

# CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> EN PACIENTES CON URTICARIA PAPULAR POR PICADURA DE PULGA

**OMAR ALBERTO DOMÍNGUEZ AMOROCHO**

Trabajo de grado para optar al título de:  
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE POSGRADO  
Bogotá, D.C. 2010

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

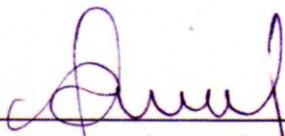
Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup>  
EN PACIENTES CON URTICARIA PAPULAR POR PICADURA DE PULGA

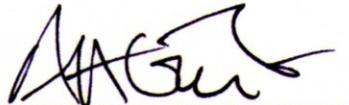
**OMAR ALBERTO DOMÍNGUEZ AMOROCHO**

**Aprobado**

  
ADRIANA CUÉLLAR ÁVILA, PhD  
DIRECTORA

  
Dra. Martha Mesa PhD  
Jurado

  
Dra. Olga Rojas PhD  
Jurado

  
Dr. Alberto Gómez PhD  
Jurado

---

Ingrid Schuler, Biol. PhD  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias

---

Manuel Antonio Franco, MD, PhD  
Director de Posgrado  
Facultad de Ciencias

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
1. RESUMEN	8
2. ABSTRACT	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	13
4.1 OBJETIVO GENERAL	13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. INTRODUCCIÓN	14
6. MARCO TEORICO	17
6.1 GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE	17
6.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA RESPUESTA INMUNE	18
6.2.1 Células dendríticas mieloides	19
6.2.2 Células dendríticas plasmacitoides	20
6.2.3 Células dendríticas y tolerancia inmunológica	22
6.3 LINFOCITOS T EN LA RESPUESTA INMUNE	23
6.3.1 Patrones de migración de linfocitos	26
6.3.2 Linfocitos T reguladores	26
6.3.2.1 Mecanismos de regulación empleados por los LT reguladores	30
6.4 RESPUESTA INMUNE ALÉRGICA	33
6.5 URTICARIA PAPULAR POR PICADURA DE PULGA	38
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	39
7.2 OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS DE PULGA	41
7.3 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DE LT REGULADORES NATURALES	41

7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LT CD4 <sup>+</sup> COMO RESPUESTA A ANTÍGENOS DE PULGA EN PRESENCIA DE LTREG	42
7.5 LT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CLA <sup>+</sup> Y CLA <sup>-</sup> PRODUCTORES DE CITOCINAS EN RESPUESTA A ANTÍGENOS DE PULGA	43
7.6 DEFINICIÓN DE LA MAGNITUD DE LA RESPUESTA CELULAR	44
7.7 ANÁLISIS DE DATOS	44
8. RESULTADOS	45
8.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	45
8.2 LA FRECUENCIA Y EL RECUENTO ABSOLUTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ES MENOR EN PACIENTES CON UPPP	46
8.3 NO HAY DIFERENCIAS CUANTITATIVAS EN LA POBLACIÓN DE LTREG NATURALES ENTRE CONTROLES Y PACIENTES CON UPPP	49
8.4 NO SE OBSEVA EFECTO DE LOS LTREG SOBRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LT CD4 <sup>+</sup> ESPECÍFICOS DE ANTÍGENOS DE PULGA	51
8.5 EL PERFIL DE PRODUCCIÓN DE CITOCINAS DE LT CD4 <sup>+</sup> EN UPPP ESTÁ RELACIONADO CON EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE MIGRACIÓN A PIEL CLA.	53
9. DISCUSION	58
10. PROPUESTA DE UN MODELO EXPLICATIVO DEL DESARROLLO DE LA UPPP	65
11. CONCLUSIÓN	69
12. BIBLIOGRAFÍA	70

## INDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Antecedentes personales y familiares de enfermedades alérgicas	40
Tabla 2. Frecuencias y recuentos absolutos de Células Dendríticas totales.	47
Tabla 3. Frecuencia y recuentos absolutos de subpoblaciones de CD.	48
Tabla 4. Frecuencia y recuentos absolutos de Linfocitos Treg naturales.	50
Tabla 5. Frecuencia de linfocitos T CD4+ productores de citocinas.	55
Tabla 6. Frecuencia de linfocitos T CD4+ CLA+ Y CLA- productores de citocinas.	55
Tabla 7. iMFI de linfocitos T CD4+ CLA+ Y CLA- productores de citocinas.	56

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Subpoblaciones de linfocitos T efectores	24
Figura 2. Mecanismos de regulación básicos empleados por LTreg	31
Figura 3. Antecedentes personales de enfermedades alérgicas reportados en historias clínicas de pacientes con UPPP	45
Figura 4. Antecedentes familiares de enfermedades alérgicas reportados en historias clínicas de pacientes con UPPP	46
Figura 5. Análisis de células dendríticas	47
Figura 6. Evaluación cuantitativa de células dendríticas totales en UPPP	48
Figura 7. Evaluación cuantitativa de subpoblaciones de Células Dendríticas en UPPP	49
Figura 8. Análisis de LTreg naturales	50
Figura 9. Frecuencia absoluta y relativa de LT reguladoras naturales en UPPP	51
Figura 10. Análisis de la actividad proliferativa de LT CD4 <sup>+</sup> en presencia o ausencia de células CD25 <sup>+</sup>	52
Figura 11. Análisis de la actividad proliferativa de LT CD4 <sup>+</sup> en presencia o ausencia de células CD25 <sup>+</sup>	53
Figura 12. Análisis del perfil de citocinas de LT CD4 <sup>+</sup> específicos de antígenos de pulga	54
Figura 13. Perfil de citocinas de LT CD4 <sup>+</sup> en UPPP	57
Figura 14. Modelo del desarrollo de la urticaria papular por picadura de pulga	68

## 1. RESUMEN

La urticaria papular se ha definido como una enfermedad alérgica crónica, causada por la exposición a ectoparásitos, como las pulgas. Esta enfermedad ha sido estudiada con base en modelos animales, sin embargo, aunque estos modelos son de gran utilidad en el estudio de los mecanismos inmunológicos, en la actualidad es evidente la necesidad de integrar los conocimientos adquiridos en modelos animales a la inmunología humana.

Los estudios realizados en pacientes con urticaria papular por picadura de pulga (UPPP) muestran que el infiltrado presente en las lesiones corresponde a un proceso inflamatorio relacionado con predominio de Linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> y presencia de eosinófilos. Además, se encuentra mayor reconocimiento de antígenos de pulga por IgE sérica en los pacientes respecto a los controles sanos.

Las observaciones clínicas muestran que la UPPP se presenta principalmente en los niños alrededor del primer año de edad, con una remisión parcial o total hacia los siete años, lo cual indica la adquisición de tolerancia a los antígenos desencadenantes de la enfermedad.

También se ha visto que adultos que no residen en zona endémica de pulga pueden desarrollar hipersensibilidad cuando son expuestos a la picadura de pulga, por ejemplo por cambio de domicilio. Además, se ha observado que pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) pueden desarrollar hipersensibilidad, probablemente asociada a una pérdida de tolerancia debida a la inmunodeficiencia secundaria.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar cuantitativamente poblaciones celulares con potencial regulador y la respuesta efectora de LT CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, específicos de antígenos de pulga (*Ctenocephalides felis*), de pacientes pediátricos con UPPP con el fin de establecer posibles diferencias a través del tiempo de evolución de la enfermedad que permitan entender los mecanismos involucrados en la adquisición de tolerancia en esta patología.

Los resultados de este trabajo muestran en sangre periférica un menor recuento absoluto de CDt en pacientes UP<5 (p=0,0002) y UP>5 (p=0,0011). Adicionalmente, se encontró una mayor frecuencia de LT CD4<sup>+</sup> productores de IL-10 (p=0,0001), IL-17 (p=0,0002); IL-4 (p=0,0002) e IFN $\gamma$  (p=0,0002) en pacientes con menor tiempo de evolución de la enfermedad (UP<5) así como de LT CD4<sup>+</sup> productores de IL-17 (p=0,0002) e IFN $\gamma$  (p=0,0002) en pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad (UP>5) al ser comparados con controles sanos.

El análisis por tiempos de evolución muestra que la frecuencia de LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> productores de IL-17 (p<0,0001), IL-4 (p<0,0001) y LT CD4<sup>+</sup> CLA<sup>-</sup> productores de IFN $\gamma$  (p=0,0003) fue mayor en el grupo de menos de 5 años de evolución de la enfermedad, mientras que la de LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>-</sup> productores de IL-10 fue menor en dicho grupo (p=0,0002).

Estos resultados muestran que hay un predominio de células efectoras, con potencial inflamatorio, que expresan el marcador de migración a la piel a menor tiempo de evolución de la enfermedad, aunque de forma interesante aumenta la proporción de LT con potencial regulador (productores de IL-10) a mayor tiempo de evolución de la enfermedad en poblaciones CLA<sup>-</sup>, sugiriendo un mecanismo de control a nivel sistémico que podría contribuir a la adquisición de tolerancia a los antígenos de *Ctenocephalides felis*.

## 2. ABSTRACT

Papular urticaria has been defined as a chronic allergic disease caused by exposure to ectoparasites such as fleas. This disease has been studied based on animal models, however, although these models are useful in the study of immune mechanisms, it is now clear the need to integrate the acquired knowledge in animal models to human immunology.

Studies in patients with papular urticaria by flea bite (PUFB) showing the infiltrate present in the injuries corresponds to an inflammatory process associated with a predominance of CD4<sup>+</sup> T cells and presence of eosinophils. In addition, there is greater recognition of flea antigens by serum IgE from patients compared healthy controls.

Clinical observations show that PUFB occurs primarily in children at first year with a partial or total remission at seven, which indicates the acquisition of tolerance to antigens that trigger the disease. Also, it has been shown that adults who do not live in flea-endemic area can develop hypersensitivity when they are exposed to flea bites. In addition, it was found that AIDS patients may develop hypersensitivity, probably related to the lack of tolerance due to secondary immunodeficiency.

Based on foregoing, the objective of this work was to study the proportion of cell populations with regulatory potential and the effector response of *Ctenocephalides felis* specific CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in pediatric patients with PUFB, to establish the possible differences through the evolution time of the

disease in order to understand the mechanisms involved in the acquisition of tolerance in this disease.

Results of this study show lower peripheral blood DCt absolute count in PU<5 (p=0,0002) and PU>5 (p=0,0011). In addition to, it was observed a higher frequency of IL-10 (p=0,0001), IL-17 (p=0,0002), IL-4 (p=0,0002) and IFN $\gamma$  (p=0,0002) producing CD4<sup>+</sup> T cells in PU<5 and IL-17 (p=0,0002) and IFN $\gamma$  (p=0,0002) in PU>5 comparing with healthy controls.

Analysis by evolution time shows the frequency of IL-17 producing (p<0,0001), IL-4 producing CLA<sup>+</sup> T cells (p<0,0001) and IFN $\gamma$  producing CLA<sup>-</sup> T cells (p=0,0003) was higher in PU<5, while CLA<sup>-</sup> producing IL-10 was lower in these group (p=0,0002).

These results show a predominance of effector cells, with inflammatory potential expressing skin migration marker to lesser evolution time of the disease, although interestingly the fequency of lymphocytes with potential regulatory (IL-10 producers) increases in a longer evolution time in CLA<sup>-</sup> populations, suggesting a control mechanism at systemic level that could contribute to the tolerance acquisition to *Ctenocephalides felis* antigens.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La UPPP afecta la población infantil. En Colombia, cerca del 50% de la población es menor de 16 años. Si consideramos que en las zonas endémicas de pulga, un porcentaje importante aunque no claramente establecido de esta población está afectada por esta patología, un aumento en la consulta genera aumento en los costos directos, asociado a la ausencia laboral de las madres y la ausencia en la escolaridad del infante aumentando los costos indirectos, lo cual conduce a que el sistema de salud incurra en gastos en una enfermedad que puede ser controlada.

Debido a que la enfermedad mejora hacia los 7 años de edad, conocer el mecanismo inmunopatogénico de la enfermedad y los cambios en la regulación de la inmunidad que conllevan a la adquisición natural de tolerancia a los antígenos de pulga, establecería las bases que permitan proponer estrategias de modulación de la respuesta inmune en estos pacientes, para disminuir el tiempo de manifestación de la enfermedad y por tanto mejorar la calidad de vida de la población infantil y disminuir el costo para el sistema de salud.

Si bien en Colombia no se tienen datos de prevalencia de esta enfermedad, en países como México esta ha sido calculada entre un 11 a 50%, por tal razón, se encuentra en curso un proyecto conducido por la Fundación Santa fe de Bogotá dirigido a determinar la prevalencia de esta patología en nuestro medio.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar poblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con urticaria papular por picadura de pulgas a diferentes tiempos de evolución de la enfermedad.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar cuantitativamente las poblaciones de células dendríticas mieloides y plasmacitoides y su expresión de marcadores de activación.
- Evaluar cuantitativamente la población de linfocitos T reguladores naturales CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> CD127<sup>-bajo</sup> de sangre periférica.
- Estudiar la respuesta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica estimuladas con antígenos de *Ctenocephalides felis*, en presencia o ausencia de células T CD25<sup>+</sup>.
- Determinar el perfil de producción de citocinas por LT CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> y CLA<sup>-</sup> específicos de *Ctenocephalides felis*.
- Comparar los resultados obtenidos en pacientes con diferentes tiempos de evolución de la enfermedad: menores de 5 años y mayores de 5 años y controles sanos.

## 5. INTRODUCCIÓN

La Urticaria Papular por picadura de pulga (UPPP) es considerada una enfermedad alérgica crónica que se manifiesta con reacciones de hipersensibilidad cutánea. Se presenta principalmente en la población infantil y se considera de alta prevalencia en los servicios de salud en lugares donde la pulga es un ectoparásito endémico. En la actualidad no existen estudios epidemiológicos publicados en Colombia, sin embargo, los datos de países latinoamericanos como México indican que afecta del 11 al 50% de la población (*Ruiz-Maldonado, 1973*).

Estudios realizados con el fin de caracterizar la respuesta inmune en UPPP han mostrado que el infiltrado celular de las lesiones contiene predominantemente eosinófilos y linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> (*García, 2004*). Adicionalmente, la respuesta humoral circulante de anticuerpos de tipo IgE e IgG muestra diferencias entre los pacientes, de acuerdo con el tiempo de evolución de la enfermedad, donde se observa un mayor reconocimiento por IgE en pacientes con menor tiempo de evolución de la enfermedad así como un reconocimiento por IgG3 en pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad y controles sanos (*Cuéllar, 2010*). El estudio sobre el balance Th1/Th2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica, mostró predominio de la respuesta tipo Th2 frente a un estímulo policlonal en células obtenidas de los pacientes al comparar con controles sanos (*Cuéllar, 2009*).

El estudio de células dendríticas derivadas de monocitos de pacientes con urticaria papular mostró que estas células secretan menores niveles de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) frente al estímulo con

lipopolisacárido, al comparar con células de controles sanos (Cuéllar, 2007). Teniendo en cuenta los menores niveles de IL-10, se realizó un análisis preliminar de polimorfismos puntuales de la región promotora del gen de IL-10, donde no se encontró diferencia significativa de frecuencias alélicas o genotípicas entre pacientes y controles (Casas, 2009).

Las observaciones clínicas muestran que la UPPP se presenta principalmente en los niños durante el primer año de edad, con una remisión parcial o total alrededor de los siete años, lo cual indica que adquieren tolerancia a los antígenos desencadenantes. También se ha visto que adultos que no residen en zona endémica de pulga pueden desarrollar hipersensibilidad cuando son expuestos a la picadura de pulga, por ejemplo por cambio de domicilio. Además, se ha observado que pacientes con SIDA pueden desarrollar hipersensibilidad, probablemente asociada a una pérdida de tolerancia debida a la inmunodeficiencia secundaria.

Teniendo en cuenta los resultados encontrados en las biopsias de los pacientes, las variaciones de la respuesta inmune con respecto al tiempo de evolución de la enfermedad y la mejoría clínica observada en los pacientes, de manera independiente del tratamiento y teniendo en cuenta que las células dendríticas y linfocitos T tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inmune alérgica, que puede conllevar a la adquisición de tolerancia a los antígenos de pulga, nuestra pregunta de investigación fue: ¿Existen diferencias en la frecuencia y/o función de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en pacientes con UPPP con diferentes tiempos de evolución de la enfermedad y controles sanos?.

Para responder a esta pregunta, el objetivo de éste trabajo fue comparar poblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> en pacientes con UPPP a diferentes tiempos de evolución de la enfermedad, menores de 5

(UP<5) y mayores de 5 años años de evolución (UP>5), con el fin de conocer mecanismos de regulación de la respuesta inmune que puedan contribuir al desarrollo de estrategias diagnósticas o de inmunoterapia que contribuyan a mejorar la calidad de vida de la población infantil en nuestro medio.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE

Como resultado de un fenómeno evolutivo, el sistema inmune ha sufrido modificaciones y cambios cuyo propósito final ha sido el de preservar y proteger el organismo manteniendo la tolerancia a antígenos propios o extraños que no tienen potencial patogénico y generando mecanismos para eliminar antígenos extraños potencialmente patógenos mediante adaptaciones que permiten su eliminación reduciendo al mínimo el daño tisular (*Cahalan, 2006*).

Para llevar a cabo dicha función existen dos sistemas generales de defensa, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, las cuales se diferencian principalmente por el tipo de células, receptores, mecanismos involucrados en el reconocimiento del antígeno y estrategias de eliminación del antígeno.

La inmunidad innata actúa como primera línea de defensa frente a la infección. Este primer sistema está compuesto por células como las NK, células fagocíticas, células dendríticas y proteínas del sistema del complemento (*Banchereau 1998; Smyth, 2005; Tosi, 2005; Walport, 2001*).

