hühn MH, et al. Early and nonreversible decrease of CD161⁺⁺/MAIT cells in HIV infection. *Blood.* 2013;121: 951–961.
- [38] Fergusson JR, Hühn MH, Swadling L, Walker LJ, Kurioka A, Llibre A, et al. CD161(int) CD8⁺ T cells: a novel population of highly functional, memory CD8⁺ T cells enriched within the gut. *Mucosal Immunol.* 2015; 9: 401–413.
- [39] Kenna T, Golden Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, et al. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol* 2003; 171: 1775–1779.
- [40] Jo J, Tan AT, Ussher JE, Sandalova E, Tang X-Z, Tan-Garcia A, et al. Toll-like receptor 8 agonist and bacteria trigger potent activation of innate immune cells in human liver. *PLoSPathog.* 2014; 10: e1004210.
- [41] Ussher JE, Bilton M, Attwod E, Shadwell J, Richardson R, De Lara C et al. CD161⁺⁺ CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12⁺ IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol* 2014; 44: 195–203.
- [42] Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Péguillet I, Premel V, Louis D, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161^{hi} IL-17-secreting T cells. *Blood.* 2011; 117: 1250–1259.
- [43] Billerbeck E, Kang YH, Walker LJ, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8⁺ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl AcadSci USA.* 2010; 107: 3006–3011.
- [44] Walker LJ, Kang YH, Smith MO, Tharmalingham H, Ramamurthy N, Fleming VM, et al. Human MAIT and CD8 α cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8⁺ T cells. *Blood.* 2012; 119: 422–433.

- [45] Tang X, Jo J, Tan AT, Sandalova E, Chia A, Tan KC, et al. IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosal-associated invariant T cells. *J Immunol* 2013; 190: 3142–3152.
- [46] Chua WJ, Truscott SM, Eickhoff CS, Blazevic A, Hoft DF, Hansen TH. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect Immun* 2012; 80: 3256–3267.
- [47] Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, Guihot A, Froux N, Coré M et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 2010; 11: 701–708.
- [48] Kawachi I, Maldonado J, Strader C, Gilfillan S. MR1-restricted V alpha 19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol*.2006; 176: 1618–1627.
- [49] Rahimpour A, Koay HF, Enders A, Clanchy R, Eckle SBG, Meehan B, et al. Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J Exp Med*. 2015; 212: 1095–1108.
- [50] Kurioka A, Ussher JE, Cosgrove C, Clough C, Fergusson JR, Smith K, et al. MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunol* 2015; 8: 429 -440.
- [51] Dias J, Sobkowiak MJ, Sandberg JK, Leeansyah E. Human MAIT-cell responses to *Escherichia coli*: activation, cytokine production, proliferation, and cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. 2016; 100: 233 -240.
- [52] Meierovics A, Yankelevich WC, Cowley SC. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc Natl AcadSci USA*. 2013; 110: E3119–E3128.
- [53] Gérard S, Sibénil S, Martin E, Lenoir C, Aguilar C, Lantz O et al. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood*.2013; 121: 614–623.

[54] Meierovics A, Yankelevich WC, Cowley SC. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc Natl AcadSciUSA*. 2013; 110: E3119–E3128.

[55] Gapin, L. Check MAIT. *J Immunol*, 2014; 192(10): p. 4475-80.

[56] Serriari, N.E., et al., Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *ClinExpImmunol*, 2014. 176(2): 266-74.

[57] Croisant S. Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease. *AdvExp Med Biol*. 2014; 795:17–29.

[58] Corbett AJ, Eckle SBG, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, et al. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature*.2014; 509: 361–365.

ANEXOS

ANEXO 1. Producción de citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10 en células MAIT de sangre periférica de individuos sanos y pacientes alérgicos antes y después de estar sometidas a estimulación (PMA/Ionomicina) con sus respectivos histogramas.

