



◊ Artículo original

Número de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} (Treg) en pacientes con rinitis alérgica con y sin inmunoterapia

Cristina del Valle Acosta,¹ Cecilia María Rodríguez,² Emilia Menso-de Ezcurra,¹ Nelly Barrera,³ Calí Nicolás,³ Paola Virginia Ferrero.¹

¹Laboratorio de Inmunología y Serología.

²Servicio de Oncohematología.

³Servicio/Cátedra de Alergia e Inmunología.

Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

PALABRAS CLAVE:

Células
TCD4+CD25+CD-
127low, células T
reguladoras,
inmunoglobulina E,
ITEA, rinitis alérgica,
inmunoterapia,
Argentina.

Resumen

Introducción: La rinitis y el asma de origen alérgico son las enfermedades inflamatorias crónicas más comunes de las vías respiratorias. Un sub-grupo de células T reguladoras, CD4⁺CD25⁺, intervienen en el control de enfermedades alérgicas.

Objetivos: Determinar si existe diferencia en el número de células T reguladoras, identificadas como CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, en sangre periférica de pacientes con rinitis, respecto a controles sanos; si existe correlación del número de estas células con otras manifestaciones de la enfermedad y si dicho número varía en un mismo individuo sometido a inmunoterapia con alergenos.

Métodos: En 37 pacientes con rinitis alérgica y 18 controles, se cuantificaron las células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} por citometría de flujo, los porcentajes de eosinófilos en sangre y secreción nasal fueron determinados en frotis, las concentraciones séricas de IgE total fueron cuantificadas por método de ELISA y las de PCR por el método inmunoelíptico de alta sensibilidad. Los parámetros inmunológicos de los pacientes fueron evaluados antes y después de un año con inmunoterapia con alergenos.

Resultados: La edad promedio de los pacientes fue de 33 años y la de los controles de 30 años. El porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} fue mayor en los pacientes que en los controles en condiciones basales (8.031 ± 1.507 vs. 7.316 ± 1.309 , $p = 0.03$). Luego de un año de inmunoterapia el número de células T reguladoras

Correspondencia: Cristina del Valle Acosta. José Guardado 748 (CP 5016) Bº Villa San Isidro. Ciudad de Córdoba, Provincia de Córdoba - Argentina.

Correo electrónico: cristinacosta68@hotmail.com.

KEYWORDS:
 Allergic rhinitis,
 $CD4+CD25+CD127^{low}$
 T cells,
 Immunoglobulin E,
 Regulatory T cells,
 Immunotherapy,
 Argentina.

no presentó diferencia significativa con respecto al valor inicial (7.39 ± 1.43 vs. 7.36 ± 1.22 ; $p = 0.94$). El número de células T regulatorias luego de un año de inmunoterapia se correlacionó con el porcentaje de eosinófilos en secreción nasal ($r = 0.7178$, $p = 0.0234$).

Conclusión: El número de células T reguladoras en rinitis alérgica se encuentra aumentado probablemente por generación inducida en respuesta a la inflamación crónica de la mucosa nasal.

CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (Treg) cell numbers in patients with allergic rhinitis with and without immunotherapy

Abstract

Background: Allergic rhinitis and asthma are the most common chronic inflammatory diseases affecting the respiratory tract. A subgroup of regulatory T cells, CD4⁺CD25⁺, participates in the control of allergic diseases.

Objectives: To determine if there is a difference in the number of peripheral blood regulatory T cells, identified as CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, of patients with rhinitis compared to healthy controls; if there is correlation of the number of these cells with other manifestations of the disease and if that number changes in the same individual after immunotherapy.

Methods: In 37 patients with allergic rhinitis CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells were quantified by flow cytometry, percentages of eosinophils in blood and nasal secretions were determined in smear, total serum IgE concentrations were measured by ELISA and serum PCR concentrations using a immunoturbidimetric assay.

Results: At baseline the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells was higher in patients than in controls (8.031 ± 1.507 vs. 7.316 ± 1.309 , $p = 0.03$). After a year of immunotherapy, the number of regulatory T cells did not show any significant difference respect to the initial value (7.39 ± 1.43 vs. 7.36 ± 1.22 ; $p = 0.9387$). The number of regulatory T cells after a year of immunotherapy showed correlation with the eosinophils percentage in nasal secretion ($r = 0.7178$, $p = 0.0234$).

