

Hallazgos clínicos e inmunológicos en pacientes con conjuntivitis alérgica crónica

Dra. Griselda Ibáñez-Valderrama, Dra. Concepción Santacruz-Valdés, Dr. Gustavo Aguilar-Velázquez, Dra. Marisela Linares, Dra. María C. Jiménez-Martínez

RESUMEN

Objetivo: Determinar la expresión de CD30 en linfocitos T CD8+ y la producción de citocinas antes y después de la estimulación antigénica.

Pacientes, material y métodos: Se incluyeron 12 pacientes con el diagnóstico de queratoconjuntivitis primaveral, dividiéndose en dos grupos de acuerdo con la reactividad a la prueba de Prick. Se determinó por citometría de flujo la frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+, IL-4 e IL-5 antes y después de la estimulación antigénica *in vitro*. Los resultados se analizaron con Sigma Stat, se consideró $p < 0.05$ estadísticamente significativa.

Resultados: Se desarrolló una escala análogo-visual para evaluar objetivamente los hallazgos oculares de los pacientes con conjuntivitis alérgica. La frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+ se incrementó en ambos grupos después de la estimulación antigénica. Los linfocitos CD8+CD30+ contribuyeron significativamente al microambiente Th2 (Tc2) con mayor frecuencia de células IL-4+/IL-5+ que los CD8+CD30-. Pacientes con reactividad a las pruebas cutáneas presentaron frecuencia mayor de células CD8+CD30+IL-4+ después de la estimulación antigénica ($p=0.019$).

Conclusiones: Los linfocitos T CD8+ de pacientes con conjuntivitis alérgica coexpresan CD30. Los resultados de este estudio sugieren que pacientes con similitudes clínicas oculares tienen diferencias inmunológicas demostradas *in vivo* por la reactividad cutánea a alérgenos e *in vitro* con un incremento en la frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+IL-4+.

Palabras clave: Conjuntivitis alérgica, Linfocitos T CD8+CD30+

SUMMARY

Objective: To determine CD30 expression on CD8+ T cells and cytokine production before and after antigenic stimulation *in vitro*.

Patients, materials and methods: We included 12 patients with clinical diagnosis of vernal keratoconjunctivitis, divided into two groups according to skin test reaction. Cytometric analysis was performed in mononuclear cells to determine the frequency of CD8, CD30, IL-4 and IL-5 before and after *in vitro* antigenic stimulation. Results were analyzed with Sigma Stat software and significant differences were considered when $p < 0.05$.

Results: Ocular findings in conjunctivitis allergic patients were objectively evaluated by developing a visual analogue scale. Frequency of CD8+CD30+ T cells was statistically increased in both groups after *in vitro* stimulation. CD8+CD30+ T cells contributed significantly to the Th2 microenvironment with high frequency of IL-4+ and IL-5+ cells (Tc2 cells) than CD8+CD30- T cells. Conjunctivitis allergic patients with skin reactivity produced after *in vitro* stimulation more IL-4 than patients without cutaneous reactivity ($p=0.019$).

Conclusions: This study allows linking the expression of CD30 on CD8+ T cells. We suggest that patients with clinical ocular similarities have immunological differences showed *in vivo* with the skin reactivity to allergens and, *in vitro*, with increased frequency CD8+CD30+IL-4+ T cells.

Key words: Allergic keratoconjunctivitis, CD8+CD30+ T cells.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas del ojo son un conjunto de alteraciones inflamatorias que, en México, constituyen un problema de salud ya que generan una morbilidad significativa en todas sus formas clínicas. En Estados Unidos la preva-

lencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado en los últimos años afectando entre 15 y 25% de la población, reportándose que existen 22 millones de casos nuevos anuales de alergia y de éstos el 32% manifiestan enfermedad ocular, especialmente niños y adultos jóvenes (1). En el Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana" las conjuntivitis alér-

gicas se encuentran como la cuarta causa de consulta oftalmológica (2). Por su alta frecuencia, se ha reconocido la necesidad del estudio de la inmunofisiopatología de las conjuntivitis alérgicas para poder ofrecer mejores alternativas de tratamiento.