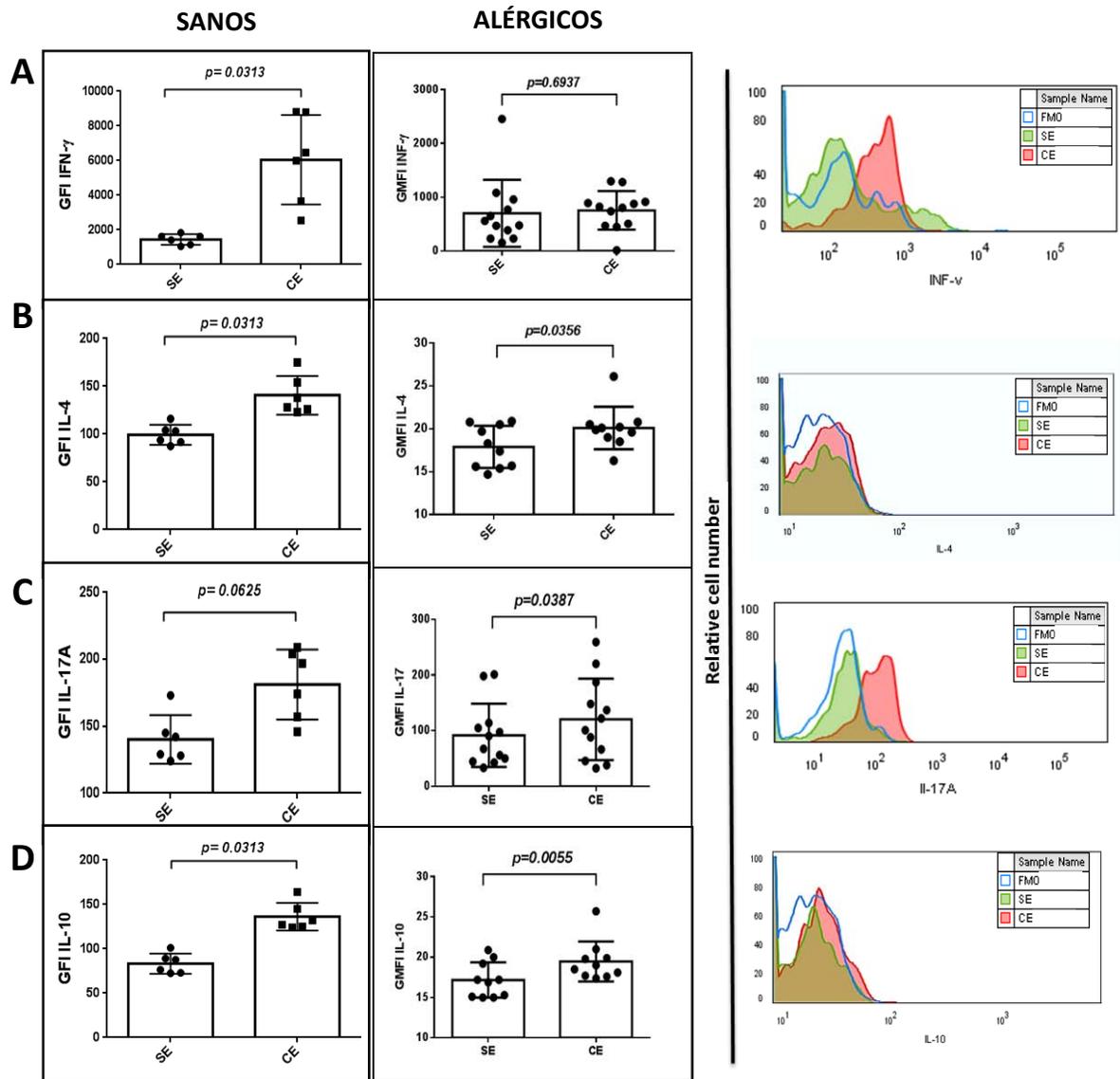


Figura 20. Activación de células MAIT de pacientes alérgicos Se analizó la presencia de IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10 intracelular en células MAIT en los pacientes con asma y rinitis alérgica. 2×10^5 PBMC fueron estimuladas con PMA+Ionomicina, después de 6 y 24 horas se analizó la presencia de la citocina respectiva en las células MAIT mediante citometría de flujo multiparamétrica, se reporta la intensidad media de fluorescencia geométrica de la citocina respectiva. **A)** GMFI de IFN- γ , **B)** GMFI de IL-4, **C)** GMFI de IL-17A y **D)** GMFI de IL-10. A la derecha se muestra un histograma representativo de la producción de cada citocina. Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante la prueba pareada de Wilcoxon, valores de p son mostrados en las gráficas. Se consideró $p \leq 0.05$ como significativa.

ANEXO 2. Producción de citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10 en células T cooperadoras (T CD4⁺) de sangre periférica de individuos sanos y pacientes alérgicos, antes y después de estar sometidas a estimulación (PMA/Ionomicina), con sus respectivos histogramas.