Conclusion: The number of regulatory T cells in allergic rhinitis is increased probably due to induced generation in response to the chronic inflammation of the nasal mucosa.

Introducción

La rinitis y el asma de origen alérgico figuran entre las causas más frecuentes de inflamación crónica del tracto respiratorio. En las últimas décadas, la prevalencia de ambas enfermedades se ha visto notablemente incrementada en varios países.^{1,2} La rinitis se caracteriza por la presencia de estornudos (especialmente en saliva), rinorrea, prurito y obstrucción nasal del flujo de aire, en tanto que el asma afecta a vías respiratorias bajas y ocasiona episodios de sibilancias, dificultad respiratoria

y tos, generalmente en la noche o temprano por la mañana.^{1,2} En estas patologías alérgicas, existe una respuesta inmune aberrante, con incremento de la inmunoglobulina E (IgE) frente a agentes ambientales comunes (alérgenos), como ácaros del polvo doméstico, hongos, pólenes y proteínas de animales; fenómeno que se conoce como sensibilización atópica. Posteriormente, el contacto del aero-alérgeno con IgE específica provoca en los individuos sensibilizados la liberación de histamina y otros mediadores secretados por células cebadas y basófilos, que conducen a la aparición inmediata

de los síntomas respiratorios. En la fase tardía, diversas células y citocinas del sistema inmune, son efectores de la inflamación crónica y participan en la producción de cambios histológicos y funcionales que caracterizan a estas enfermedades: la hiperreactividad y el remodelamiento de las vías aéreas.^{3,4} El predominio en la respuesta inmune de linfocitos T (LT) efectores CD4⁺ con fenotipo T helper 2 (Th2) es un factor fundamental en el desarrollo de atopía, ya que secretan citocinas como interleucinas (IL) 4, 5, 9 y 13 que inducen la síntesis de IgE y el infiltrado celular en el sitio inflamatorio.^{2,4} Actualmente, existe gran interés en conocer la función que cumplen en las manifestaciones alérgicas diferentes poblaciones de células con capacidad regulatoria, como la de un subgrupo de LT que expresa la cadena α del receptor de IL-2 (CD25).^{5,6} Aunque inicialmente la población T CD4⁺CD25⁺ fue relacionada al mantenimiento de la autotolerancia,⁷ el rol fisiológico que desempeña en la respuesta alérgica en humanos se ha demostrado en el síndrome de desregulación autoinmune, poliendoocrinopatía y enteropatía ligado al cromosoma X (IPEX), en el que existe un marcado fenotipo alérgico.⁸ En este síndrome, hay alteraciones de células T CD4⁺CD25⁺ debido a mutaciones en el gen FOXP3 (*forkhead box p3*), regulador del desarrollo y función de este linaje celular.⁸⁻¹⁰ Los LTCD25⁺ supresores constituyen en humanos 5% a 10% de los linfocitos CD4⁺ de sangre periférica y se denominan células T reguladoras naturales (nTreg).^{7,9,10} Se ha comprobado que un porcentaje importante de LT CD4⁺ circulantes que carecen de actividad reguladora, en su mayoría células activadas, expresan el marcador CD25. Se ha identificado dentro de los LT CD4⁺CD25⁺ una pequeña subpoblación (1% a 2%) fuertemente supresora que muestra una alta expresión de CD25 (CD25^{high}) que la diferencia de células activadas CD25⁺.¹¹ Es indiscutible que el fenotipo supresor de células TCD4⁺CD25⁺ depende de la expresión de FOXP3, tanto que la delección génica de este factor lleva a la pérdida de la capacidad regulatoria de las células, mientras que su expresión ectópica en linfocitos CD25-FOXP3- les confiere dicha capacidad.^{9,10,12} Aunque es un marcador altamente específico de la población Treg, FOXP3 presenta la desventaja de requerir fijación y permeabilización de las células para su identificación.^{9,10} Recientes estudios en humanos muestran que la expresión de la cadena α del receptor de IL-7, CD127, permite discriminar