Las células de la inmunidad innata tienen la capacidad de interactuar con estructuras conservadas y únicas de los microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (por sus iniciales en inglés PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), invariantes entre algunos microorganismos y productos únicos de los mismos, susceptibles de ser

reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (por sus iniciales en inglés PRRs: *Pattern Recognition Receptors*) como los receptores homólogos a los receptores Toll de *Drosophila*, los cuales han evolucionado en mamíferos recibiendo en estos el nombre de receptores tipo Toll (por sus iniciales en inglés TLR: *Toll Like Receptors*). La distribución celular de estos TLRs, el reconocimiento diferencial de PAMPs, así como la activación de distintas vías de señalización, dan lugar a un complejo patrón de activación celular importante en el control primario de los patógenos invasores (*Zeytun, 2010*).

En la inmunidad adaptativa se presenta una respuesta altamente específica mediada por linfocitos que expresan receptores de antígeno como el receptor de antígeno del linfocito B (BCR) en el caso de los linfocitos B (LB) y el receptor de Antígeno del linfocito T (TCR) en los linfocitos T (LT). Estas moléculas son generadas a partir de la recombinación somática de segmentos génicos que las codifican y como resultado de esta recombinación se genera el repertorio de receptores de alta especificidad que median la activación linfoide (*Weil, 2004*).

El resultado final de la activación de las células de la inmunidad adaptativa es la producción de anticuerpos, activación de mecanismos de citotoxicidad, liberación de citocinas, activación de otros tipos celulares, todos ellos conducentes a la remoción del antígeno, que controlada de forma adecuada, permite la generación de memoria inmunológica y la inducción de una respuesta rápida y eficaz frente a posteriores retos con el antígeno.

## **6.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA RESPUESTA INMUNE**

Entre la inmunidad innata y adaptativa existe un nexo orquestador de la respuesta inmune. Este nexo son las células dendríticas (CDs), un grupo de

células que se ha especializado en la captura, procesamiento y presentación de antígenos a los LT para inducir inmunidad o tolerancia (*Banchereau, 1998*).

### **6.2.1 Células Dendríticas mieloides**

Inicialmente fue considerado que las CDs tenían origen en la línea mielóide. Los primeros estudios demostraron que los precursores mieloides de médula ósea en el ratón tenían la capacidad de diferenciarse a macrófagos, granulocitos y CDs en presencia de factor estimulante de colonias granulocítico-monocíticas (por sus iniciales en inglés GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (*Inaba, 1993*).

Un resultado similar se encontró en estudios de células humanas donde un precursor CD34<sup>+</sup> derivado de médula ósea diferenciado en monocitos CD1a<sup>-</sup> se comportaba como una población precursora bipotencial con capacidad de producir CDs maduras cuando se cultivaba en presencia de GM-CSF y Factor de necrosis tumoral alfa (por sus iniciales en inglés TNF- $\alpha$ : *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) (*Caux, 1996; Reid, 1992*). Más evidencias del origen mielóide de las CDs vinieron de la observación que los monocitos se diferenciaban en CDs en presencia de GM-CSF e IL-4, *in vitro* (*Sallusto, 1994*).

Las células dendríticas mieloides (CDm) expresan el marcador CD11c y marcadores de línea mielóide como CD13 y CD33 (*Sato, 2007*) y no expresan marcadores de linaje (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56). Adicionalmente, se ha demostrado que esta subpoblación de CDs expresan TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7 y TLR8 (*Kadowaki, 2001*).

Antes del reconocimiento de un antígeno, las CDm se encuentran en un estado inmaduro que les confiere una alta capacidad fagocítica con un bajo potencial activador de LT (Steinman, 1999). Después de la captación del antígeno, estas células entran en un proceso de maduración y aumentan la expresión del receptor de quimiocina C-C tipo 7 (por sus iniciales en inglés CCR7: *C-C chemokine receptor type 7*) y migran hacia los órganos linfoides secundarios, a través de vasos linfáticos, donde ocurre la presentación a los LT vírgenes (Martín-Fontecha, 2009).

El proceso de maduración de las CDm involucra la disminución en su capacidad para fagocitar antígenos y el incremento en la expresión de moléculas relacionadas con la presentación antigénica, de tal forma que al ingresar a los nódulos linfáticos, son potentes presentadoras de antígenos para los LT (Lanzavecchia, 2001). Además, la maduración se traduce en un notable aumento en la secreción de citocinas, aumento en la expresión del antígeno de maduración (CD83) y moléculas de activación y coestimulación (CD80/CD86) necesarias para la activación de LT vírgenes.

### **6.2.2 Células Dendríticas plasmacitoides**

Inicialmente se sugirió que las CDp eran de origen linfóide basados en los hallazgos que las CDp humanas expresan productos génicos asociados con linaje linfóide, que incluyen la cadena  $\alpha$  del receptor de las células pre-T, V-preB, Spi-B (Activador transcripcional promotor de diferenciación de CDp y de desarrollo de células B) y la molécula de señalización Notch-1 (*Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)*) (Grouard, 1997; Rissoan, 1999) y no expresan marcadores de línea mieloide.

Dos estudios separados apoyan el origen linfóide de las CDp en humanos y ratones. En primer lugar, el aumento en la expresión de los factores de

transcripción Id2 o Id3 en células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> humanas, observada en progenitores de línea mieloide, ha sido observado en CDm pero no en CDp y linfocitos T y B (*Spits, 2000*). En segundo lugar, la delección de Spi-B (un factor de transcripción hematopoyético que se expresa exclusivamente en células linfoides) en células progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> humanas, inhibe su potencial para diferenciarse en CDp (*Schotte, 2004*).

Las CDp no expresan el marcador CD11c, expresan la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-3 (CD123), requieren de IL-3 pero no de GM-CSF para sobrevivir (*Sato, 2007*) y de modo similar a las CDm no presentan marcadores de linaje. Adicionalmente ha sido reportado que las CDp circulan a través del torrente sanguíneo en un estado inmaduro de manera similar a las CDm pero presentan un patrón de migración distinto (*Yoneyama, 2004*).

Las CDp aumentan la expresión de CXCR3 y CD62E (E-Selectina) más que CCR7 y dejan la circulación para entrar en órganos linfoides secundarios a través de la interacción con vénulas de endotelio alto (*Banchereau, 2000; Facchetti, 2003*). Bajo circunstancias inflamatorias las CDp migran a los tejidos lesionados por medio de los vasos sanguíneos que expresan moléculas de adhesión como PNAAd (*Peripheral lymph node addressin*) y CD62 (P-selectina) los cuales son ligandos de CD62 (*Cella, 1999; Jahnsen, 2000*). A diferencia de las CDm, las CDp activadas, secretan grandes cantidades de IFN de tipo 1 (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , e IFN- $\omega$ ), que son moléculas con propiedades antivirales, inhibidoras de la proliferación celular e inmunomoduladoras (*Sato, 2007*). Adicionalmente, las CDp expresan TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 y TLR10 (*Kadowaki, 2001*).

Algunos reportes indican que las CDm pueden inducir diferenciación de LT CD4<sup>+</sup> hacia células efectoras Th1 productoras de IFN- $\gamma$ , mientras que las

CDp inducen diferenciación hacia Th2 productoras de IL-4 (*Rissoan, 1999*). Sin embargo, el tipo de respuesta linfoide generada no depende únicamente del linaje de la CD, ya que estudios posteriores han mostrado que variaciones en las condiciones del microambiente pueden inducir respuesta linfoides Th1 y Th2. Esto parece depender de múltiples factores como la naturaleza del estímulo antigénico, su vía de entrada, el microambiente, la proporción de CPA y de LTs (*Langenkamp, 2000*).

### **6.2.3 Células dendríticas y tolerancia inmunológica**

Desde el punto de vista de la tolerancia central en timo, las CDs tienen un papel importante. Los corpúsculos de Hassall son agrupamientos de células epiteliales localizados dentro de la médula tímica y dada su actividad en la secreción de citocinas, influyen en el desarrollo de los timocitos. Se ha mostrado que las células epiteliales de los corpúsculos de Hassall secretan Linfopoyetina Estromal Tímica (por sus iniciales en inglés TSLP: *Thymic Stromal Lymphopoietin*) y estas células se co-localizan con CDm. Después de superar los procesos de selección tímica, los timocitos en presencia de CDs expuestas a TSLP se diferencian en células con potencial regulador, conocidas como LT reguladores (LTreg) naturales (*Watanabe, 2005*).

Aunque se ha logrado la clasificación fenotípica de CDs plasmacitoides y mieloides, se han descrito varias subpoblaciones de acuerdo con sus diferencias funcionales. Entre los factores críticos en la regulación de la respuesta inmune mediada por las CDs sobresale la interleucina 10 (IL-10). La IL-10 se ha descrito como una citocina inhibitoria de la liberación de interferón gama (IFN- $\gamma$ ) por parte de los LTh1 y se ha encontrado también que tiene un efecto inmunosupresor sobre CDs, causado por una reducción en la expresión de moléculas del Complejo mayor de Histocompatibilidad

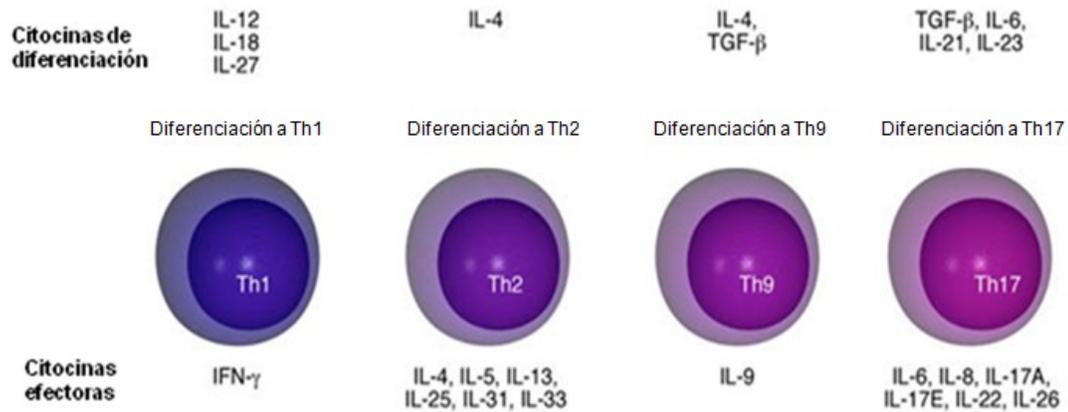
(CMH) de clase II, moléculas coestimuladoras y de adhesión y el marcador de maduración CD83.

Además, en el sobrenadante de CDs tratadas con IL-10, se observó la inhibición de la secreción de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IL-12. Estas células se han denominado CDs moduladas por IL-10 y podrían explicar algunos fenómenos de tolerancia mediados por las células presentadoras de antígeno (CPA) (*Jonuleit, 2001*).

Otro aspecto importante de las CDs en el mantenimiento de la tolerancia periférica en condiciones de reposo es decir, en ausencia de señales de peligro, es que tanto las CDm como las CDp en estado inmaduro o semimaduro tienen la capacidad de migrar de los tejidos periféricos a los órganos linfoides secundarios y contribuir al mantenimiento de la tolerancia a lo propio, regulando la actividad de los LT en estas condiciones (*Dhodapkar, 2001*). Sin embargo, también se ha mostrado que se requiere de CDs maduras para la inducción de LTreg (*Cools, 2007*).

### **6.3 LINFOCITOS T EN LA RESPUESTA INMUNE**

Dependiendo del microambiente, los LT CD4<sup>+</sup> vírgenes pueden diferenciarse en células efectoras con diferentes fenotipos. Con base en su patrón de citocinas, respuesta a quimiocinas e interacciones con otras células, esas subpoblaciones de LT y LTreg inducidos (Tr1 y Th3) pueden promover diferentes tipos de respuestas inflamatorias, no inflamatorias y anérgicas (figura 1).



**Figura 1. Subpoblaciones de células T efectoras.** Después de la presentación antigénica por las CDs, las células T vírgenes se diferencian en poblaciones efectoras Th1, Th2, Th9 y Th17. Su diferenciación requiere citocinas y otros cofactores presentes en el microambiente celular. Adaptado de *Akdis, 2009*.

El paradigma descrito en 1986 por Mosmann y Coffman propone que las reacciones de hipersensibilidad retardada y que la actividad ayudadora para la inmunidad humoral depende de LTh1 y LTh2 de acuerdo con el tipo de citocinas secretadas respectivamente (*Coffman, 1986; Mosmann, 1986*).

Los LTh1 se caracterizan por la producción de IFN $\gamma$ , factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ) e IL-2 y principalmente se han involucrado con inmunidad celular contra microorganismos intracelulares (*Mosmann, 1989; Paul, 1994*) y en activación de macrófagos en los cuales se ha observado un incremento en su capacidad microbicida (*Suzuki, 1988*).

Los LTh2, producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (*Mosmann, 1989*) y otras citocinas que han sido identificadas como IL-25, IL-31 e IL-33, que contribuyen a la respuesta Th2 y la inflamación (*Dillon, 2004; Fort, 2001; Kakkar, 2008*). Las citocinas Th2 juegan un papel en la producción de IgE, eosinofilia, aumento

de la permeabilidad endotelial, producción de moco y aumento en la contracción del músculo liso (*Zhu, 2008*).

Dado que la hipótesis Th1/Th2 no explica muchos de los fenómenos de daño tisular, experimentos recientes encaminados a estudiar posibles mediadores proinflamatorios, han introducido un nuevo tipo celular conocido como Th17, que corresponde a un linaje diferente de las células Th1 y Th2 (*Harrington, 2005*). Estas células secretan IL-17 en respuesta a la estimulación celular por IL-23 (*Langrish, 2005*). La IL-23 es una molécula heterodimérica con una subunidad p40 como la de IL-12 y una subunidad única p19 (*Cua, 2003*) que diferente a IL-12 no induce la producción de IFN $\gamma$  pero si favorece la inducción de células Th17. Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-21, IL-22 e IL-26 (*Harrington, 2005; Park, 2005*) y han sido involucradas en la respuesta inmune frente a microorganismos intra y extracelulares (*Peck, 2010*) y en la inducción de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (*Bettelli, 2007*).

Adicionalmente, se han descrito otros fenotipos de LT CD4<sup>+</sup> como son los LTh9 y LTh22. Ha sido demostrado que el TGF- $\beta$  en presencia de IL-4 reprograma la diferenciación de los LT vírgenes y conduce al desarrollo de una nueva población de LTh9 que producen IL-9 e IL-10 (*Veldhoen, 2008*). Estos LTh9, a pesar de producir IL-10, carecen de actividad supresora y se constituyen como una población distinta de LT efectores que promueven la inflamación tisular (*Dardalhon, 2008; Veldhoen, 2008*).

Recientemente ha sido descrita otra población de LT caracterizada por la secreción de IL-22 y TNF- $\alpha$ , pero no de IFN- $\gamma$ , IL-4 o IL-17. Esta población se ha visto asociada con desórdenes inflamatorios cutáneos y ha sido denominada LTh22 (*Eyerich, 2009*).

### 6.3.1 Patrones de migración de linfocitos

Cuando un antígeno se encuentra en un tejido específico, la activación de los LT en los nódulos linfoides proximales resulta en la inducción de células efectoras específicas de antígeno que expresan receptores de migración al tejido donde el antígeno fue encontrado originalmente.

Los LT murinos y humanos expresan moléculas que actúan como ligandos para E-Selectina y P-Selectina como es el caso del Antígeno leucocitario cutáneo (por sus iniciales en inglés CLA: *Cutaneous Lymphocyte Antigen*) (Berg, 1991) y los receptores de quimiocinas CCR4 (Campbell, 1999) y/o CCR10 (Hudak, 2002), que son cruciales para la migración eficiente de los LT a la piel.

A diferencia de las células que migran a piel, los LT con tropismo intestinal migran preferencialmente a la lámina propia del intestino delgado. Estas células no presentan marcadores de migración a piel y expresan altos niveles de integrina  $\alpha 4\beta 7$  (Berlin, 1993) y el receptor de quimiocina CCR9 (Hosoe, 2004). Esto se correlaciona con la alta expresión de moléculas MAdCAM-1 principal ligando de  $\alpha 4\beta 7$  y CCL25, ligando de CCR9, que son fuertemente expresados en vénulas de la lámina propia y en células epiteliales intestinales, respectivamente (Hosoe, 2004).

### 6.3.2. Linfocitos T reguladores

Además de las células efectoras, se han descrito los LTreg que son una población especializada que actúa suprimiendo la activación de otras células, manteniendo de este modo la homeostasis del sistema inmune, la tolerancia y el control homeostático de la respuesta inmune (Apostolou, 2004; Hori, 2003; Sakaguchi, 2005). A la fecha ha sido demostrada la existencia de

varios subtipos de LTreg que incluyen los LTreg naturales y los LTreg inducidos en periferia como respuesta al estímulo antigénico.

Los LTreg naturales fueron descritos por Sakaguchi como una fracción menor (aproximadamente del 5 al 10%) de LT CD4<sup>+</sup> en sangre periférica, generadas naturalmente en el timo como una subpoblación funcionalmente distinta y madura de LT (*Sakaguchi, 1995 y 2004*). Estas células expresan constitutivamente una variedad de moléculas de superficie celular comúnmente asociadas con células activadas o de memoria, significativamente CD25, CD62L, CD103, antígeno 4 del linfocito T citotóxico (por sus iniciales en inglés CTLA-4), y el receptor de la familia de TNF inducido por glucocorticoides (por sus iniciales en inglés, GITR). La Neuropilina-1, una molécula comúnmente asociados con orientación axonal se expresa constitutivamente en LTreg naturales y su expresión disminuye en LT convencionales después de la activación (*Bruder, 2004*).