El daño ocular está mediado por desgranulación de células como eosinófilos y células cebadas, sin embargo, la participación de linfocitos T CD4+ en la génesis de la inmunofisiopatología es fundamental (3). En otros modelos alérgicos se ha propuesto que los linfocitos T CD4+ responsables del desequilibrio inmunológico expresan en su superficie CD30 (4). CD30 es un marcador de superficie celular que se ha asociado con activación de clonas Th2 productoras de IL-5. (5).

Recientemente, Machura E y cols (6) sugirieron que los linfocitos T CD8+ juegan un papel importante en la patogénesis del asma. En la actualidad se desconoce el papel de los linfocitos T CD8+ en la inmunofisiopatología de las conjuntivitis alérgicas, si estos linfocitos también expresan la molécula CD30 y si tienen capacidad de producir citocinas asociadas a respuesta Th2, por lo que estos fueron los objetivos de nuestro estudio.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en este trabajo 12 pacientes con diagnóstico clínico de queratoconjuntivitis primaveral, dividiéndose en dos grupos: Grupo A, pacientes reactivos a pruebas cutáneas, al menos a *Dermatophagoides pteronyssimus*, Grupo B, pacientes no reactivos a pruebas cutáneas. A todos los pacientes que participaron en este estudio se les realizaron pruebas rutinarias para determinación de hipersensibilidad tipo I.

Este trabajo siguió los estatutos de la Declaración de Helsinki, siendo aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" (CC-011-2005). Todos los pacientes que participaron en este estudio dieron su consentimiento informado para la realización de las pruebas inmunológicas.

Material

El medio de cultivo RPMI-1640, saponina, las sales utilizadas en la preparación de los amortiguadores y la PMA/Ionomycin fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA) Los anticuerpos monoclonales contra los marcadores de superficie CD30, IL-4 e IL-5 FITC, -PE, fueron obtenidos de BD Biosciences (San Diego, CA, USA). El Lymphoprep (Ficoll con densidad de 1.077) fue obtenido de Nycomed Pharma As. (Nyegaard, Oslo, Norway). El suero fetal bovino fue obtenido de HyClone Labs. (Logan, TU, USA). Los anticuerpos anti- CD8 conjugados a PerCy5 fueron obtenidos de e-biosciences (San Diego, CA, USA). El piruvato de sodio, L-glutamina, 2-mercaptoetanol fueron de Gibco BRL. (Rockville, MD, USA). Las placas para cultivo de 24 pozos fueron obtenidas de Nalgene Nunc International, (Denmark).

Métodos

A todos los pacientes se les realizó una exploración oftalmológica completa, se seleccionó a los pacientes con diagnóstico clínico de conjuntivitis alérgica crónica (primaveral) y se realizó documentación fotográfica, iniciándose tratamiento oftalmológico convencional.

Pruebas cutáneas. Se realizaron pruebas cutáneas por el método de Prick contra los alérgenos más comunes encontrados en la población de nuestro país. La lectura se consideró positiva cuando la roncha formada era mayor al control con histamina.

Separación de Células Mononucleadas (CMN). Las CMN se separaron del paquete eritrocitario por centrifugación a 1,750 rpm en Ficoll-hypaque (1.077 de densidad), durante 30 minutos a 4°C. Las CMN obtenidas fueron lavadas y su viabilidad fue valorada por exclusión del colorante azul tripano, cuantificándose en un hemocitómetro.

Cultivos celulares. Se utilizaron las CMN obtenidas y se cultivaron en placas de 24 pozos, colocando por pozo 1×10^6 células en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en presencia o ausencia de *Der p* a concentración de 7.5 mg, 1×10^6 céls. Cuatro horas antes de cosechar las células fue añadida PMA (5 ng/ml)/Ionomycin (0.2 μ g/ml) y brefeldin A (10mg/ml).

Determinación de citocinas intracelulares. Una vez cosechadas, las CMN fueron marcadas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD8, CD30 conjugados a un fluorocromo, en un segundo paso las células fueron permeabilizadas con saponina y marcadas con anticuerpo anti- IL-4 e IL-5, conjugados a un fluorocromo. Los resultados fueron analizados por citometría de flujo en un citofluorómetro FACScalibur, equipado con un programa CellQuest Pro, versión 5.2.1.