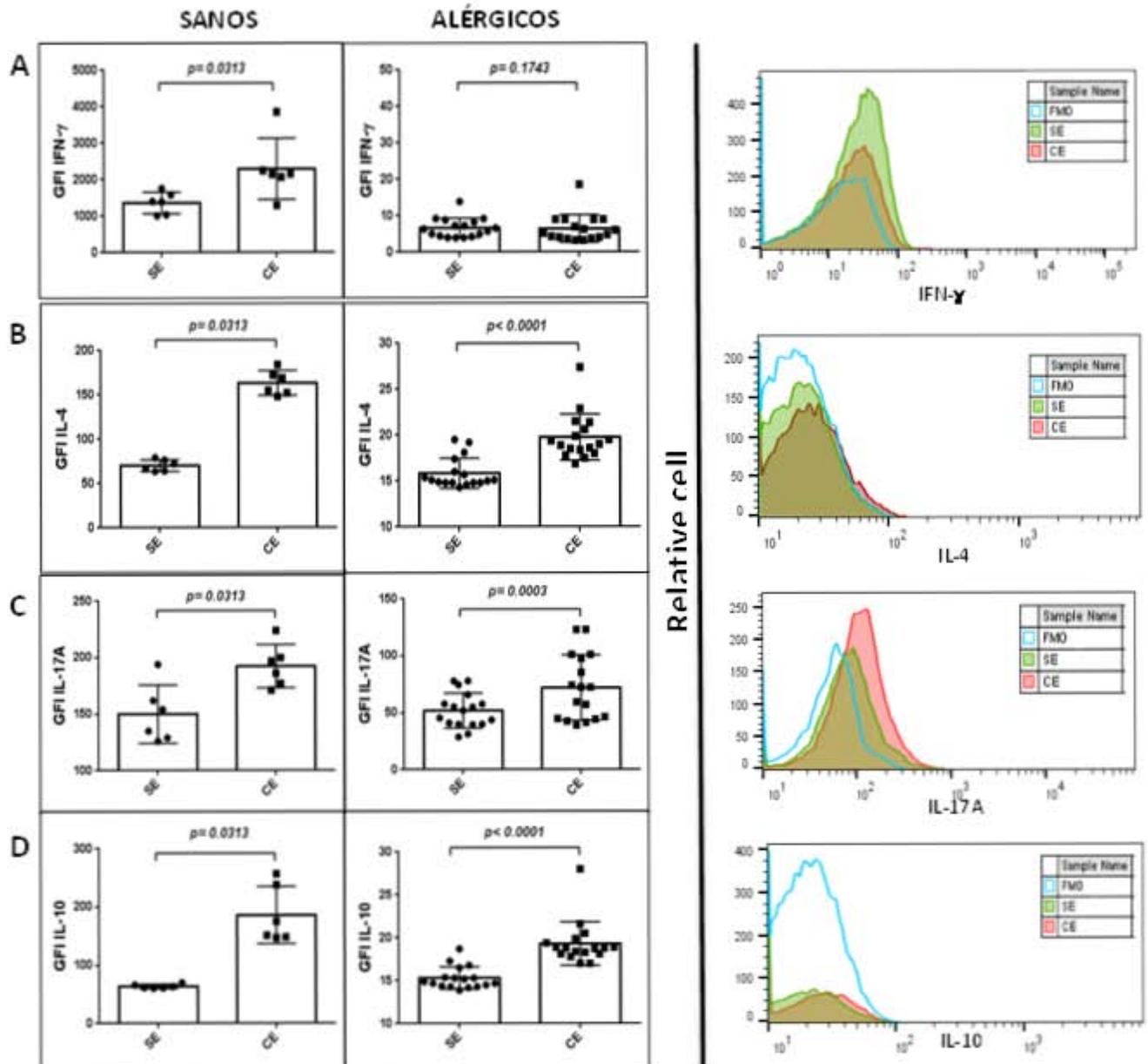


Figura 21. Activación de Linfocitos T CD4⁺ de pacientes alérgicos e individuos sanos. Se analizó la presencia de IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10 intracelular en células T CD4⁺ en los pacientes con asma y rinitis alérgica. 2 x10⁵ PBMC fueron estimuladas con PMA+Ionomicina, después de 6 y 24 horas se analizó la presencia de la citocina respectiva en las células MAIT mediante citometría de flujo multiparamétrica, se reporta la intensidad media de fluorescencia geométrica de la citocina respectiva. **A)** GMFI deIFN- γ , **B)** GMFI de IL-4, **C)** GMFI de IL-17A y **D)** GMFI de IL-10. A la derecha se muestra un histograma representativo de la producción de cada citocina. Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante la prueba pareada de Wilcoxon, valores de p son mostrados en las gráficas. Se consideró p \leq 0.05 como significativa.