Algunos estudios recientes han mostrado que Foxp3 murino que codifica un factor transcripcional represor denominado Scurfina, puede ser expresado específicamente en LTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y asociarse con su desarrollo y función (*Brunkow, 2001; Hori, 2003*).

Además, se ha mostrado que la transducción retroviral o la expresión transgénica de Foxp3 puede convertir LT vírgenes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> murinas en células con un fenotipo regulador (*Yagi, 2004*).

Ha sido mostrado, principalmente en ratones, que el timo normal produce continuamente LTreg como una subpoblación funcionalmente madura de LT que reconoce un amplio repertorio de antígenos propios y que una disfunción en la producción tímica de estas células conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes (*Maloy, 2001; Sakaguchi, 2000; Shevach, 2000*).

Walker y colaboradores mostraron que los LTreg de sangre periférica humana expresan FOXP3 y son capaces de suprimir la activación y expansión de LT *in vitro* de modo similar a lo que se ha mostrado en ratones (Fontenot, 2003; Hori, 2003; Khattri, 2003). Además mostraron que, en contraste con la expresión de Foxp3 murino, la activación de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> humanos vía TCR induce expresión de FOXP3 y que existe una población de LT FOXP3<sup>-</sup> derivados de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> con propiedades supresoras similares a las de los LTreg (Walker, 2003).

Este hallazgo sugiere dos posibilidades con relación al origen de los LTreg. Uno es que los LT vírgenes pueden diferenciarse a LTreg por estimulación de TCR y traslocación de FOXP3 de una forma similar en la cual la expresión de factores de transcripción T-bet y GATA-3 dirigen la diferenciación de LT vírgenes en LTh1 y LTh2 respectivamente (Apostolou, 2002; Thorstenson, 2001). Otra posibilidad es que algunos de los LTreg funcionalmente maduros producidos por el timo sean CD25<sup>-</sup> o pierdan la expresión de este marcador manteniendo su capacidad supresora, como se ha mostrado en roedores (Annacker, 2000; Gavin, 2002; Stephens, 2000) y que estos LTreg CD25<sup>-</sup> puedan convertirse en CD25<sup>+</sup> después de la activación y que su expansión pueda ser conducida por la producción de IL-2 por otros LT.

La identificación de marcadores para la caracterización de LTreg ha sido siempre un objetivo primordial. De manera tradicional, los LTreg, tanto murinos como humanos, han sido identificados como LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. En murinos estas células pueden ser aisladas eficientemente con base en este fenotipo; sin embargo, en humanos ha sido necesario implementar otros marcadores debido a que los LT CD4<sup>+</sup> activados aumentan la expresión de CD25 (Seddiki, 2006).

Aunque la identificación de Foxp3, como un regulador clave del desarrollo y función de LTreg ha facilitado su identificación en ratones, muchos LT activados (no reguladores) también expresan este factor, demostrando que la expresión de este marcador no es exclusiva de los LTreg (*Allan, 2007; Gavin, 2006; Morgan, 2005; Tran, 2007; Wang, 2007*).

Adicionalmente, se ha mostrado que la expresión de CD127 (IL-7R $\alpha$ ) se encuentra disminuída o ausente en LTreg y por esta razón podría ser usada para incrementar la pureza en la definición y aislamiento de esta población celular (*Liu, 2006; Seddiki, 2006*). Por esto es necesaria la combinación de los marcadores celulares CD3, CD4, CD25, FOXP3 y CD127 para delimitar la población de LTreg humanos.

También, se ha demostrado que es posible que el desarrollo de LTreg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> con función supresora y expresión de FOXP3 pueda ocurrir en LT convencionales bajo condiciones específicas de activación *in vivo*, en tejidos periféricos posterior al estímulo antigénico (*Apostolou, 2004*).

A diferencia de los LTreg naturales, se han descrito tres tipos de LTreg inducidos por el estímulo antigénico: LTh3, LTr1 y LTreg convertidos. Los LTh3 fueron descritos por Chen (*Chen, 1994*) como LT CD4<sup>+</sup> inducidos por antígenos, administrados por vía oral, en los nódulos linfáticos mesentéricos y se caracterizan por producir gran cantidad de factor transformante de crecimiento beta (TGF $\beta$ ) y concentraciones variables de IL-4 e IL-10 (*Akbari, 2003*).

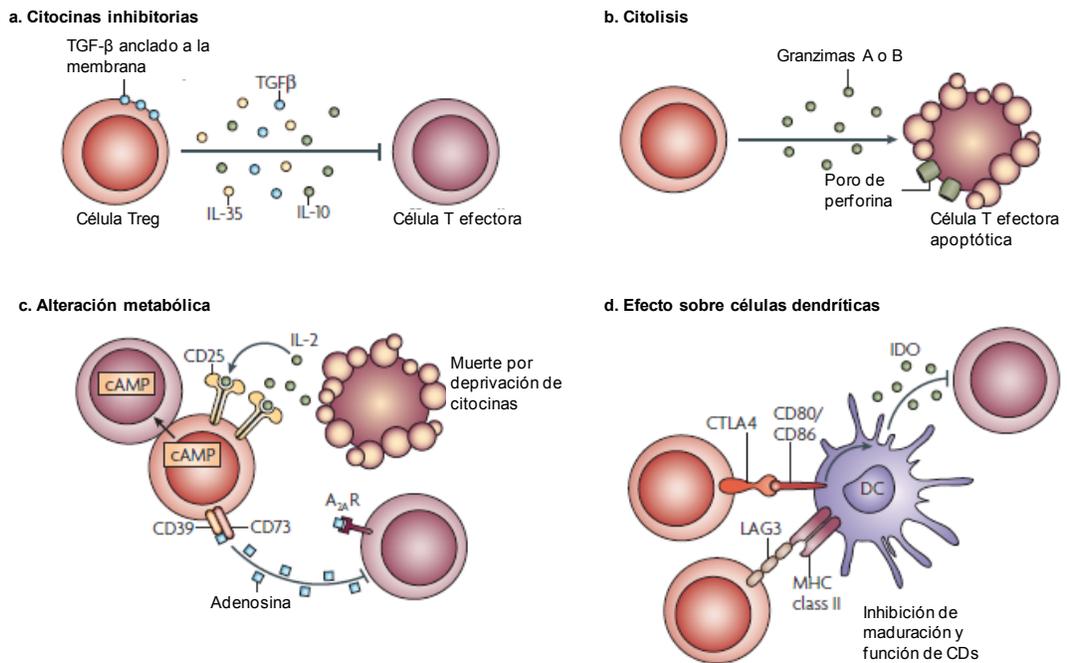
Los LTr1 fueron descritos por Groux (*Groux, 1997*) y se caracterizan por producir altos niveles de IL-10 y niveles variables de TGF $\beta$  (*Akbari, 2003*). Los LTr1 fueron inicialmente generados por la estimulación crónica de LT en presencia de IL-10 (*Groux, 1997*). Estas células secretan un patrón de

citocinas diferentes de los LTh1 o LTh2, son funcionalmente supresoras *in vivo* y capaces de prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la colitis (Groux, 1997 y 2003).

Los LTreg convertidos (LTreg conv) son generados por activación *in vitro* en presencia de IL-2, TGF $\beta$  y ácido retinóico, expresan el marcador FOXP3 y poseen características reguladoras similares a los ampliamente descritos LTh3 y LTr1 (Feuerer, 2009).

### **6.3.2.1 Mecanismos de regulación empleados por LT reguladores**

Desde una perspectiva funcional, los mecanismos potenciales de supresión empleados por los LTreg en humanos pueden ser agrupados en cuatro “modos básicos de acción” (Figura 2).



**Figura 2. Mecanismos de regulación básicos empleados por LTreg.** a. Producción de citocinas inhibitorias como IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$ . b. Mecanismo de inducción de muerte celular dependiente de granzimas. c. Alteración metabólica por privación de citocinas e inhibición mediada por AMPc y adenosina. d. Mecanismos que modulan la maduración de CD como activación de LAG3, la supresión mediada por CTLA-4 e inducción de IDO. Adaptado de *Vignali, 2008*.

La supresión por citocinas inhibitorias involucra la producción de IL-10, TGF- $\beta$  o IL-35 como mediadores de supresión (*Collison, 2007; Shevach, 2006*).

La IL-10 regula la proliferación, diferenciación y función de LB y LT, células NK, granulocitos y CDs, entre otros y favorece la generación de LTreg en periferia y su función, características que han sido demostradas en diversas patologías (*Anderson, 2007; Asseman, 1999; Hawrylowicz, 2005; Rubtsov, 2008*).

El papel de la producción de TGF- $\beta$  por LTreg ha sido demostrado en el control de la respuesta inmune frente a patógenos (*Kursar, 2007*), supresión de la respuesta alérgica (*Joetham, 2007*), prevención de colitis en modelos experimentales (*Li, 2007*) e inmunidad antitumoral (*Strauss, 2007*).

La IL-35 ha sido referida como una citocina requerida para una máxima actividad supresora en LTreg aunque su función no ha sido claramente definida (*Collison, 2007*).

La supresión por citolisis está mediada por la liberación de granzimas y perforinas por LTreg humanos (*Grossman, 2004*). Un estudio reciente también ha sugerido que los LTreg activados también pueden inducir apoptosis de células T efectoras a través de un receptor de muerte denominado TRAIL-DR5 (*tumour-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing ligand-death receptor 5*) (*Ren, 2007*) y a través de galectina-1 (*Garin, 2007*).

Son varios los mecanismos descritos en la supresión por alteración metabólica. Se ha mostrado que los LTreg inducen apoptosis mediada por privación de citocinas (específicamente IL-2) (*Pandiyan, 2007*). Se ha propuesto que la expresión constitutiva de CD25 en LTreg, capacita a estas células para consumir la IL-2 local y detener la división activa de los LT efectores por depleción de la IL-2 que necesitan para sobrevivir (*De la Rosa, 2005; Thornton, 1998*). Sin embargo, existe evidencia que muestra que este no es un mecanismo convencional de los LTreg (*Duthoit, 2005*).

Otro mecanismo descrito se relaciona con la liberación de Adenosina monofosfato cíclico (AMPc) por LTreg. Estos nucleósidos tienen la capacidad de suprimir la función de los LT efectores a través de la activación del receptor de adenosina 2A ( $A_{2A}R$ ) (*Borsellino, 2007; Deaglio, 2007; Kobie, 2006*). De manera interesante, la unión de la adenosina a  $A_{2A}R$  parece inhibir

no solo la función de los LT efectoras sino que también incrementa la generación de LTreg inducidos por inhibición de la producción de IL-6 y la promoción de la secreción de TGF- $\beta$  (Zarek, 2008).

Adicional al efecto directo de los LTreg sobre la función de las células T efectoras, estas células pueden también modular la activación y función de las CDs, las cuales son requeridas para la activación de los LT efectoras. Dado que se han observado interacciones directas entre LTreg y CDs *in vivo*, esas interacciones han sido propuestas como un mecanismo funcional atenuador de la activación de LT efectoras por CDs (Tadokoro, 2006), en un proceso que involucra la molécula coestimuladora CTLA-4, que es expresada constitutivamente por LTreg (Read, 2000).

También se ha mostrado que los LTreg pueden condicionar a las CDs a través de un mecanismo dependiente de interacciones entre CTLA-4 y CD80 y/o CD86, desencadenando un aumento en la expresión de Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una potente molécula involucrada en el catabolismo de triptófano que resulta en supresión de LT efectoras por disminución de la concentración de este aminoácido en el microambiente, necesario para su proliferación. (Fallarino, 2003; Mellor, 2004).

#### **6.4 RESPUESTA INMUNE ALÉRGICA**

La alergia es una reacción de tipo inflamatorio que se presenta frente a antígenos ambientales, generalmente inocuos, conocidos como alergenos, con producción de IgE específica para dichas moléculas, reclutamiento de mastocitos, basófilos, eosinófilos y LT que secretan citocinas tipo Th2 (Holgate, 2008). Esta reacción se desencadena principalmente en individuos atópicos, es decir, aquellos individuos con predisposición genética a desarrollar reacciones de hipersensibilidad, con producción de IgE específica

frente al alérgeno y reactividad a las pruebas dérmicas. (*Holgate, 2008*). A pesar de los avances considerables en la comprensión de la naturaleza de los alérgenos a nivel molecular, la pregunta de por qué esas moléculas promueven de manera preferencial respuestas Th2 permanece como un enigma.

La expresión de un fenotipo alérgico depende principalmente de dos factores: la predisposición genética y las interacciones ambientales (*Cookson, 2004*).

El patrón de predisposición alérgica comprende un complejo desorden poligénico, lo cual significa que las alteraciones podrían estar localizadas en individuos atópicos a nivel de múltiples genes y podrían ser diferentes entre sujetos. Los factores ambientales, sin embargo, también influyen fuertemente en el desarrollo de alergia y son ellos ciertamente responsables del incremento en la prevalencia de alergia que ha ocurrido en las últimas décadas en países occidentales. Cómo estos factores promueven o afectan la respuesta inmune en esta y otras enfermedades es un tema de discusión que condujo a la formulación de la hipótesis de la higiene, la cual, plantea que cambios en el ambiente de infección y en el patrón de exposición a microorganismos de los niños son factores críticos importantes en el incremento de la prevalencia y severidad de desórdenes atópicos (*Martinez, 2001; Wills-Karp, 2001*).

Inicialmente, en el individuo atópico, se lleva a cabo el proceso de sensibilización que comienza cuando en un primer contacto con el alérgeno, este es captado por las CD4+ tisulares que migran hacia el nódulo linfóide proximal donde ocurre la presentación de los péptidos del alérgeno a los LT vírgenes. De acuerdo con el microambiente generado por las citocinas presentes, los LT de individuos atópicos se diferencian predominantemente

hacia LTh2 y producen IL-4, IL-5 e IL-13, que promueven el cambio de isotipo de inmunoglobulinas por el LB hacia IgE. Esta IgE específica de alérgeno se distribuye por todo el organismo para finalmente unirse a receptores específicos (FcεR) presentes en basófilos (FcεRI), mastocitos (FcεRI) y eosinófilos (FcεRII) principalmente (*Galli, 2008; Larche, 2006*).

Clínicamente, pueden definirse 3 fases de la enfermedad alérgica. En un contacto con el alérgeno posterior a la fase de sensibilización, este se une a la IgE previamente fijada a mastocitos y basófilos e induce su degranulación. La liberación de mediadores contenidos en los gránulos de estas células como histamina, prostaglandinas y leucotrienos, desencadena respuestas quimiotácticas y vasoactivas que forman parte de la reacción aguda o inmediata de la enfermedad alérgica (*Bischoff, 2007*).

La IgE producida como respuesta al proceso de sensibilización es captada también por CDs, monocitos y LB, incrementando la captura del alérgeno por estas células, que actuando como células presentadoras de antígeno, desencadenan una mayor activación de LT CD4<sup>+</sup>, los cuales, se encuentran involucrados en la fase tardía de la reacción alérgica (*Larche, 2006*). El desencadenamiento de la fase crónica de la enfermedad alérgica se debe principalmente al mantenimiento de una respuesta inmune activa frente al reto con el alérgeno con reclutamiento al tejido afectado de células sanguíneas como linfocitos y eosinófilos (*Wills-Karp, 2003*).

Con relación a la inducción de LTh2 en la respuesta alérgica, dos mediadores han sido identificados que pueden actuar sobre las CDs durante el fenómeno alérgico para inducir respuestas Th2. La primera es la histamina, que adicionada a CDs derivadas de monocitos en presencia de lipopolisacárido (LPS) reduce la producción de IL-12 y la inducción de

respuestas Th1 mientras incrementa la producción de IL-10 y el desarrollo de LTh2 (Caron, 2001; Gutzmer, 2002; Mazzoni, 2001).

Un segundo mediador es la linfopoyetina estromal tímica (por sus iniciales en inglés: TSLP), de origen epitelial que es un inductor de respuestas inflamatorias Th2. La TSLP es una citocina estructuralmente similar a la IL-7 (Sims, 2000) pero su receptor (TSLPR) es un heterodímero, conformado por la subunidad  $\alpha$  del receptor de la IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) y una cadena común  $\gamma$  (TSLP- $\gamma$ ) (Fujio, 2000; Pandey, 2000; Park, 2000).

La TSLP se expresa abundantemente en queratinocitos de lesiones cutáneas de dermatitis atópica y su expresión está asociada con la migración y activación de células de Langerhans. Esto sugiere que la TSLP podría ser un iniciador temprano de la inflamación alérgica mediada por CD4 (Soumelis, 2002). Más aún, las CD4 activadas por TSLP inducen una robusta proliferación de LT CD4<sup>+</sup> vírgenes alogénicas, que se diferencian subsecuentemente en LTh2. Esos LTh2 producen las citoquinas promotoras de alergia IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- $\alpha$ , pero no producen IL-10 o IFN- $\gamma$  (Soumelis, 2002).

Los LTh1 también contribuyen de una manera eficiente en la fase efectora de las enfermedades alérgicas dependiendo del modelo específico de enfermedad y el estado de la inflamación (Finotto, 2002). Ellos juegan un papel en la apoptosis del epitelio en asma y dermatitis atópica (Trautmann, 2000; Trautmann, 2002). Además, un perfil de LTh2 predominante en enfermedades atópicas podría ser resultado de la tendencia incrementada de muerte de células inducida por activación de gran cantidad de LTh1 productoras de IFN- $\gamma$  (Akkoc, 2008).