entre células Treg y T efectoras activadas circulantes, ya que estas últimas mantienen una elevada expresión del marcador luego de su activación, lo que no ocurre en LT CD4⁺ con capacidad regulatoria (CD127^{low}). Se ha demostrado que la mayoría de las células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} son FOXP3⁺, incluyendo aquellas con una expresión baja de CD25 y que, además, poseen una fuerte actividad supresora *in vitro*.^{13,14} Por lo tanto, CD127 podría resultar un marcador superficial de utilidad, que en conjunto con CD25, permita aislar linfocitos Treg en sangre periférica con alto grado de pureza.

En el tratamiento de la rinitis y asma alérgicas, la inmunoterapia específica con alergenos (ITEA) es el único método que modifica la hipersensibilidad.¹⁵ Se han documentado algunos cambios en parámetros inmunológicos asociados a la ITEA, como disminución de IgE alergeno-específica e incremento de IgG4 específica y reducción del infiltrado de células inflamatorias en la mucosa respiratoria. Estas modificaciones se atribuyen a la inducción de células Treg en respuesta a la terapia.¹⁵⁻¹⁸

Experimentos en animales han mostrado la participación de células Treg en el desarrollo y la severidad del asma.^{19,20} En humanos, estudios sobre la relación entre el número o función de células Treg CD4⁺CD25⁺ y la condición alérgica aportan diferentes resultados.²¹⁻²⁶ Son escasos los datos acerca de esta población regulatoria en pacientes sometidos a ITEA.¹⁸

Objetivo

Determinar la asociación entre número de células Treg en sangre periférica, identificadas como CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, y la manifestación de rinitis; la correlación de estas células con la IgE sérica, porcentajes eosinófilos en sangre periférica y en secreción nasal y niveles de Proteína C Reactiva ultrasensible (hs-PCR), considerada esta última marcador de inflamación crónica.²⁷

Investigar si el porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} se modifica luego de un año del tratamiento con ITEA.

Métodos

Pacientes: Se estudiaron 37 pacientes con rinitis alérgica diagnosticados según los criterios vigentes,¹ quienes mostraron sensibilización a ácaros o pólenes, o ambos, mediante pruebas cutáneas por

punción (*prick tests*). Los pacientes fueron admitidos por el Servicio-Cátedra de Alergia e Inmunología del Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina entre mayo de 2009 y marzo de 2011. Se excluyó del estudio a los pacientes que presentaran alguna de las siguientes características: polisensibilizados (ácaros, pólenes, hongos y epitelio de gato y/o perro); que hubieran iniciado ITEA previo a este estudio; embarazadas; otras afecciones o co-morbilidades (afecciones pulmonares o de vías aéreas superiores de evolución crónica, afecciones autoinmunes, infecciones crónicas). En el grupo control participaron 18 individuos adultos voluntarios, sin antecedentes familiares ni personales alérgicos, pareados por edad y sexo. Todos los participantes del estudio dieron su consentimiento informado por escrito. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Muestras: Para la identificación de las subpoblaciones linfocitarias, la IgE sérica total, los eosinófilos periféricos y la proteína C reactiva, la muestra sanguínea se obtuvo por punción venosa convencional y la muestra de secreción nasal mediante un hisopo en ambas fosas nasales. Durante la toma de las muestras, los pacientes sólo tomaban antihistamínicos. A 10 pacientes apegados a la ITEA por un período cercano a un año (12.5 ± 3.47 meses) se les extrajo nueva muestra de sangre y secreción nasal. Los datos demográficos y clínicos de pacientes y controles se muestran en la **Tabla 1**.