Análisis estadístico. Se utilizó T de student y/o U-Mann Whitney dependiendo de la distribución de las muestras, considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat y las gráficas con SigmaPlot.

RESULTADOS

Hallazgos clínicos de los pacientes con conjuntivitis alérgica

Se analizaron clínicamente un total de 12 pacientes. Los signos estudiados en los pacientes que ingresaron a nuestro estudio fueron: hiperemia conjuntival, papilas, puntos de trantas, queratitis punteada superficial, melanosis conjuntival y vascularización del limbo esclerocorneal. Con lo anterior, se desarrolló una escala análogo-visual, a la que se le

Cuadro 1. Escala análoga-visual para análisis de datos clínicos en pacientes con conjuntivitis alérgica

Signo	Puntuación			
	0	1	2	3
Hiperemia conjuntival	Ausente	Área menor del 25% de la superficie conjuntival	Área mayor al 25% pero sin llegar a afectar la totalidad de la conjuntiva	Hiperemia en toda la superficie conjuntival
Presencia de papilas	Ausente	Papilas cubriendo un 25% de la superficie de la conjuntiva tarsal superior	Papilas cubriendo más el 25% de la superficie de la conjuntiva tarsal superior sin llegar a afectar la totalidad de la misma	Papilas afectando la totalidad de la conjuntiva tarsal superior
Puntos de Trantas	Ausentes	Presentes en el limbo superior sin cicatrización	En el limbo superior e inferior sin cicatrización	En cualquier parte o en todo el limbo con cicatrización
Superficie corneal	Íntegra	Queratitis punteada superficial difusa	Queratitis punteada superficial que coalesce formando áreas de desepitelización	Úlcera corneal
Melanosis conjuntival	Ausente	Presente en el área interpalpebral		
Vascularización del limbo esclero-corneal	Ausente	En un cuadrante	En dos cuadrantes	En más de dos cuadrantes

asignaron valores arbitrarios a los signos encontrados en los pacientes que participaron en nuestro estudio (Cuadro 1).

El desarrollo de esta escala análogo-visual permitió agrupar a los pacientes de acuerdo con la similitud de sus características clínicas oftalmológicas, difiriendo exclusivamente en la reactividad a las pruebas de Prick, corroborado con la aplicación de un análisis de normalidad y T de Student, la cual arrojó una p no significativa entre ambos ojos entre los distintos grupos de pacientes. Cabe mencionar que dentro del grupo de pacientes con pruebas cutáneas negativas se encontraron dos pacientes con queratocono en ambos ojos y uno con hydrops.

Hallazgos inmunológicos de los pacientes con conjuntivitis alérgica

Una vez homogenizados los valores clínicos de ambos grupos de pacientes, se procedió a evaluar la frecuencia de los linfocitos T CD8+CD30+ y la producción de citocinas.

Frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+. El porcentaje de linfocitos T CD8+ CD30+ en células no estimuladas fue similar en ambos grupos, siendo de 1 ± 0.2 en el grupo A y 1 ± 0.3 en el grupo B. En células estimuladas con PMA/ionomicina el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD30+ se incrementó 4.9 veces con respecto a las células no estimuladas en el grupo A ($p=0.002$), mientras que en el grupo B se incrementaron 8.4 con respecto a su basal ($p=0.01$). Al esti-

mular las células con el alérgeno el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD30+ se incrementó 16.2 veces con respecto a las células no estimuladas en el grupo A ($p<0.0001$), mientras que en el grupo B se incrementaron 41.1 veces con respecto a su basal ($p=0.0003$) (Figura 1).

Producción de citocinas tipo Th2 en linfocitos T CD8 (Tc2). Al evaluar las poblaciones de linfocitos T CD8+CD30+ y las poblaciones CD8+CD30- encontramos que en el caso de los de los linfocitos T CD8+ CD30+ del grupo A, una frecuencia de 14.4 veces más células IL-4+, que en la población T CD8+ CD30- ($p=0.0005$); mientras que en el grupo B se observó una frecuencia de 30.3 veces más células IL-4+ en los linfocitos citotóxicos CD30+, con respecto a los linfocitos citotóxicos CD30- ($p=0.0003$). Sin embargo, a pesar de que el incremento en la frecuencia de células CD8+ CD30+ IL-4+ fue mayor en el grupo B posterior al estímulo, la mayor frecuencia de estas células se observó en el grupo A, siendo estadísticamente significativo ($p=0.019$) (Figura 2).