El descubrimiento de los LTh17 ha llenado un espacio esencial en la comprensión de los procesos inflamatorios. La neutralización de la IL-17 y funciones relacionadas con los LTh17 reducen el infiltrado de neutrófilos en un modelo de asma experimental mientras incrementa el infiltrado eosinofílico (*Hellings, 2003; Sergejeva, 2005*).

Otra población de LTh que toma importancia en el fenómeno inflamatorio corresponde a los LTh9. Dos recientes estudios han demostrado que TGF- $\beta$  puede interferir en la diferenciación de LT efectores en una nueva vía (*Dardalhon, 2008; Veldhoen, 2008*). El TGF- $\beta$  en presencia de IL-4 reprograma la diferenciación de los LTh2 y conduce al desarrollo de una nueva población de LTh9 que producen IL-9 e IL-10 (*Veldhoen, 2008*). En otras palabras, la IL-4 bloquea la generación de LTreg inducidos por TGF- $\beta$  e induce LTH9 (*Dardalhon, 2008*). Estas células, a pesar de producir IL-10, pierden su función supresora y se constituyen como una población distinta de LT efectoras que promueven la inflamación tisular (*Dardalhon, 2008; Veldhoen, 2008*).

Otra población celular que se ha mostrado se encuentra involucrada en la respuesta inmune alérgica corresponde a los LTreg inducidos por estímulo antigénico (LTr1). Estos LTreg inducidos son capaces de inhibir el desarrollo de respuestas alérgicas por LTh2 y tienen un papel principal en la inmunoterapia específica (*Akdis, 1998; Jutel, 2003*).

Sobre los LTreg naturales se ha mostrado que hay una menor inhibición de respuestas de citocinas Th2 en individuos atópicos que generan respuestas vigorosas Th2 a alérgenos (*Grindebacke, 2004; Ling, 2004*). Sin embargo, no es claro hasta ahora si ésta es una consecuencia de defectos funcionales en los LTreg naturales, resultado de una alta proporción de LT efectoras en

la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> seleccionada, o un reflejo, por lo menos en parte de refractariedad en la regulación de las poblaciones de LT efectores activados.

## **6.5 URTICARIA PAPULAR POR PICADURA DE PULGA**

La urticaria papular ha sido definida como una enfermedad alérgica crónica, sin embargo los mecanismos fisiopatológicos e inmunes no se conocen en su totalidad. A la fecha se ha demostrado que la etiología compromete tanto mecanismo humorales como celulares (*García, 2004; Cuéllar, 2007; Cuéllar, 2009*) y además se pueden ver involucrados otros factores como la predisposición genética del huésped, la ruta de exposición o la dosis del alérgeno (*Valenta, 2004; Sokol, 2008*).

Los estudios realizados en esta patología han revelado que a nivel celular las lesiones cutáneas de los pacientes con UPPP se encuentran con un gran infiltrado de eosinófilos y un predominio de LT CD4<sup>+</sup> (*García, 2004*). De igual forma, a nivel humoral se ha demostrado que hay reconocimiento de proteínas de un extracto de pulga tanto por IgE como por IgG total, aunque el reconocimiento mediado por IgE tiende a disminuir con el progreso de la enfermedad (*García, 2004*). Este fenómeno, puede reflejar cambios en la respuesta específica al antígeno de pulga como resultado de variaciones en el balance Th1/Th2 debido a las citocinas secretadas por los linfocitos de los pacientes. Particularmente, en la UPPP las investigaciones realizadas han demostrado que los linfocitos de los pacientes secretan mayores niveles de IL-4 que interferon gamma (INF- $\gamma$ ) al comparar con linfocitos de controles sanos (*Cuellar, 2009*).

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

La población incluida correspondió a un total de 20 pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de urticaria papular por picadura de pulga: pápulas, ronchas y/o papulovesículas pruriginosas en el tronco y extremidades, habitualmente agrupadas en dos o tres, de curso crónico que aparecen periódicamente, dejando máculas hipo o hipercrómicas en muchos de los casos. Fueron excluidos pacientes que presentaron infecciones secundarias a nivel de las lesiones, inmunosupresión por enfermedad sistémica o administración de medicamentos inmunosupresores y pacientes que recibieron tratamiento previo con extracto de pulga (inmunoterapia).

Los pacientes fueron distribuidos en dos grupos según el tiempo de evolución de la enfermedad: diez pacientes menores de cinco años de evolución de la enfermedad (UP<5) y diez pacientes mayores de cinco años de evolución de la enfermedad (UP>5), que asistieron a los servicios de dermatología y alergia de la Fundación Santa Fe de Bogotá. Como grupo control se incluyeron 10 niños sanos del mismo rango de edad (C), que asistieron a la Fundación Santa Fe de Bogotá, para cirugía programada de patologías no inflamatorias (circuncisión, hernia inguinal).

Una vez se informó a los pacientes y sus padres o representantes legales sobre el estudio se procedió a la firma del consentimiento informado y la elaboración de la historia clínica en formatos aprobados por los comités de ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana y de la

Fundación Santa fe de Bogotá Las características de los pacientes y controles, así como los antecedentes personales y familiares de atopia se observan en la tabla 1.

**Tabla 1. Antecedentes personales y familiares de enfermedades alérgicas.**

CONTROLES				UPPP<5				UPPP>5			
Código	Edad (Años)/ Género	A. Personales	A. Familiares	Código	Edad (Años)/ Género	A. Personales	A. Familiares	Código	Edad (Años)/ Género	A. Personales	A. Familiares
S1	5 / M	No	No	P1	3 / M	No	No	P11	10 / M	Rin	No
S2	7 / F	No	No	P2	1,8 / M	No	No	P12	9 / M	No	Primos: UPPP
S3	9 / M	No	No	P3	5 / M	No	No	P13	5,5 / M	No	No
S4	11 / M	No	No	P4	1,8 / M	No	No	P14	6 / F	No	Primos: UPPP
S5	5 / F	No	No	P5	1,7 / M	Rin	No	P15	8 / F	No	No
S6	7 / M	No	No	P6	2,9 / M	No	Madre: RC	P16	7 / M	No	No
S7	4 / M	No	No	P7	5,9 / M	No	Primo: UPPP	P17	8 / M	RC	No
S8	3 / M	No	No	P8	4 / F	No	Herman o: UPPP	P18	7 / M	No	No
S9	1,5 / F	No	No	P9	3 / F	No	Herman o: UPPP	P19	9 / M	No	No
S10	27 M	No	No	P10	2 / F	No	Tío: UPPP	P20	7 / F	No	No

Rin: Rinitis, RC: Rinoconjuntivitis, UPPP: Urticaria Papular por picadura de pulga, M: Masculino, F: Femenino.

## 7.2 OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS DE PULGA

Se prepararon extractos acuosos (20% peso/volumen) de pulga completa (*Ctenocephalides felis*) (Greer Labs, Lenoir, NC, USA). Las pulgas fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento, maceradas en PBS 1X y fueron mantenidas en agitación constante durante 1 hora. Se centrifugaron a 14000 g durante 15 minutos a 4°C y se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm para garantizar la esterilidad. La concentración de proteínas fue determinada por la técnica de Bradford y fue de 12 mg/mL.

Para garantizar la ausencia de LPS en el extracto fue realizada la prueba de *Limulus amoebocyte* (Pyrogen, Walkerville, MD, USA) la cual tuvo un resultado negativo.

El extracto fue almacenado en alícuotas a -70°C para ser usado durante todo el estudio.

## 7.3 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DE LT REGULADORES NATURALES

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con gradientes de Ficoll-Hypaque (d=1077 g/mL) y se realizó el marcaje para citometría de flujo para las diferentes poblaciones celulares. Para las CDm se usaron anticuerpos monoclonales Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD11c<sup>++</sup> (Lin 1 FITC 340546; anti-HLA-DR PE-Cy7 335795 y anti-CD11c APC 340544); para las CDp los marcadores usados fueron Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> (anti-CD123 PerCP-Cy 5.5 558714). En estas poblaciones se evaluó la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 (Anti-CD80 PE 557227) y CD86 (Anti-CD86 Biotin 555656 + Streptavidina (SAV) APC-Cy7 554063). Los anticuerpos usados fueron de BD Biosciences y BD Pharmingen, San José, CA, USA.

Para la población de LT reguladores naturales se analizaron células  $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^{-/bajo}$  con los anticuerpos Anti-CD3 Pacific Blue 558117; anti-CD4 PerCP 347324; anti-CD25 PE-Cy7 335789; anti-FoxP3 PE 560046, anti-CD127 Biotina 555288 + SAV APC-Cy7 554063). Los anticuerpos usados fueron de BD Biosciences y BD Pharmingen. Las células fueron analizadas utilizando el citómetro FACsAria® (BD Biosciences, San José, California, USA) equipado con láser azul de 488nm, láser rojo de 633nm y láser violeta de 405nm. Los datos fueron adquiridos y analizados mediante el software FACSDiva® versión 6.1.2 (BD Biosciences, San José, California, USA).

Se obtuvieron porcentajes y recuentos absolutos con base en los valores obtenidos en el cuadro hemático y los datos obtenidos por citometría de flujo.

#### **7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LT CD4<sup>+</sup> COMO RESPUESTA A ANTÍGENOS DE PULGA EN PRESENCIA DE LTREG**

Para evaluar la actividad proliferativa de LT CD4<sup>+</sup> en presencia o ausencia de LT CD25<sup>+</sup> (población que contiene los LTreg naturales) se realizó una depleción de linfocitos CD25<sup>+</sup> mediante el método de selección positiva utilizando perlas magnéticas (CD25 Microbeads II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany 130-092-983) y columnas de separación (LS Columns, Miltenyi Biotec 130-042-401,). Después de este proceso se realizó un marcaje de una alícuota de la población celular depletada para evaluar el porcentaje de depleción el cual fue superior al 90% ( $92.5 \pm 2.1$  %).

Células mononucleares de sangre periférica depletadas y sin depletar fueron marcadas con CFSE (C1157, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a una concentración de 5 mM por 7 min, lavadas con PBS suplementado con 10%

de suero AB (100-512, Gemcell-Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA, USA) y cultivadas en presencia de extracto de pulga (20 µg/mL) durante 5 días a 37°C, en presencia de anti CD28 (CD28 Pure BD Pharmingen 340975) (0,5 µg/ml) y anti CD49d (CD49d Pure BD Pharmingen 553314) (0,5 µg/ml). Trascurrido el tiempo de cultivo, las células fueron lavadas y marcadas en oscuridad con anticuerpos monoclonales para CD3 (Anti-CD3 Pacific Blue 558117, BD Pharmingen) y CD4 (Anti-CD4 PerCP 347324, BD Biosciences) y marcaje para viabilidad (LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain, Invitrogen L34957). La lectura por citometría de flujo fue realizada utilizando el citómetro FACsAria I®.

## **7.5 LT CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> Y CLA<sup>-</sup> PRODUCTORES DE CITOCINAS EN RESPUESTA A ANTÍGENOS DE PULGA**

Para evaluar la producción de citocinas por LT CD4<sup>+</sup>, se realizaron cultivos de CMSP en presencia de extracto de pulga (20 µg/mL) durante 12 horas, estimuladas con 0,5 µg/ml de anti CD28 (CD28 Pure BD Pharmingen 340975) y 0,5 µg/ml de anti CD49d (CD49d Pure BD Pharmingen 553314). Tres horas después del inicio del cultivo, se adicionó 10 µg/ml Brefeldina A (BD Golgi Stop, BD Pharmingen 554715) para bloquear la secreción de citocinas de las células. Al terminar la incubación (12 horas) se lavaron las células con PBS-EDTA 2mM frío. Las células fueron coloreadas en oscuridad, durante 30 minutos a 4°C, con anticuerpos monoclonales anti CD3 pacific blue, CD4 PerCP, CLA (Anti-CLA FITC 55594) y marcaje para viabilidad (LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain L34957). Posteriormente se realizó la permeabilización de las células para hacer marcaje intracelular para citoquinas: Anti-IL-10 APC (551707), Anti-IL-4 PE (340451), Anti-IFN-γ ALEXA 700 (551707) o Anti-human IL-17A Alexa Fluor 647 (eBioscience 51-7179-73). La mayoría de anticuerpos usados fueron de marca BD Biosciences y BD Pharmingen, San José, CA, USA.

La lectura por citometría de flujo fue realizada utilizando el citómetro FACsAria I ®.

## **7.6 DEFINICIÓN DE LA MAGNITUD DE LA RESPUESTA CELULAR**

La magnitud de una respuesta celular (con base en la producción de citocinas) está definida por la frecuencia total de LT CD4<sup>+</sup> que producen una citocina particular, donde la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) es el indicador de la calidad de la respuesta. El resultado de multiplicar la frecuencia de las células productoras de una citocina por su correspondiente IMF, es un término denominado Intensidad Media de Fluorescencia integrada (IMFi) que refleja la respuesta funcional total de una población de células productoras de citocinas (*Darrah, 2007; Seder, 2008*). Esta característica fue calculada y analizada para cada una de las poblaciones de LT CD4<sup>+</sup> productores de citocinas.

## **7.7 ANÁLISIS DE DATOS**

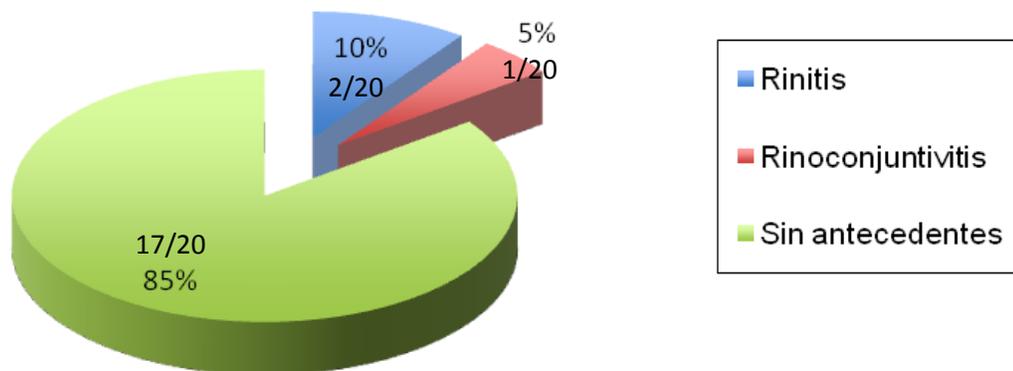
Se realizó un análisis descriptivo de la frecuencia y el recuento absoluto (para CD y LTreg) de las poblaciones celulares y para establecer las diferencias entre pacientes con UPPP clasificados por tiempos de evolución de la enfermedad (UP<5 y UP>5) y controles sanos (C), se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann Withney con un nivel de significancia del 5% para realizar comparaciones entre los grupos mencionados. Los datos son mostrados como medianas y rangos.

Para descartar el efecto de la edad en el comportamiento de las poblaciones celulares se realizó un análisis de los datos obtenidos con relación a la edad de los pacientes y controles donde no se encontró influencia de este parámetro sobre las variables estudiadas.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

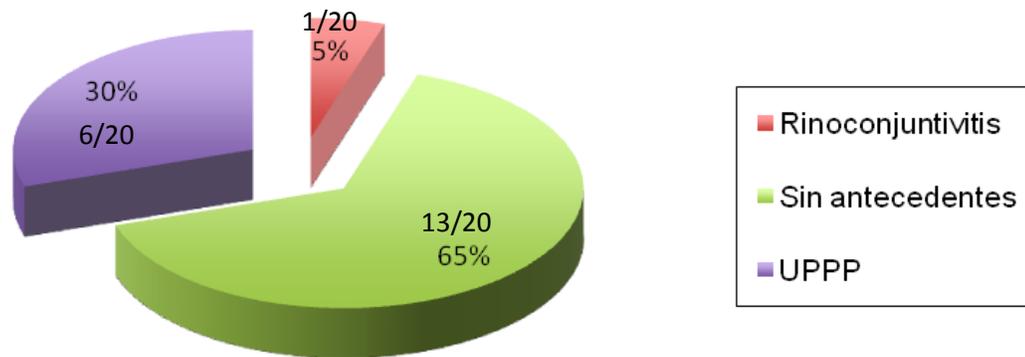
Teniendo en cuenta los datos registrados en la historia clínica de cada uno de los pacientes y controles sanos se identificó la presencia de antecedentes personales y familiares de enfermedades alérgicas comunes como el asma o la rinitis (tabla 1). Del total de pacientes (n=20) se encontró que 2/20 (10%) presentaban rinitis y 1/20 (5%) rinoconjuntivitis como antecedentes personales de enfermedades alérgicas mientras que 17/20 (85%) no reportaban ningún tipo de antecedente (Figura 3).



**Figura 3. Antecedentes personales de enfermedades alérgicas reportados en historias clínicas de pacientes con UPPP (n=20).**

Con respecto a los antecedentes familiares de este tipo de enfermedades, se encontró que 1/20 (5%) tenían antecedentes de rinoconjuntivitis, 6/20 (30%) de UPPP y 13/20 (65%) no reportaban antecedentes. (Figura 4).

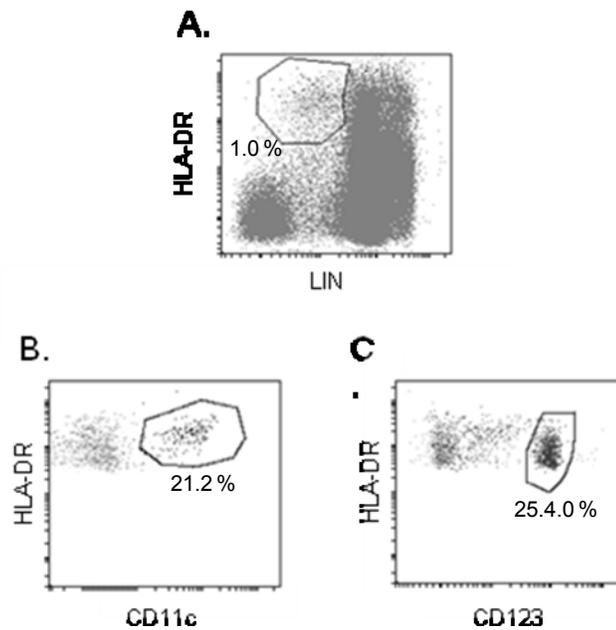
Ninguno de los individuos incluidos en el grupo de controles sanos reportó antecedentes personales ni familiares de enfermedades alérgicas.



**Figura 4. Antecedentes familiares de enfermedades alérgicas reportados en historias clínicas de pacientes con UPPP (n=20).**

## **8.2 LA FRECUENCIA Y EL RECuento ABSOLUTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ES MENOR EN PACIENTES CON UPPP.**

La población de CDs totales fue seleccionada con base en la alta expresión de la molécula HLA-DR y la ausencia del marcador de linaje que incluye los marcadores CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 que permiten la identificación de otras poblaciones celulares como son linfocitos, monocitos y células NK (Figura 5A). La selección de la población de CDm fue realizada con base en la expresión de la molécula CD11c (subunidad  $\alpha$  de la integrina leucocitaria gp150/95) mientras que las CDp se seleccionaron por la expresión de la molécula CD123 (subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-3) (Figuras 5B y 5C).



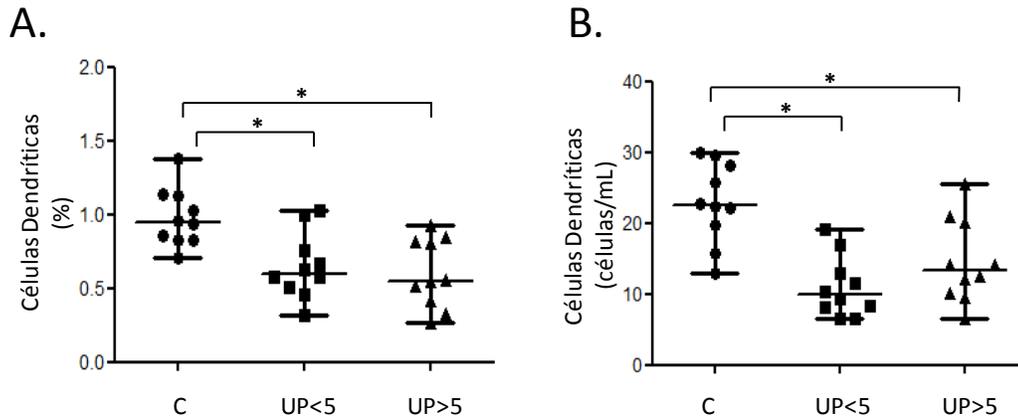
**Figura 5. Análisis de células dendríticas:** CDs de CMSP identificadas por ausencia en la expresión de marcadores de linaje y alta expresión de la molécula HLA-DR (A). Selección de subpoblaciones de CDM con base en la expresión del marcador CD11c (B) y CDp con base en la expresión del marcador CD123 (C).

La interpretación de las diferencias observadas en la población total (CDt) y sus correspondientes subpoblaciones (CDm y CDp), fue establecido con respecto al análisis de dos variables: frecuencia (%) y valor absoluto (células/mL). Este análisis mostró que se encuentra una frecuencia significativamente más baja de CDs en los pacientes UP<5 y UP>5, así como en valor absoluto al ser comparados con controles sanos (Tabla 2, figura 6).

**Tabla 2.** Frecuencias y recuentos absolutos de Células Dendríticas totales.

	%	p	Cél/mL	p
Controles sanos	0,9460 (0.705-1.373)		22,56 (13,00-29,90)	
UP<5	0,5995 (0,319-1,029)	0,0039	9,89 (6,55-19,17)	0.0002
UP>5	0,5495 (0,267-0,926)	0,0011	13,36 (6.57-25,48)	0.0011

Los valores de p mostrados son calculados con respecto a los controles normales.



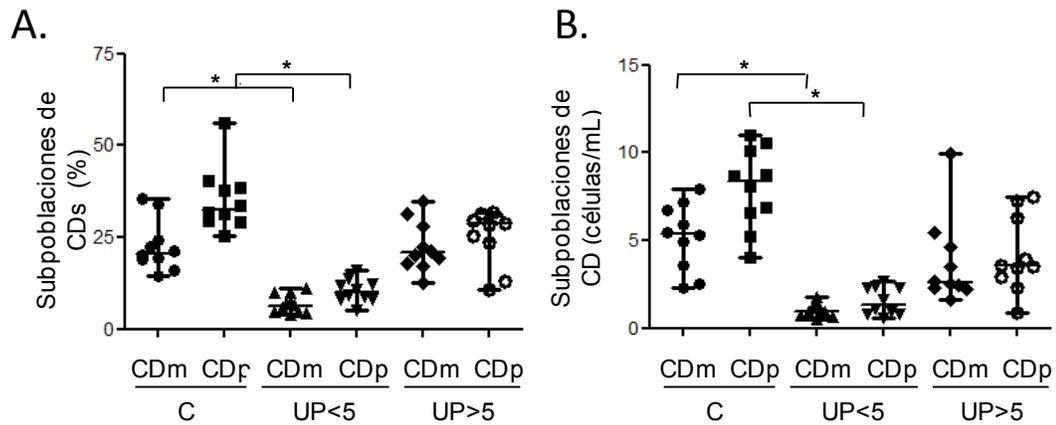
**Figura 6. Evaluación cuantitativa de células dendríticas totales en UPPP:** Frecuencia relativa (A) y absoluta (B) de células dendríticas (CDs) totales en el grupo de individuos sanos (n=10) y pacientes por tiempo de evolución de la enfermedad: menores de 5 años de evolución (UP<5) (n=10) y mayores de 5 años de evolución (UP>5) (n=10). \* p<0.05 U Mann Whitney.

Con relación al análisis de las poblaciones de CDm y CDp a partir de las CDs totales, se observó que los pacientes con menos de 5 años de evolución de la enfermedad presentan una disminución significativa en frecuencia y valor absoluto de CDm y CDp al ser comparados con los controles sanos (Tabla 3, figura 7).

**Tabla 3.** Frecuencia y recuentos absolutos de subpoblaciones de CD.

	CDm				CDp			
	%	P	Cél/mL	p	%	P	Cél/mL	P
Controles sanos	20,61 (14,69-35,49)		5,379 (2,299-7,956)		32,62 (25,54-56,94)		8,38 (3,99-11,02)	
UP<5	6,165 (4,171-11,16)	<0,0001	0,966 (0,489-1,763)	<0,0001	9,96 (4,98-16,03)	<0,0001	1,35 (0,58-2,71)	<0,0001
UP>5	20,74 (12,72-34,89)	0,9705	2,617 (1,591-9,950)	0,063	28,57 (25,80-51,70)	0,0623	8,13 (3,22-10,34)	0,0645

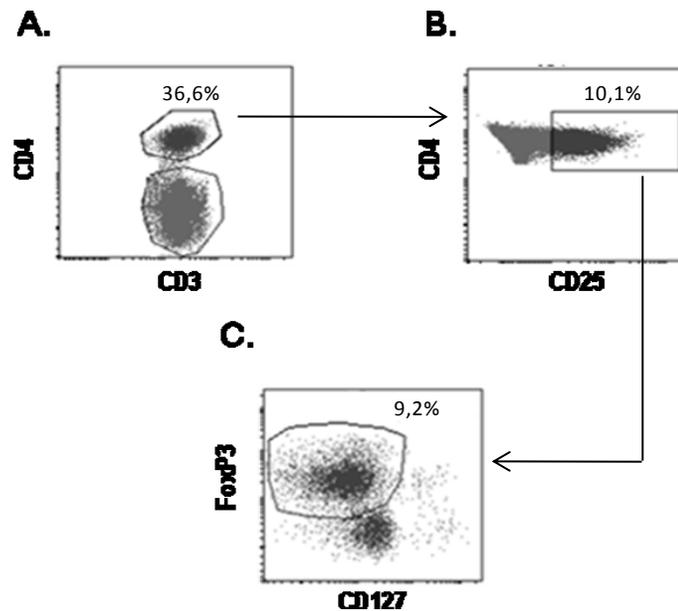
Los valores de p mostrados son calculados con respecto a los controles normales.



**Figura 7. Evaluación cuantitativa de de subpoblaciones de Células Dendríticas en UPPP:** Subpoblaciones de CDs mieloides (CDm) y plasmacitoides (CDp) en individuos sanos (n=10) y pacientes por tiempos de evolución de la enfermedad: menores de 5 años de evolución (UP<5) (n=10) y mayores de 5 años de evolución (UP>5) (n=10), expresadas en valores relativos (%) (A) y absolutos (células/mL) (B). \* p<0.05 U Mann Whitney.

### 8.3 NO HAY DIFERENCIAS CUANTITATIVAS EN LA POBLACIÓN DE LTREG NATURALES ENTRE CONTROLES Y PACIENTES CON UPPP.

La población de células Treg naturales se seleccionó mediante restricción de la población con respecto a la expresión de los marcadores CD3 y CD4 (Figura 8A), en esta población fueron seleccionadas aquellas que expresaban el marcador CD25 (subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-2) (Figura 8B) y finalmente de la población de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fue seleccionada una subpoblación con base en la expresión del factor de transcripción FOXP3 y la baja o ausente expresión de la molécula CD127 (subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-7) (Figura 8C).



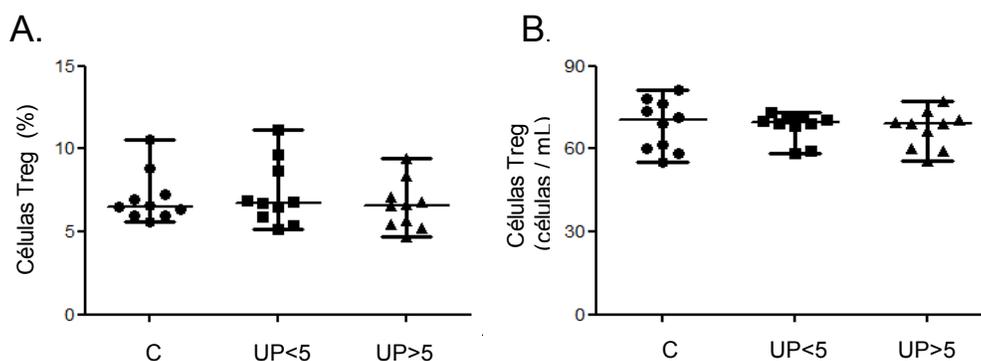
**Figura 8. Análisis de LTreg naturales:** Selección de la población de LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A). Linfocitos T CD4<sup>+</sup> con base en con expresión del marcador CD25 (B). Subpoblación de Linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con expresión del factor de transcripción FOXP3 y ausencia y/o disminución de expresión del marcador CD127 correspondientes a LTreg naturales (C).

De manera similar al análisis de las CDs, la interpretación de las diferencias observadas en esta población celular entre controles y pacientes con UPPP distribuidos por tiempo de evolución de la enfermedad para frecuencia (%) y valor absoluto (células/mL). Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre pacientes al ser comparados con el grupo de individuos sanos. Ni en frecuencia ni valor absoluto (Tabla 4, figura 9).

**Tabla 4.** Frecuencia y recuentos absolutos de Linfocitos Treg naturales.

	%	p	Cél/mL	P
Controles sanos	6,52 (5,60-10,55)		70,31 (55,12-81,32)	
UP<5	6,76 (5,12-11,13)	1,00	69,72 (58,32-73,22)	0,6305
UP>5	6,58 (4,71-9,30)	0,5966	69,27 (55,74-77,15)	0,5787

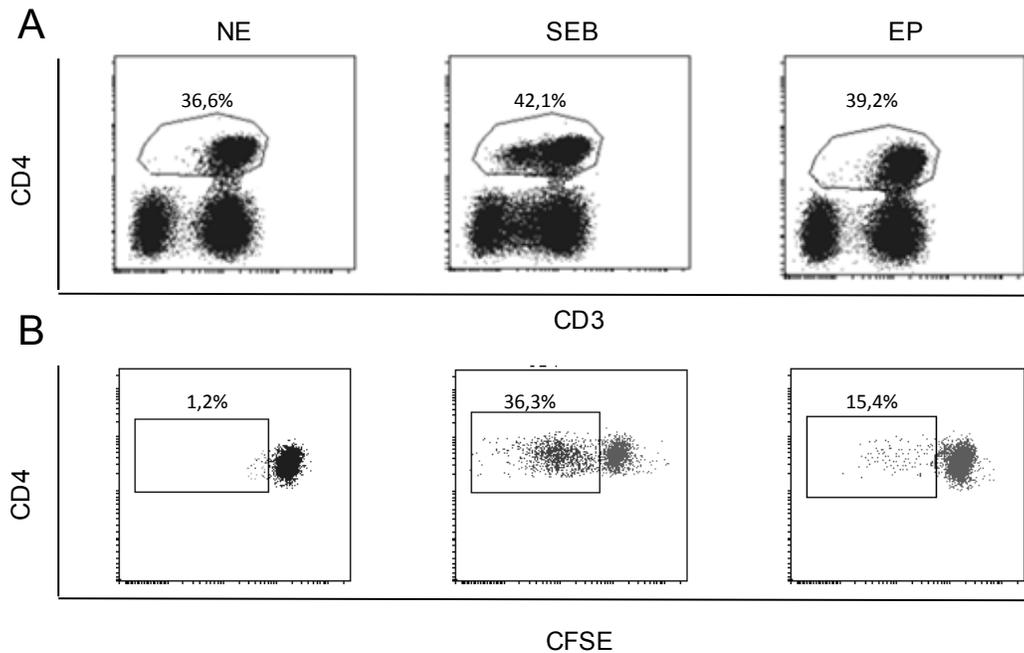
Los valores de p mostrados son calculados con respecto a los controles normales.



**Figura 9. Frecuencia absoluta y relativa de LT reguladoras naturales en UPPP:** Frecuencia relativa (A) y absoluta (B) de células T reguladoras en el grupo de individuos sanos (n=10) y pacientes agrupados por tiempo de evolución de la enfermedad: menores de 5 años de evolución (UP<5) (n=10) y mayores de 5 años de evolución (UP>5) (n=10).

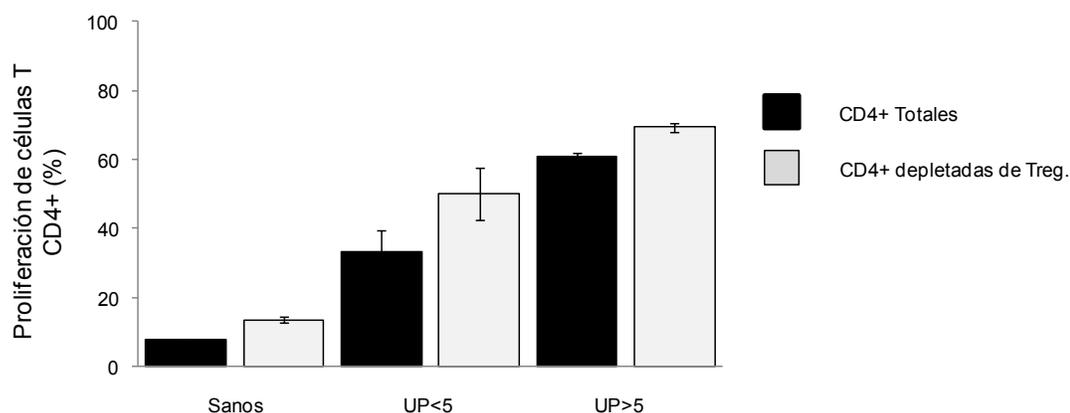
#### 8.4 NO SE OBSEVA EFECTO DE LOS LTREG SOBRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LT CD4<sup>+</sup> ESPECÍFICOS DE ANTÍGENOS DE PULGA

Para evaluar el efecto de los LTreg sobre la capacidad proliferativa de LT efectores frente al estímulo con antígenos de pulga, fue realizada una discriminación inicial de la población celular con respecto a la expresión de los marcadores CD3 y CD4 (Figura10A), en esta población se analizó la pérdida en la expresión de CFSE, característica de células en proliferación, bajo diferentes condiciones de cultivo: sin estimular, estimuladas con enterotoxina B de *Staphylococcus* (por su iniciales en inglés: SEB) 3,7 µg/mL como control positivo y estimuladas con extracto de cuerpo completo de pulga (EP) 20 µg/mL (figura 10B).



**Figura 10. Análisis de la actividad proliferativa de LT CD4<sup>+</sup> en presencia o ausencia de células CD25<sup>+</sup>.** Selección de población de LT CD4<sup>+</sup> con base en la expresión de marcadores CD3 y CD4 (A). Proliferación de LT CD4<sup>+</sup> (B). Tanto la definición de la población de LT CD4<sup>+</sup> como la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> se realizó bajo tres condiciones diferentes de cultivo celular: No estimuladas (NE) como control negativo, estimuladas con SEB como control positivo, y estimuladas con extracto de cuerpo completo de pulga (EP) durante 5 días.

Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con diferentes tiempos de evolución de la enfermedad o con el grupo de controles sanos (Figura 11) al comparar la actividad proliferativa de células mononucleares totales con poblaciones depletadas de células CD25<sup>+</sup>.