En el caso de la IL-5, se observó que en los linfocitos T CD8+ CD30+ de pacientes del grupo A una frecuencia 5.6 veces superior de células IL-5+, que en la población T CD8+ CD30- ($p<0.0001$); mientras que en el grupo B se observó una frecuencia de 5.9 veces más con respecto a las CD8+ CD30- del mismo grupo ($p=0.047$). (Figura 3). Sin diferencias estadísticas entre la frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+IL-5+ entre ambos grupos.

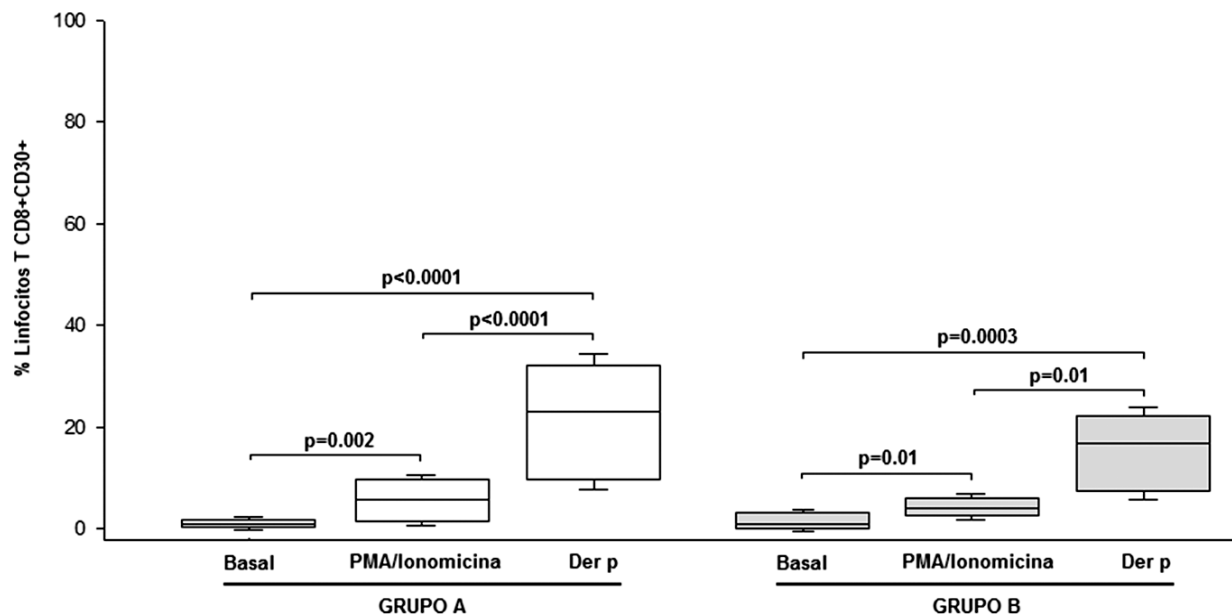


Fig. 1. Cambios en la frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+ en pacientes con conjuntivitis alérgica. Grupo A. Pacientes con conjuntivitis alérgica reactivos a pruebas cutáneas. Grupo B. Pacientes con conjuntivitis alérgica no reactivos a pruebas cutáneas. Basal (Sin estímulo) PMA/ionomicina (control positivo, estimulante policlonal), Der p (*Dermatophagoides pteronyssinus*).