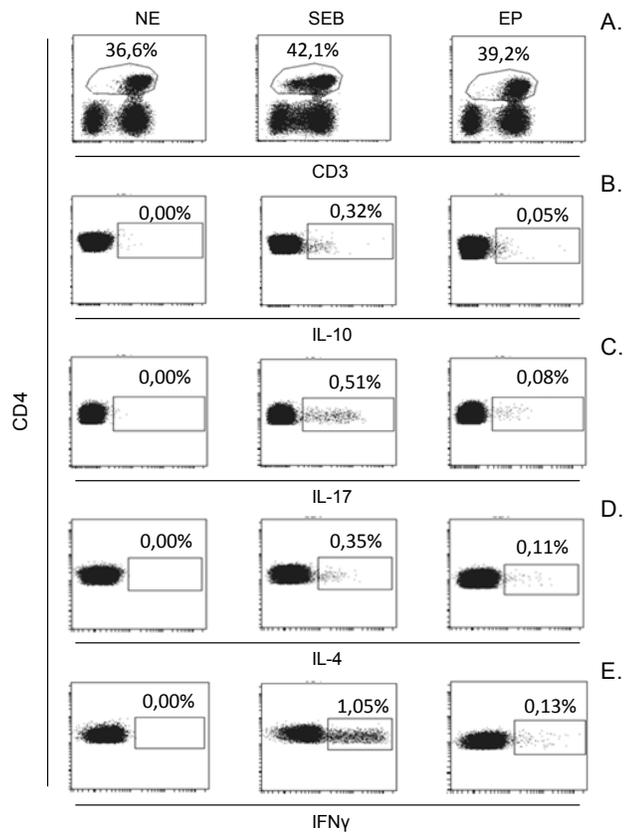


C Totales	C depletadas	p=	UP<5 totales	UP<5 depl.	p=	UP>5 totales	UP>5 depl.	p=
7,8 (7,10-8,10)	14,00 (11,50-15,00)	0,1	29,38 (25,44-45,23)	43,48 (41,73-65,15)	0,4	60,84 (59,44-62,48)	70,07 (66,81-71,00)	0,1

**Figura 11. Análisis de la actividad proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> en presencia o ausencia de células CD25<sup>+</sup>.** Frecuencia de LT CD4<sup>+</sup> que proliferan en respuesta a antígenos de pulga en el grupo de controles sanos (n=5) y pacientes por tiempo de evolución de la enfermedad: menores de 5 años de evolución (UP<5) (n=5) y mayores de 5 años de evolución (UP>5) (n=5).

### **8.5 EL PERFIL DE PRODUCCIÓN DE CITOCINAS DE LT CD4<sup>+</sup> EN UPPP ESTÁ RELACIONADO CON EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE MIGRACIÓN A PIEL CLA.**

Sobre la población correspondiente a LT CD4<sup>+</sup> (Figura 12A), fueron seleccionadas las células que presentaban expresión intracelular de las citocinas IL-10, IL-17, IL-4 e IFN $\gamma$  (Figura 12), bajo diferentes condiciones de cultivo: sin estimular (NE), estimuladas con SEB y estimuladas con extracto de cuerpo completo de pulga (EP) 20 $\mu$ g/mL. Los resultados de la producción de citocinas como respuesta frente al antígeno de pulga, fueron calculados al restar el valor obtenido en condiciones de no estímulo (ruido de fondo) al obtenido en cultivos estimulados con antígeno de pulga.



**Figura 12. Análisis del perfil de citocinas de LT CD4<sup>+</sup> específicos de antígenos de pulga:** Selección de población de LT CD4<sup>+</sup> con base en la expresión de marcadores CD3 y CD4 (A). Poblaciones de LT CD4<sup>+</sup> productores de IL-10 (B), IL-17 (C), IL-4 (D) e IFN $\gamma$  (E). Tanto la definición de la población de LT CD4<sup>+</sup> como la producción de las citocinas se realizó bajo tres condiciones diferentes de cultivo celular: No estimuladas, estimuladas con SEB, y estimuladas con extracto de cuerpo completo de pulga (EP).

Con relación a la producción de las citocinas por LT CD4<sup>+</sup> frente al estímulo con antígeno de pulga se encontró una mayor frecuencia de células productoras de IL-10, IL-17, IL-4 e IFN $\gamma$  en pacientes con menor tiempo de evolución de la enfermedad (UP<5) así como de células productoras de IL-17 e IFN $\gamma$  en pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad (UP>5) al ser comparados con controles sanos (Tabla 5, Figura 13A).

**Tabla 5.** Frecuencia de linfocitos T CD4+ productores de citocinas.

	IL-10	IL-17		IL-4		IFN $\gamma$		p
	%	p	%	p	%	p	%	
Controles sanos	0,0000 (0,0000-0,0020)		0,0050 (0,0020-0,0060)		0,0090 (0,0000-0,0170)		0,0005 (0,0000-0,0100)	
UP<5	0,0230 (0,0080-0,0670)	0,0001	(0,0525 (0,0370-0,0710)	0,0002	(0,1225 (0,0850-0,1670)	0,0002	0,0680 (0,0150-0,1460)	0,0002
UP>5	0,0001 (0,0000-0,0036)	0,6456	(0,0440 (0,0270-0,0620)	0,0002	0,0072 (0,0000-0,0234)	0,6332	0,0665 (0,0090-0,1300)	0,0002

Los valores de p mostrados son calculados con respecto a los controles normales.

Con respecto a este hallazgo adicionalmente se analizó qué proporción de células productoras de citocinas expresaban el marcador de migración a piel (CLA) en el grupo de pacientes de acuerdo con el tiempo de evolución de la enfermedad. Pacientes con menos de 5 años de evolución de la enfermedad presentaron una mayor frecuencia de LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> productores de IL-10 (p=0,0002), IL-17 (p<0,0001) e IL-4 (p=0,0002), así como de LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>-</sup> productores de IFN $\gamma$  (p<0,0001) (Tabla 6, figura 13B).

**Tabla 6.** Frecuencia de linfocitos T CD4+ CLA+ Y CLA- productores de citocinas.

	CLA-				CLA+			
	IL-10	IL-17	IL-4	IFN $\gamma$	IL-10	IL-17	IL-4	IFN $\gamma$
	%	%	%	%	%	%	%	%
UP<5	0,0230 (0,0150-0,0460)	0,0405 (0,0100-0,0530)	0,0365 (0,0010-0,0760)	(0,1285 (0,0510-0,1630)	(0,4825 (0,0180-1,0810)	(1,5500 (1,3320-1,8670)	(1,5390 (1,1670-2,1010)	0,0005 (0,0000-0,0140)
UP>5	(0,8345 (0,6230-1,0170)	0,4495 (0,2010-0,6560)	0,0344 (0,0010-0,0566)	(0,0440 (0,0280-0,0590)	0,3455 (0,0000-0,7980)	1,1170 (0,7560-1,4260)	0,6544 (0,000-0,7488)	0,0000 (0,0000-0,0020)

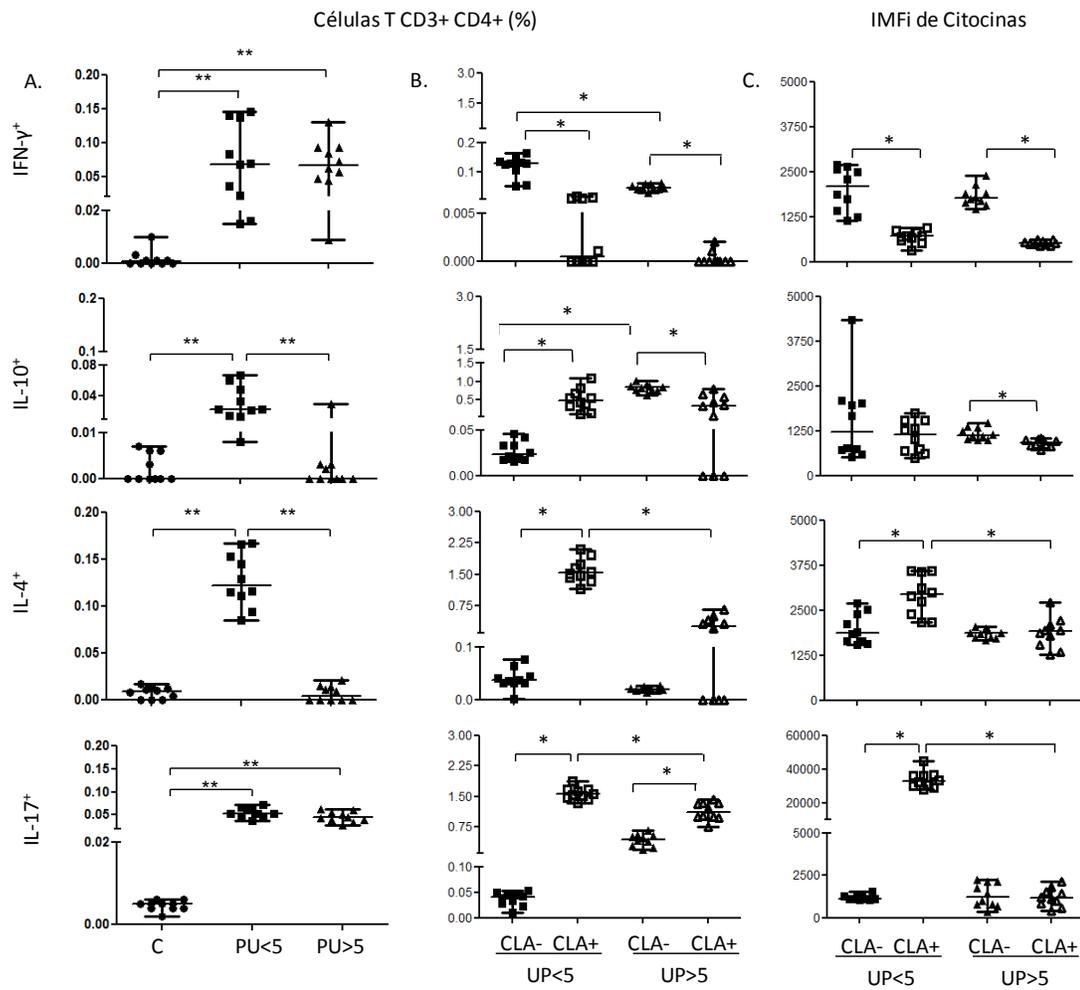
En el grupo de pacientes con más de 5 años de evolución de la enfermedad, fue encontrada una mayor frecuencia de LT CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> productores de IL-17 (p<0,0001) y de LT CD4<sup>+</sup> CLA<sup>-</sup> productores de IL-10 (p=0,0002) e IFN $\gamma$  (p=0,0002). (Tabla 6, figura 13B).

Al realizar la comparación de estas poblaciones celulares entre los grupos de pacientes se observó que la frecuencia de LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> productores de IL-17 ( $p < 0,0001$ ), IL-4 ( $p < 0,0001$ ) y LT CD4<sup>+</sup> CLA<sup>-</sup> productores de IFN $\gamma$  ( $p = 0,0003$ ) era mayor en el grupo de menos de 5 años de evolución de la enfermedad, mientras que la de LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>-</sup> productores de IL-10 era menor en dicho grupo ( $p = 0,0002$ ) (Tabla 6, figura 13B).

En cuanto a la MIFi se observó una mayor expresión de IL-17 ( $p = 0,0002$ ) e IL-4 ( $p = 0,0007$ ) en LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> comparada con LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>-</sup> de pacientes con menos de 5 años de evolución, la cual a su vez, fue mayor que la observada en pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad tanto para IL-17 ( $p < 0,0001$ ) como IL-4 ( $p = 0,0002$ ), mientras que se encontró una mayor expresión de IL-10 ( $p = 0,0005$ ) en LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>-</sup> en pacientes con más de 5 años de evolución de la enfermedad y de IFN $\gamma$  en LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>-</sup> en ambos grupos de pacientes, UP $<5$  ( $p < 0,0001$ ) y UP $>5$  ( $p < 0,0001$ ) al ser comparadas con LT CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> (Tabla 7, figura 13C).

**Tabla 7.** iMFI de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> Y CLA<sup>-</sup> productores de citocinas.

	CLA-				CLA+			
	IL-10	IL-17	IL-4	IFN $\gamma$	IL-10	IL-17	IL-4	IFN $\gamma$
UP $<5$	919 (729- 1044)	1138 (1090- 1565)	1869 (1547- 2690)	2085 (1140- 2698)	1147 (496- 1731)	32640 (27890- 44790)	(2938 (2166- 3599)	707 (320- 945)
UP $>5$	1128 (1001- 1467)	1221 (345- 2243)	1857 (1674- 2045)	1770 (1478- 2395)	919 (729- 1044)	1188 (432- 2133)	1905 (1269- 2711)	514 (444- 623)



**Figura 13. Perfil de citocinas de LT CD4<sup>+</sup> en UPPP:** Frecuencia de LT CD4<sup>+</sup> productores de IL10, IL-17, IL-4 e IFN $\gamma$  en el grupo de controles (n=10) y pacientes divididos por tiempo de evolución de la enfermedad: menores de 5 años de evolución (UP<5) (n=10) y mayores de 5 años de evolución (UP>5) (n=10) (A). Frecuencia de LT CD4<sup>+</sup> productores de IL10, IL-17, IL-4 e IFN $\gamma$  con respecto a la expresión del marcador de migración a piel (CLA) en el grupo de pacientes por tiempo de evolución de la enfermedad (B). IMFi de IL10, IL-17, IL-4 e IFN $\gamma$  en LT CD4<sup>+</sup> productores de citocinas con respecto a la expresión del marcador de migración a piel (CLA) en el grupo de pacientes por tiempo de evolución de la enfermedad (C) \* p<0.05 \*\* p<0.01.

## 9. DISCUSION

Estudios realizados con respecto al papel de las CD4 en las enfermedades alérgicas en los que se ha considerado la variación de la frecuencia de esta población en circulación, han revelado que el número de CD4 circulantes puede encontrarse reducido en niños en comparación con controles sanos. Esta reducción puede deberse principalmente a la ubicación de estas células en los sitios de inducción de la respuesta inmune (*Upham, 2002, Hagendorens, 2003; Farrel, 2007*).

La disminución de CD4 circulantes observada en los pacientes con UPPP puede ser debida a que estas células se encuentran en un alto estado de migración hacia los sitios de lesión donde se concentran para inducir y mantener la respuesta alérgica y donde continuamente se hace necesario el reclutamiento de este tipo de células para reemplazar aquellas que migran a órganos linfoides secundarios donde ocurre la presentación a los LT, contribuyendo al mantenimiento de la homeóstasis tisular.

Sin embargo, al analizar las subpoblaciones de CD4<sup>hi</sup> y CD4<sup>lo</sup> se observa una tendencia a encontrarse un mayor recuento absoluto de estas células en pacientes con más de 5 años de evolución, lo cual podría relacionarse con una menor severidad de la enfermedad observada en estos pacientes.

Los LTreg naturales corresponden a otra población celular que juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune inflamatoria.

La frecuencia absoluta reportada de LTreg en sangre periférica de pacientes con enfermedades atópicas no es consistente. En adultos existen reportes de

frecuencias absolutas aumentadas en pacientes con dermatitis atópica (*Ou, 2004; Reefer, 2007*) o no se encuentran diferencias en pacientes con rinoconjuntivitis (*Bellinghausen, 2003; Domdey, 2010; Grindebacke, 2004; Ling, 2004*), asma (*Shi, 2004*), o alergia a la leche de vaca (*Mori, 2010*) con respecto a los controles sanos.

Otros reportes muestran que en niños asmáticos se encuentra un aumento de esta población celular, aunque con insuficiente actividad funcional al comparar con controles sanos (*Lin, 2008*). Los niños con alergia clínicamente activa a la leche de vaca e individuos asmáticos tienen una menor frecuencia de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> circulantes que los niños asintomáticos (*Karlsson, 2004; Lee, 2007*). En niños con alergia al huevo tampoco se han encontrado diferencias en la frecuencia de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> al ser comparados con controles sanos (*Smith, 2008*).

Los resultados obtenidos en pacientes con UPPP muestran que no hay diferencias en las frecuencias relativa y absoluta de esta población al comparar con controles sanos. Este hallazgo podría sugerir que aparentemente los LTreg circulantes de pacientes con UPPP no presentan un desbalance a nivel de recuento absoluto en sangre periférica, que pudiera estar involucrado en la desregulación inmune observada en esta patología.

Reportes acerca de la función de los LTreg naturales en asma no han encontrado diferencias en la capacidad de suprimir respuestas de células efectoras entre individuos sanos y pacientes asmáticos adultos (*Shi, 2004*) confirmando las observaciones iniciales (*Ling, 2004*).

George y colaboradores analizaron si en determinadas condiciones la función supresora de los LTreg naturales se encuentra inactiva o si un incremento en el estímulo desencadena un escape de la respuesta

supresora por las células efectoras. Usando un modelo murino con fuerte estimulación antigénica específica se demostró que los LTregs reducen parcialmente la producción de citocinas por las células efectoras, pero no son eficientes para inhibir la proliferación de estas células (*George, 2003*).

Sin embargo, el hecho que existan frecuencias normales y funciones intactas en LTregs naturales excepto frente a altas concentraciones de alergenos implica que mecanismos adicionales pueden estar involucrados en esta regulación, tales como los LTr1 productores de IL-10 (*Akdis, 1998; Bellinghausen, 1997*).

Los resultados obtenidos en pacientes con UPPP muestran que al depletar células CD25<sup>+</sup>, población en la que se encuentran los LTreg, no se observan diferencias en la actividad proliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> frente al estímulo con un extracto de cuerpo completo de pulga lo que sugiere que los LTreg naturales no participan en la evolución de la UPPP, por lo menos inhibiendo la proliferación de LT CD4<sup>+</sup>. Estos datos concuerdan con lo reportado en pacientes alérgicos al polen de *Betula sp.* (*Abedul*), independiente de si han sido sometidos a inmunoterapia exitosa (*Mobs, 2010*)

La evaluación de la respuesta linfoide a alergenos ha mostrado que tanto los individuos sanos como los pacientes alérgicos tienen LT específicos productores de citocinas sin embargo, en los pacientes se ha mostrado la polarización de la respuesta específica a alergenos hacia un fenotipo Th2 (*Tsuge, 2006*) asociado con disminución en la frecuencia de células productoras de IFN $\gamma$  (*Bordignon, 2005; Bullens, 2005; Scott-Taylor, 2005*).

En este estudio, la evaluación de la respuesta contra el extracto de cuerpo completo de pulga mostró que las células de los pacientes con UPPP secretaron IL-4, IFN $\gamma$ , IL-17 e IL-10, lo cual indica que estas citocinas están

implicadas en el desarrollo de la enfermedad sin determinar una polarización definida.

Algunos trabajos han mostrado que en la respuesta de citocinas por LT CD4<sup>+</sup> específicas para Der p 1, un alérgeno de *Dermatophagoides pteronyssinus*, las células CLA<sup>+</sup> de pacientes alérgicos producen de forma predominante citocinas Th2 como IL-4, IL-13 e IL-5 al comparar con los LT de los controles sanos (Seneviratne, 2007). También se ha reportado un incremento en LT CD4<sup>+</sup> productores de IL-13, IL-5 y TNF- $\alpha$  y disminución en las células productoras de IFN $\gamma$ , principalmente en células CLA<sup>+</sup> de pacientes con dermatitis atópica y en células CLA<sup>-</sup> de niños asmáticos (Antúnez, 2006). Estos hallazgos indican variaciones en los mecanismos que median diferentes enfermedades alérgicas.

En los pacientes con UPPP se observó una mayor producción de IL-4, lo cual podría relacionarse con un predominio de respuesta Th2 en los LT CLA<sup>+</sup>, especialmente en pacientes con menor tiempo de evolución de la enfermedad y una disminución de esta respuesta a mayores tiempos de evolución. Estos hallazgos podrían indicar que a medida que los pacientes se acercan a la desensibilización, la respuesta Th2 es negativamente regulada y esto podría asociarse con la adquisición de tolerancia a los antígenos de pulga.

Respecto a la producción de IFN $\gamma$  por LTh1 llama la atención que en los dos grupos de pacientes se encuentra una muy baja proporción de células productoras de esta citocina en la población CLA<sup>+</sup> mientras esta proporción es mayor en las células CLA<sup>-</sup> sin embargo, contrario a lo esperado, los pacientes con más de cinco años de evolución de la enfermedad tienen una menor frecuencia de LTh1 CLA<sup>-</sup> que los pacientes con menos de cinco años de evolución de la enfermedad. Estas frecuencias celulares pueden indicar

que la producción de IFN $\gamma$  puede ser un reflejo del proceso inflamatorio, más que un mecanismo de regulación de la respuesta alérgica específica a los antígenos de pulga en estos pacientes.

La IL-17 ha sido descrita como una citocina capaz de activar las células epiteliales durante la respuesta inflamatoria (*Louten, 2009*) y se ha relacionado con la enfermedad alérgica sin embargo, el papel de los LTh17 en alergia es aun controversial.

Frecuencias aumentadas de LT productores de IL-17 han sido reportados en sangre periférica de pacientes con rinitis alérgica (*Ciprandi, 2010*) y asma (*Wong, 2009*). También se han encontrado LTh17 específicos de alérgeno en sangre periférica de pacientes con dermatitis atópica y su frecuencia parece correlacionarse con la severidad de la enfermedad (*Koga, 2008*).

Los resultados obtenidos muestran un incremento en la frecuencia de LTh17 con potencial de migración a piel en pacientes con menor tiempo de evolución de la enfermedad sugiriendo que esta población se encuentra involucrada activamente en el desarrollo de la UPPP así como una posible contribución con el mantenimiento de la respuesta Th2.

Teniendo en cuenta que se encuentra una proporción significativamente menor de estos LT en pacientes con más de cinco años de evolución de la enfermedad, comportándose de forma similar a los LT productores de IL-4, podemos sugerir que la disminución de la respuesta alérgica en pacientes que se acercan al estado de tolerancia frente a los antígenos de pulga, se asocia con disminución de la población específica de LTh17.

La IL-10 modula muchas células y funciones efectoras asociadas con la enfermedad alérgica que incluyen activación de LTh2, función de mastocitos

(Arock, 1996; Royer, 2001) y eosinófilos (Takanaski, 1994), producción de IgG e IgE (Jeannin, 1998; Nouri-Aria, 2004) y se piensa que tiene un papel en la regulación de homeostasis inmune pulmonar (Akbari, 2001). Consistente con estos resultados se ha mostrado una asociación inversa entre los niveles de IL-10 y la severidad de la enfermedad alérgica y asmática (Borish, 1996; Heaton, 2005).

De modo interesante el efecto supresor de la IL-10 no fue observado en otras citocinas de la familia de la IL-10 como IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24 (Oral, 2006). Adicional al efecto sobre los LT, la IL-10 también ejerce un efecto inhibitorio sobre los macrófagos y monocitos activados (de Waal Malefyt, 1991). Ha sido observado en monocitos y CD4 que la IL-10 suprime la expresión de moléculas coestimuladoras y de moléculas del CMH clase II en las células presentadoras de antígeno (Moore, 2001).

Los reportes sobre la detección de LT productores de IL-10 son controversiales. Algunos muestran que hay respuesta de IL-10 por pacientes alérgicos a *Lolium sp* (pastos), pero no en individuos no atópicos (Domdey, 2010). Otros muestran la detección de LT específicas de alérgeno productoras de IL-10 en controles sanos (Van Overtvelt, 2008).

Los resultados de este trabajo, muestran una relación inversa en la frecuencia de LT productores de IL-10 en pacientes con diferentes tiempos de evolución de la enfermedad. En las etapas iniciales los LT productores de esta citocina inducidos por antígeno son predominantes en las poblaciones que migran a la piel, pero a medida que aumenta la evolución de la enfermedad esta proporción es mayor en LT CLA<sup>+</sup>. Este evento asociado a la disminución de la respuesta Th2 en pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad puede indicar que la tolerancia a los antígenos de pulga se asocia con un control a nivel sistémico que se relaciona con una

menor actividad de los LTh2 y aumento en la proporción de LTreg productoras de IL-10.

## 10. PROPUESTA DE UN MODELO EXPLICATIVO DEL DESARROLLO DE LA UPPP

Respecto al planteamiento de un modelo que explique la respuesta inmune involucrada en la UPPP (figura 14) es posible sugerir que el desarrollo de esta patología involucra una fase inicial caracterizada por activación de CD8 residentes en piel ocasionada por el reconocimiento del alérgeno bajo la influencia de mediadores secretados por los queratinocitos. Algunos de estos mediadores podrían ser citocinas que contribuyen al desarrollo de respuesta predominante Th2 como la TSLP previamente descrita en otras enfermedades alérgicas (*Liu, 2007*).

Adicional a la activación de las CD8 es posible que ocurra también la activación de mastocitos tisulares mediante la activación de receptores para IgE, receptores tipo Toll, factores de crecimiento, moléculas del complemento, esfingosina y citocinas (*Bischoff, 2007*). Un aspecto importante en la activación de los mastocitos ha sido observado en ratón, demostrando que estas células pueden migrar al nódulo linfóide proximal después del estímulo antigénico en piel y localizarse en las regiones de las células T (*Wang, 1998*) lo cual podría influenciar la activación linfóide mediante la secreción de mediadores que favorecen la polarización Th2 (*Bischoff, 2007*) y Th17 (*Park, 2005*).

La liberación de mediadores locales que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias podría mediar también el ingreso al tejido de basófilos. Evidencias recientes muestran en el modelo murino que basófilos activados son reclutados a los nódulos linfoides drenantes y son necesarios para la

inducción de respuesta linfoide Th2 mediante la secreción de IL-4 y TSLP (Sokol, 2008).

Después de su activación las CD4 residentes en piel migran a los nódulos linfoides (NL) donde presentan los péptidos a los LT vírgenes que se diferencian predominantemente a fenotipos Th2 y Th17. Convencionalmente se ha considerado que la adquisición de receptores de migración tejido específicos por los LT ocurre en los NL casi paralelamente con la activación del LT vírgen y que este proceso es regulado por CD4 drenantes de los tejidos (Mora, 2003; Dudda, 2004; Syrbe, 2004; Mora, 2005).

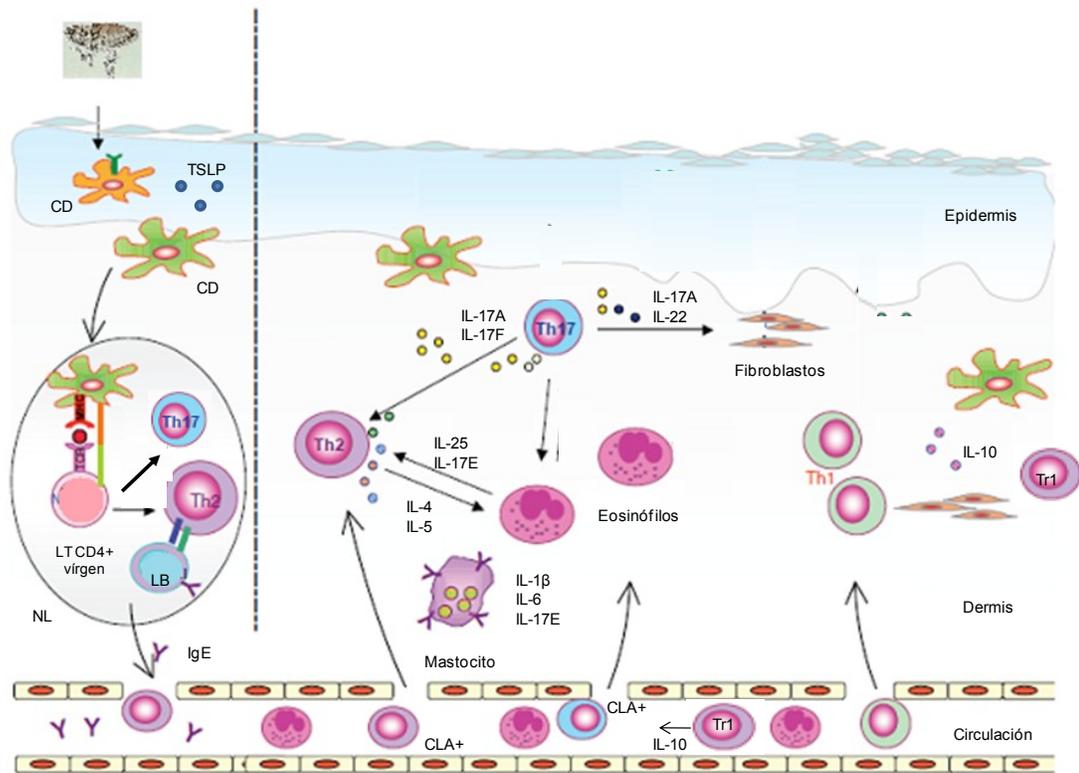
Bajo condiciones inflamatorias los mediadores proinflamatorios como IL-1 y TNF- $\alpha$  sobrerregulan la expresión de moléculas de adhesión como E-selectina e ICAM-1 en la superficie de las células endoteliales. Las interacciones CLA / E-selectina son requeridas para la migración transendotelial de LT CLA<sup>+</sup> circulantes (Santamaría-Babi, 1995; Robert, 1999).

Una vez sensibilizado el individuo y considerando que en la piel se encuentra una gran cantidad de LT de memoria (Clark, 2006) un nuevo reto antigénico desencadena una respuesta local caracterizada por predominio de citocinas Th2 y posiblemente reclutamiento de LTh9 y LTh22 alrededor de la picadura, amplificando el proceso inflamatorio que no solo depende de los LT sino de la presencia de mastocitos sensibilizados y el reclutamiento de eosinófilos (García, 2004), los cuales a su vez producen IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17E. Esta última es capaz de expandir el número de LTh2 e incrementar la producción de citocinas Th2 (Wang, 2007). La IL-1 $\beta$  e IL-6 junto con TGF- $\beta$ , citocinas que han sido encontradas en lesiones cutáneas de modo adicional podrían favorecer la producción de IL-17 (Toda, 2003; Bettelli, 2006; Mangan, 2006; Veldhoen, 2006).

Los LT productores de IL-10 inducidos por antígeno son predominantes en las poblaciones que migran a la piel (CLA+) en las etapas iniciales de la enfermedad pero a medida que evoluciona la enfermedad, esta proporción es mayor en células CLA-. Esto indica que el mecanismo de regulación por IL-10 podría depender de los cambios asociados a la compartimentalización de la respuesta inmune a través del tiempo, así como del contacto repetido con los antígenos de pulga, situación que podría ser comparada con la inmunoterapia alérgeno-específica exitosa, la cual, se ha asociado con la producción de IL-10 en pacientes alérgicos, como ha sido observado en individuos alérgicos al polen de *Betula sp.* (Abedul), donde la inmunoterapia induce aumento de LT productores de IL-10, al final de la fase de inducción (Mobs, 2010).

En apoyo de lo anteriormente mencionado, es importante mencionar que en niños alérgicos también se ha visto que la inmunoterapia induce incremento en la producción de IL-10 (Eifan, 2010). Además, se ha mostrado que las CD4 diferenciadas en presencia de IL-10 y pulsadas con alérgenos inducen poblaciones de células reguladoras (Pacciani, 2010).

Figura 14. Modelo del desarrollo de la urticaria papular por picadura de pulga



## **11. CONCLUSION**

El aumento en los recuentos absolutos de CD<sub>4</sub>, la disminución de la frecuencia de LT efectoras CLA<sup>+</sup> (IL-4, IL-17) y el aumento en la frecuencia de linfocitos con potencial regulador CLA<sup>-</sup> (IL-10) a mayor tiempo de evolución de la enfermedad, sugieren un mecanismo de regulación por IL-10 que aumenta en la respuesta sistémica.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Akbari O, DeKruyff R, Umetsu D. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol.* 2001;2:725-31.
- Akbari O, Stock P, DeKruyff R, Umetsu D. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol.* 2003;15: 627-33.
- Akdis C, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest.* 1998;102:98-106.
- Akdis C, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:735-46.
- Akkoc T, de Koning P, Ruckert B, Barlan I, Akdis M, Akdis C. Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121:652-8.
- Allan S, Crome S, Crellin N, Passerini L, Steiner T, Bacchetta R, Roncarolo M, Levings M. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 2007;19:345-54.
- Anderson C, Oukka M, Kuchroo V, Sacks D. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> Th1 cells are the source of IL-10 mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2007;204:285-97.
- Annacker O, Burlen-Defranoux O, Pimenta-Araujo R, Cumano A, Bandeira A. Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral

activated/memory CD4 T cell compartment. *J Immunol.* 2000;164:3573-80.

- Antúnez C, Torres M, Mayorga C, Corzo J, Jurado A, Santamaría-Babi L, Vera A, Blanca M. Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in children with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006;17:166-74.
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002;3:756-63.
- Apostolou I, Von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med.* 2004;199:1401–08.
- Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, Benhamou M, Pretolani M. Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol.* 1996; 26:166–70.
- Asseman C, Mauze S, Leach M, Coffman R, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 1999;190:995–1004.
- Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245-52.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
- Bellinghausen I, Metz G, Enk A, Christmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol.* 1997;27:1131–9.
- Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:862–68.

- Berg E, Yoshino T, Rott L, Robinson M, Warnock R, Kishimoto T, Picker L, Butcher E. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1991;174:1461-6.
- Berlin C, Berg E, Briskin M, Andrew D, Kilshaw P, Holzmann B, Weissman I, Hamann A, Butcher E.  $\alpha 4\beta 7$  integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*. 1993;74:185–95.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T, Oukka M, Weiner H, Kuchroo V. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235–38.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V. T<sub>H</sub>-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8:345–50.
- Bischoff S. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:93-104.
- Bordignon V, Sinagra J, Trento E, Pietravalle M, Capitanio B, Cordiali Fei P. Antigen specific cytokine response in pediatric patients with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:113-20.
- Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97:1288–96.
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua M, Rossini P, Battistini L, Röttschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110:1225–32.

- Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf A, Geffers R, Beissert S, Loser K. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2004;34:623–30.
- Brunkow M, Jeffery E, Hjerrild K. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, Scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27:68-73.
- Bullens D, De Swertd A, Dilissen E, Kasran A, Kroczeck R, Cadot P, Casaer P, Ceuppens J. House dust mite-specific T cells in healthy non-atopic children. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1535-41.
- Cahalan M, Gutman G. The sense of place in the immune system. *Nat Immunol*. 2006;7:329-32.
- Campbell J, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew D, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher E. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*. 1999;400:776–80.
- Caron G, Delneste Y, Roelandts E. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J Immunol*. 2001;167:3682-86.
- Casas L, Cuéllar A, García E, Halpert E, Rodríguez A, Satizábal C, Gómez A. Asociación de polimorfismos de la región promotora del gen de la interleucina 10 con la urticaria papular por picadura de pulga. *Univ Med*. 2009;50:275-83.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*. 1996;184:695–706.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to

inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999;5:919-23.