DISCUSION

El estudio de la inmunopatología del estado alérgico se ha enfocado a la caracterización fenotípica y funcional de linfocitos T CD4+ (3, 7) reconociendo que contribuyen al estado de hipersensibilidad de tipo 1 mediante la producción de citocinas Th2, IL-4 e IL-5, principalmente. (8). En el caso de la conjuntivitis alérgica crónica los linfocitos T CD4 también se encuentran participando como células efectoras productoras de citocinas Th2 (3, 8, 9). En otros modelos alérgicos como asma y rinitis se sabe que los linfocitos T coexpresan CD30, molécula asociada a proliferación y persistencia

de clonas productoras de IL-5 (5). En los últimos años varios autores han considerado que los linfocitos T CD8+ también juegan un papel importante en la patogénesis del asma a través de la producción de citocinas tipo th2, es decir, clonas de linfocitos T citotóxicos tipo 2 (Tc2) (5, 10). La participación de linfocitos T CD8+CD30+ y su capacidad funcional no se había explorado en el caso de las conjuntivitis alérgicas lo que fue motivo de nuestro estudio.

En este trabajo desarrollamos intencionadamente una clasificación clínica que permitiera evaluar objetivamente de manera numérica a los pacientes con conjuntivitis alérgica crónica independientemente de su reactividad a las pruebas

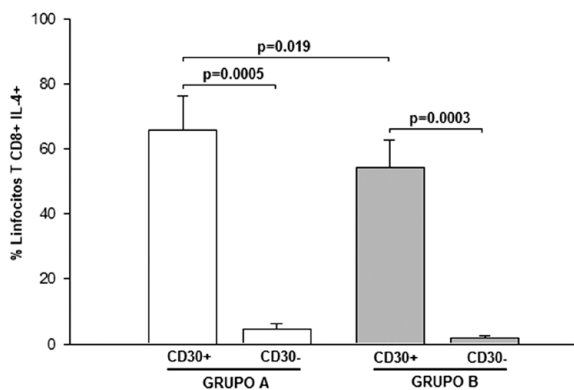


Fig. 2. Frecuencia de células IL-4+ en linfocitos T CD8+CD30+ y linfocitos T CD8+CD30-. Grupo A. Pacientes con conjuntivitis alérgica reactivos a pruebas cutáneas. Grupo B. Pacientes con conjuntivitis alérgica no reactivos a pruebas cutáneas.

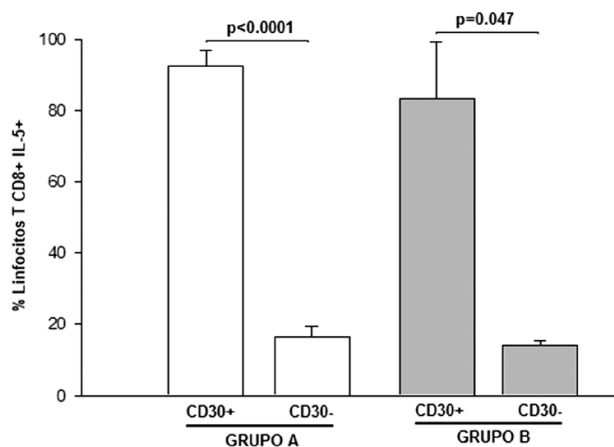


Fig. 3. Frecuencia de células IL-5+ en linfocitos T CD8+CD30+ y linfocitos T CD8+CD30-. Grupo A. Pacientes con conjuntivitis alérgica reactivos a pruebas cutáneas. Grupo B. Pacientes con conjuntivitis alérgica no reactivos a pruebas cutáneas.

cutáneas, para que al equipararlos oftalmológicamente pudiéramos evaluar en ellos la expresión de CD30 en linfocitos T CD8+, así como la producción de citocinas características Tc2 (IL-4 e IL-5).

En el caso de la expresión de CD30 en linfocitos T CD8+ observamos diferencias significativas posteriores al estímulo alergénico, esto es interesante porque previo a este trabajo, sólo se había asociado a la frecuencia incrementada de linfocitos T CD8+CD30+ con asma (11). En ese mismo estudio, Stanciu y cols. (11) sugirieron que las células CD8+ que coexpresaban CD30 en su superficie contribuían importantemente con el daño bronquial a través de un microambiente Tc2, con la producción de IL-4, IL-5 e IL-13. Aunque nosotros no buscamos IL-13 intracelularmente, coincidimos con Stanciu y cols en que la mayor producción de citocinas Tc2 (IL-4 e IL-5) se encontró en las poblaciones citotóxicas CD30+.

Además, observamos que existe una mayor frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+IL-4+ en pacientes reactivos a pruebas cutáneas que en pacientes no reactivos, este hallazgo podría explicar desde el punto de vista molecular un estado alérgico generalizado y de ahí la reactividad cutánea observada, puesto que es conocido que la IL-4 es la principal citocina productora de IgE (8). Sin embargo, hacen falta estudios funcionales que demuestren *in vitro* esta probable explicación clínica.

Por último, es de destacar que el desarrollo de la clasificación análogo-visual nos permitió controlar la variable biológica propia de cada individuo, para enfocarnos al estudio inmunológico; pero es importante resaltar que esta clasificación se orientó exclusivamente a las características clásicas de la conjuntivitis alérgica registradas en la literatura y no contempló la presencia de otro tipo de complicaciones como queratocono e hydrops, ya que estas últimas no se consideran consecuencias directas del estado alérgico ocular, sino simplemente asociaciones al mismo (12). Pero al revisar los datos inmunológicos y los oftalmológicos valdría la pena contemplar estas y otras asociaciones conocidas en futuros estudios ya que desde el punto de vista inmunofisiopatológico sí existieron diferencias que podrían explicar estas observaciones clínicas "asociadas".

En conclusión, este estudio sugiere que la expresión de CD30 no es exclusiva de linfocitos T CD4 en estados alérgicos, que pacientes con similitudes clínicas oftalmológicas pueden diferir en el estado inmunológico, lo cual pudo evidenciarse *in vivo* con la reactividad cutánea a alérgenos e *in vitro*, posterior al estímulo alergénico con una mayor frecuencia de linfocitos T CD8+CD30+IL-4+.

Agradecimiento

A la Sra. Verónica Romero Martínez por el apoyo técnico recibido. Este trabajo fue financiado en parte por el Proyecto CONACYT-SALUD 14108 (2005-2007), C01-71291 (2008-2009) y en parte por la Fundación de Asistencia Privada "Conde de Valenciana, IAP".

REFERENCIAS

1. Phipatanakul W. Allergic rhinoconjunctivitis: epidemiology. *Immunol Allergy Clin North Am* 2005; 25(2):263-281, vi.
2. Pantoja-Melendez C. Reporte principales causas de consulta Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana 2006.
3. Maggi E, Biswas P, Del Prete G, Parronchi P, Macchia D, Simonelli C, Emmi L, De Carli M, Tiri A, Ricci M, et al. Accumulation of Th-2-like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J Immunol* 1991; 146(4):1169-1174.
4. Rojas-Ramos E, Garfias Y, Jimenez-Martinez MC, Martinez-Jimenez N, Zenteno E, Gorocica P, Lascurain R. Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4+ T cells from children with atopic asthma: A preliminary report. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28(6):659-666.
5. Garfias Y, Ortiz B, Hernández J, Magaña D, Becerril M, Zenteno E, Lascurain R. CD4+CD30+ T cells perpetuate IL-5 production in Dermatophagoides pteronyssinus allergic patients. *Allergy* 2006; 61:27-34.
6. Machura E, Mazur B, Pieniazek W, Karczewska K. Expression of naive/memory (CD45RA/CD45RO) markers by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in children with asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008; 56(1):55-62.
7. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med* 2008; 59:281-292.
8. Poulsen LK, Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* 2007; 39(6):440-456.
9. Leonardi A, DeFranchis G, Zancanaro F, Crivellari G, De Paoli M, Plebani M, Secchi AG. Identification of local Th2 and Th0 lymphocytes in vernal conjunctivitis by cytokine flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(12):3036-3040.
10. Gemou-Engesaeth V, Fagerhol MK, Toda M, Hamid Q, Halvorsen S, Groegaard JB, Corrigan CJ. Expression of activation markers and cytokine mRNA by peripheral blood CD4 and CD8 T cells in atopic and nonatopic childhood asthma: effect of inhaled glucocorticoid therapy. *Pediatrics* 2002; 109(2):E24.
11. Stanciu LA, Roberts K, Papadopoulos NG, Cho SH, Holgate ST, Coyle AJ, Johnston SL. IL-4 increases type 2, but not type 1, cytokine production in CD8+ T cells from mild atopic asthmatics. *Respir Res* 2005; 6:67.
12. Leonardi A. Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21(3):319-339.