- Chen Y, Kuchroo V, Inobe J, Hafler D, Weiner H. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994;265:1237–40.
- Ciprandi G, Filaci G, Battaglia F, Fenoglio D. Peripheral Th-17 cells in allergic rhinitis: New evidence. *Int Immunopharmacol.* 2010;10:226-9.
- Clark R, Chong B, Mirchandani N, Brinster N, Yamanaka K, Dowgiert R, and Kupper T. The vast majority of CLA<sup>+</sup> T cells are resident in normal skin. *J Immunol.* 2006;176:4431–39.
- Coffman R, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol.* 1986; 136: 949-54.
- Collison L, Workman C, Kuo T, Boyd K, Wang Y, Vignali K, Cross R, Sehy D, Blumberg R, Vignali D. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450:566–69.
- Cookson W, Moffatt M. Making sense of asthma genes. *N Engl J Med.* 2004;351:1794–96.
- Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo V, Berneman Z. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82:1365-74.
- Cua D, Sherlock J, Chen Y. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;42:744-8.
- Cuéllar A, García E, Rodríguez A, Halpert E, Gómez A. Functional dysregulation of dendritic cells in patients with papular urticaria caused by flea bite. *Arch Dermatol.* 2007;143:1415-19.

- Cuéllar A, Rodríguez A, Rojas F, Halpert E, Gómez A, García E. Differential Th1/Th2 balance in peripheral blood lymphocytes from patients suffering from flea bite-induced papular urticaria. *Allergol et Immunopathol.* 2009;37:7-10.
- Cuéllar A, Rodríguez A, Halpert E, Rojas F, Gómez A, Rojas A, García E. Specific pattern of flea antigen recognition by IgG subclass and IgE during the progression of papular urticaria caused by flea bite. *Allergol Immunopathol.* 2010. [Epub ahead of print].
- Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel R. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9:1347-55.
- Darrah P, Patel D, De Luca P, Lindsay R, Davey D, Flynn D, Hoff S, Andersen P, Reed S, Morris S, Roederer M, Seder R. Multifunctional Th1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat med.* 2007;13:843-50.
- De la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2005;34:2480–88.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor C, de Vries J. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174:1209-20.
- Deaglio S, Dwyer K, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V, Strom T, Robson S. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204:1257–65.

- Dhodapkar M, Steinman R, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;193:233-8.
- Dillon S, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell S. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol*. 2004;5:752-60.
- Domdey A, Liu A, Millner A, Lund K, Jacobi H, Malling H, Søndergaard I, Würtzen P. The T Cell Response to Major Grass Allergens Is Regulated and Includes IL-10 Production in Atopic but Not in Non-Atopic Subjects. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152:243–54.
- Dudda J, Simon J, Martin S. Dendritic cell immunization route determines CD8<sup>+</sup> T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol*. 2004;172: 857–63.
- Duthoit C, Mekala D, Alli R, Geiger T. Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4<sup>+</sup> T cells by regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol*. 2005;174:155–63.
- Eifan AO, Akkoc T, Yildiz A, Keles S, Ozdemir C, Bahceciler NN, Barlan IB. Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:922-32.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham S, Schmidt-Weber C, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*. 2009;119:3573–85.
- Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M. The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch*. 2003;443:703–17.

- Fallarino F, Grohmann U, Hwang K, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna M, Fioretti M, Alegre M, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:1206–12.
- Farrell E, O'Connor T, Duong M, Watson R, Strinich T, Gauvreau G, O'Byrne P. Circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells after allergen inhalation in asthmatic subjects. *Allergy.* 2007;62:1139-45.
- Feuerer M, Hill J, Mathis D, Benoist C. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat rev immunol.* 2009;10:689-95.
- Finotto S, Neurath M, Glickman J, Qin S, Lehr H, Green F. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science.* 2002;295:336-8
- Fontenot J, Gavin M, Rudensky A. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4: 330-6.
- Fort M, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski S, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst S, Zurawski G, Leach M, Gorman D, Rennick D. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity.* 2001;15:985-95.
- Fujio K, Nosaka T, Kojima T. Molecular cloning of a novel type 1 cytokine receptor similar to the common gamma chain. *Blood.* 2000;95:2204-10.
- Galli S, Tsai M, Piliponsky A. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008;454:445-54.
- Garcia E, Halpert E, Rodriguez A, Andrade R, Fiorentino S, Garcia C. Immune and histopathologic examination of flea bite-induced papular urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;92:446-52.

- Garin M, Chu C, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler R. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Blood*. 2007;109:2058–65.
- Gavin M, Clarke S, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2002;3:33-41.
- Gavin M, Torgerson T, Houston E, deRoos P, Ho W, Stray-Pedersen A, Ocheltree E, Greenberg P, Ochs H, Rudensky A. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:6659–64.
- George T, Bilsborough J, Viney J, Norment A. High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *Eur J Immunol*. 2003;33:502–11.
- Grindebacke H, Wing K, Andersson A, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A. Defective suppression of TH2 cytokines by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1364–72.
- Grossman W, Verbsky J, Tollefsen B, Kemper C, Atkinson J, Ley T. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. 2004;104:2840–48.
- Grouard G, Rissoan M, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu Y. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997;185:1101-11.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries J, Roncarolo M. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737–42.
- Groux H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation*. 2003;75:8S–12S.

- Gutzmer R, Langer K, Lisewski M. Expression and function of histamine receptors 1 and 2 on human monocyte-derived dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:524-31.
- Hagendorens M, Ebo D, Schuerwegh A, Huybrechs A, Van Bever H, Bridts C, De Clerck L, Stevens W. Differences in circulating dendritic cells subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:633-39.
- Harrington L, Hatton R, Mangan P, Turner H, Murphy T, Murphy K. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6:1123-32.
- Hawrylowicz C, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Rev Immunol.* 2005;5:271–83.
- Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse R, de Klerk N, Suriyaarachchi D, Serralha M, Holt B, Hollams E, Yerkovich S. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of *in-vitro* T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet.* 2005;365:142–49.
- Hellings P, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:42-50.
- Holgate S, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:218-30.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61.

- Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Adv Immunol.* 2003;81:331-71.
- Hosoe N, Miura S, Watanabe C, Tsuzuki Y, Hokari R, Oyama T, Fujiyama Y, Nagata H; Ishii I. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninflamed intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:458–66.
- Hudak S, Hagen M, Liu Y, Catron D, Oldham E, McEvoy D, Bowman E. Immune Surveillance and Effector Functions of CCR10<sup>+</sup> Skin Homing T Cells. *J Immunol.* 2002;169:1189-96.
- Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman R. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:3038–42.
- Jahnsen F, Lund-Johansen F, Dunne J, Farkas L, Haje R, Brandtzaeg P. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123<sup>high</sup>) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol.* 2000;165:4062-68.
- Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat J, Bonnefoy J. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol.* 1998;160:3555–61.
- Joetham A, Takada K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, Rha Y, Dakhama A, Gelfand E. Naturally occurring lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-β1. *J Immunol.* 2007;178:1433–42.

- Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2001;22:394-400.
- Jutel A, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszczyk M, Blaser K. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2003;33:1205-14.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt R, Kastelein R, Bazan F, Liu Y. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001;194:863-9.
- Kakkar R, Lee R. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:827-40.
- Karlsson M, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med.* 2004;199:1679-88.
- Khattri R, Cox T, Yasayko S, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4:337-42.
- Kobie J, Shah P, Yang L, Rebhahn J, Fowell D, Mosmann T. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol.* 2006;177:6780-86.
- Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2008;128:2625-30.
- Kursar M, Koch M, Mittrücker H, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T, Kaufmann S. Cutting Edge: regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2007;178:2661-65.

- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 2000;1:311-6.
- Langrish C, Chen Y, Blumenschein W. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201:233-40.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell.* 2001;106:263–6.
- Larche M, Akdis C, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:761-71.
- Larsen J, Bonefeld C, Poulsen S, Geisler C, Skov L. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:486-92.
- Lee J, Yu H, Wang L, Yang Y, Lin Y and Chiang B. The levels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma *Clin Exp Immunol.* 2007;148:53-63.
- Li M, Wan Y, Flavell R. T cell-produced transforming growth factor-β1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;26:579–91.
- Lin Y, Shieh C, Wang J. The functional insufficiency of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-α modulation. *Allergy.* 2008;63:67-74.
- Ling E, Smith T, Nquyen X, Pridegeon C, Dallman M, Arbery J, Carr V, Robinson D. Relation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* 2004;363:608–15.
- Liu W, Putnam A, Xu-yu Z, Szot G, Lee M, Zhu S, Gottlieb P, Kapranov P, Gingeras T, Fazekas de St. Groth B, Clayberger C, Soper D, Ziegler S, Bluestone J. CD127 expression inversely correlates with

FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203:1701–11.

- Liu Y. Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:238-44.
- Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:1004-11.
- Maloy K, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*. 2001;2:816-22.
- Mangan P, Harrington L, O'Quinn D, Helms W, Bullard D, Elson C. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441:231-4.
- Martín-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;188:31-49.
- Martinez F. The coming-of-age of the hygiene hypothesis. *Respir Res* 2001;2:129-32.
- Mazzone A, Young H, Spitzer J, Visintin A, Segal D. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest*. 2001;108:1865-73.
- Mellor A, Munn D. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Rev Immunol*. 2004;4:762–74.
- Möbs C, Slotoch C, Löffler H, Jakob T, Hertl M, Pfützner W. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *J Immunol*. 2010;184:2194-203.
- Moore K, de Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.

- Mora J, Bono M, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh L, Roseblatt M, Von Andrian U. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*. 2003;424:88–93.
- Mora J, Cheng G, Picarella D, Briskin M, Buchanan N, von Andrian U. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med*. 2005;201:303–16.
- Morgan M, van Bilsen J, Bakker A, Heemskerk B, Schilham M, Hartgers F, Elferink B, van der Zanden L, de Vries R, Huizinga T, Ottenhoff T, Toes R. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*. 2005;66:13–20.
- Mori F, Bianchi L, Pucci N, Azzari C, De Martino M, Novembre E. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells are not involved in oral desensitization. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010;23:359-61.
- Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-57.
- Mosmann T, Coffman R. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
- Nouri-Aria A, Wachholz P, Francis J, Jacobson M, Walker S, Wilcock L. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol*. 2004;172:3252–59.
- O'Garra A, Barrat FJ, Castro A, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL 10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev*. 2008;223:114-31.

- Oral H, Kotenko S, Yilmaz M, Mani O, Zumkehr J, Blaser K. Regulation of T cells and cytokines by the interleukin-10 (IL-10)-family cytokines IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Eur J Immunol.* 2006;36:380-8.
- Ou L, Goleva E, Hall C, Leung D. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:756-63.
- Pacciani V, Gregori S, Chini L, Corrente S, Chianca M, Moschese V, Rossi P, Roncarolo MG, Angelini F. Induction of anergic allergen-specific suppressor T cells using tolerogenic dendritic cells derived from children with allergies to house dust mites. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:727-36.
- Pandey A, Ozaki K, Baumann H. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol.* 2000;1:59-64.
- Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature Immunol.* 2007;8:1353–62.
- Park L, Martin U, Garka K. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med.* 2000;192:659-70.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang S, Nurieva R, Wang Y. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6:1133-41.
- Paul W, Seder R. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 1994;76:241-51.
- Peck A, Mellins E. Precarious Balance: Th17 Cells in Host Defense. *Infect Immun.* 2010;78:32-38.

- Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192:295–302.
- Reefer A, Satinover S, Nguyen J, Solga M, Lannigan J, Wilson B, Woodfolk J. Analysis of discrete regulatory T cell subsets in patients with atopic dermatitis reveals Th2-promoting properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:S238.
- Reid C, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34<sup>+</sup> progenitors in human bone marrow. *J Immunol*. 1992;149:2681–88.
- Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL/ DR5-dependent suppression induced by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Cell Death Differ*. 2007;14:2076–84.
- Rissoan M, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu Y. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999;283:1183–66.
- Robert C, Kupper T. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med*. 1999;341:1817-28.
- Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson J, Kantelip J, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:694–704.
- Rubtsov Y, Rasmussen J, Chi E, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson W, Muller W, Rudensky A. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 2008;28:546–58.

- Ruiz-Maldonado R, Tamayo L. Prurigo infantil por insectos. Estudio de 300 casos. *Rev Mex Pediatr.* 1973;42:743-59.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-64.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101:455-58.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-62.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3<sup>-</sup> expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-52.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179:1109-18.
- Santamaria Babi L, Moser R, Perez Soler M, Picker L, Blaser K, Hauser C. Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *J Immunol* 1995;154:1543-50.
- Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int.* 2007;56:183-91.

- Schotte, R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Blom B. The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med.* 2004;200:1503–09.
- Scott-Taylor T, Hourihane J, Harper J, Strobel S. Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:1473-80.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006;203:1693–1700.
- Seder R, Darrah P, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. *Nat rev immunol.* 2008;8:247-59.
- Seneviratne S, Black AP, Jones L, Bailey A, Ogg G. The role of skin-homing T cells in extrinsic atopic dermatitis. *QJM.* 2007;100:19-27.
- Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Linden A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33:248-53.
- Shevach E. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:423-49.
- Shevach E. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.* 2006; 25:195–201.
- Shi H, Li S, Xie Z, Qin X, Qin X, Zhong X. Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol.* 2004;113:172–8.
- Sims J, Williams D, Morrissey P. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med.* 2000;192:671-80.

- Smith M, Tourigny M, Noakes P, Thornton C, Tulic M, Prescott S. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo/-</sup> regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1460-66.
- Smyth M, Cretney E, Kelly J, Westwood J, Street S, Yagita H. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42:501-10.
- Sokol C, Barton G, Farr A, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol*. 2008;9:310-8.
- Soumelis V, Reche P, Kanzler H. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunol*. 2002;3:673-80.
- Spits H, Couwenberg F, Bakker A, Weijer K; Uittenbogaart C. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med*. 2000;192:1775–84.
- Steinman R, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* .1999;60:562-67.
- Stephens L, Mason D. CD25 is a marker for CD4<sup>+</sup> thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> subpopulations. *J Immunol*. 2000;165:3105-10.
- Strauss L, Bergmann C, Szczepanski, Gooding W, Johnson J, Whiteside T. A unique subset of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-β1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4345–54.

- Suzuki Y, Orellana M, Schreiber R, Remington J. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1988;240:516-18.
- Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, Richter A, Radbruch A, Hamann A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4<sup>+</sup> T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood*. 2004;104:3243–48.
- Tadokoro C, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino A, Maraver A, Lafaille J, Dustin M. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med*. 2006;203:505–11.
- Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med*. 1994;180:711–15.
- Thornton A, Shevach E. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188:287–96.
- Thorstenson K, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo* after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol*. 2001;167:188-95.
- Toda M, Leung D, Molet S, Boguniewicz M, Taha R, Christodoulopoulos P, Fukuda T, Elias J, Hamid Q. Polarized *in vivo* expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:875–81.
- Tosi M. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:241-59.
- Tran D, Ramsey H, Shevach E. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4<sup>+</sup>FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is

transforming growth factor- $\beta$ -dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 2007;110:2983–90.

- Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, Altnauer F, Simon H, Graeve T. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest*. 2000;106:25-35.
- Trautmann A, Schmid-Grendelmeier P, Kreuger K, Cramer R, Akdis M, Akkaya A. T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:329-37.
- Tsuge I, Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Yamada K, Urisu A. Allergen-specific helper T cell response in patients with cow's milk allergy: Simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:1538-45.
- Upham J, Denburg J, O'Byrne P. Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:818-823.
- Valenta R, Ball T, Focke M, Linhart B, Mothes N, Niederberger V, Spitzauer S, Swoboda I, Vrtala S, Westritschnig K, Kraft D. Immunotherapy of allergic disease. *Adv. Immunol*. 2004;82:105-53.
- Van Overtvelt L, Wambre E, Maillère B, von Hofe E, Louise A, Balazuc A, Bohle B, Ebo D, Leboulaire C, Garcia G, Moingeon P. Assessment of Bet v 1-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J Immunol*. 2008;180:4514-22.
- Veldhoen M, Hocking R, Atkins C, Locksley R; Stockinger B. TGF- $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24:179–89.

- Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J. Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008;9:1341-6.
- Vignali D, Collison L, Workman C. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:523-32.
- Walker M, Kasprovicz D, Gersuk V, Bènard A, Van Landeghen M, Buckner J, Ziegler S. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. *J Clin Invest*. 2003;112:1437-43.
- Walport M. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344:1058-66.
- Wang H, Tedla N, Lloyd A, Wakefield D, McNeil P. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J. Clin. Invest*. 1998;102:1617-26.
- Wang Y, Angkasekwinai P, Lu N, Voo K, Arima K, Hanabuchi S, Hippe C, Corrigan J, Dong C, Homey B. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*. 2007;204:1837–47.
- Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort E, Huizinga T, Toes R. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37:129–38.
- Watanabe N, Wang Y, Lee H, Ito T, Cao W, Liu Y. Hassall’s corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 2005;436:1181-85.
- Weil R, Israël A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:374-81.

- Wills-Karp M, Santeliz J, Karp C. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Rev. Immunol.* 2001;1:69–75.
- Wills-Karp M, Khurana G. Immunological mechanisms of allergic disorders. In: Paul WE (ed.) *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2003;1439-79.
- Wong C, Lun S, Ko F, Wong P, Hu S, Chan I, Hui D, Lam C. Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma. *Immunol Invest.* 2009;38:652-64.
- Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol*, 2004;11:1643–56.
- Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Cell Mol Immunol.* 2006;3:189-95.
- Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol.* 2004;16:915–28.
- Zarek P, Huang C, Lutz E, Kowalski J, Horton M, Linden J, Drake C, Powell J. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008;111:251–59.
- Zeytun A, Chaudhary A, Pardington P, Cary R, Gupta G. Induction of cytokines and chemokines by Toll-like receptor signaling: strategies for control of inflammation. *Crit Rev Immunol.* 2010;30:53-67.

- Zhu J, Paul W. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112:1557-69.