Pruebas cutáneas por punción: Se practicaron a los 37 pacientes con extractos de 20 alergenos glicerinados: ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*), polvo de casa, cucaracha (*Periplaneta americana*), epitelio de gato (*Felis domesticus*), y perro (*Canis familiaris*), pólenes y hongos (Allergo-Pharma). Se usó histamina como control positivo y vehículo como control negativo. La lectura de pápula y eritema se realizó a los 15 minutos de la colocación del alergeno. Un diámetro de la pápula mayor a 3 mm fue considerado resultado positivo.²⁸

Inmunoterapia específica con aeroalergenos: Se realizó por inyección subcutánea de dosis crecientes del alergeno relevante (aquel que presentó mayor tamaño de la pápula en las pruebas cutáneas), formulado en base acuosa (Alergo-Pharma). La administración se realizó bajo la pauta convencional,

◊ **Tabla 1.** Características demográficas y clínicas de los grupos en estudio.

	Rinitis alérgica	Controles
Nº de casos	37	18
Edad (años)	33 (23 - 55) [†]	30.5 (27 - 44.5)
Sexo (M/F)	18/19 [‡]	4/14
Ig E Total sérica (KUI/L)	170.1 (81.1 - 776.5)	22.1 (11.3 - 60.4)
Eosinófilos en sangre periférica (%)	5 (3 - 7)	4 (3 - 5)
Eosinófilos en secreción nasal (%)	6 (0.25 - 32) [§]	2 (0.25 - 3)
PCR ultrasensible (mg/L)	0.7 (0.3 - 1.5)	0.4 (0.2 - 1.2)

M/F: Masculino/Femenino- Los datos son expresados como mediana y rango intercuartílico $\text{tp}=0.85$; $\text{tp}=0.08$; $\text{§} (n=34)$

comenzando desde 10 PNU (unidades de nitrógeno proteico) hasta alcanzar la dosis máxima tolerada por el paciente.²⁹

Cuantificación de IgE sérica total. Se cuantificó inmunoglobulina E en sueros de pacientes y controles mediante ELISA (RADIM, Italia). El procedimiento se realizó según las instrucciones del fabricante. Los resultados se reportaron en KUI/L.

Determinación de PCR ultrasensible: La valoración de PCR sérica se realizó por método inmuno-turbidimétrico de alta sensibilidad potenciado con látex (hs-PCR), (Bayer Health Care) empleando un autoanalizador SIEMMENS (USA).

Determinación de linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{low}. El número de linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} fue determinado por citometría de flujo, en muestra de sangre entera anticoagulada con EDTA, mediante inmunomarcación de las células con anticuerpos monoclonales unidos a flurocromos: anti CD4-FITC (clon OKT4), anti CD25-APC (clon BC96) y anti CD127-PE (clon eBioRDR5), (eBioscience, U.S.A). El procedimiento de inmunomarcación consistió en: incubación de 70 µL de la muestra de sangre con 5 µL de cada anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, lisado de los glóbulos rojos por agregado de solución de 2 mL de NH₄Cl e incubación durante 15 min en oscuridad, lavado y nueva suspensión de las células en PBS. Una vez finalizada la técnica de marcación, se procedió de inmediato a la adquisición de los datos en citómetro FCSCalibur de cuatro colores (Becton-Dickinson, U.S.A.). En todas las muestras se contó un

mínimo de 50 000 eventos. Para el análisis de los datos se empleó el programa CellQuestPro (Becton-Dickinson, USA) y el procedimiento descrito en la **Figura 1**.

Eosinófilos en sangre periférica y secreción nasal: Se determinó el porcentaje de eosinófilos en sangre periférica y en secreción nasal por recuento diferencial en 100 elementos de la serie blanca en frotis teñidos con May-Grunwald-Giemsa empleando microscopio óptico (Leitz-Wetzlar, Alemania). Se realizaron dos frotis por cada paciente, tanto de sangre como de secreción nasal, y se informó el promedio de los porcentajes hallados en ambos extendidos.

Análisis estadístico: Los datos numéricos de los grupos en estudio se expresaron como mediana y rango intercuartílico, excepto para los porcentajes de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} que se expresaron como media y desviación estándar. Se usó la prueba de Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos independientes, y para las muestras pareadas la prueba de Wilcoxon o la prueba *t*-pareada según correspondió. La prueba exacta de Fisher se aplicó para comparar la distribución de sexos en los grupos. Para el análisis de correlación se aplicó el coeficiente *r* de Spearman.

Un valor de *p* < 0.05 se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico fue realizado empleando el software GraphPad InStat3 (USA).

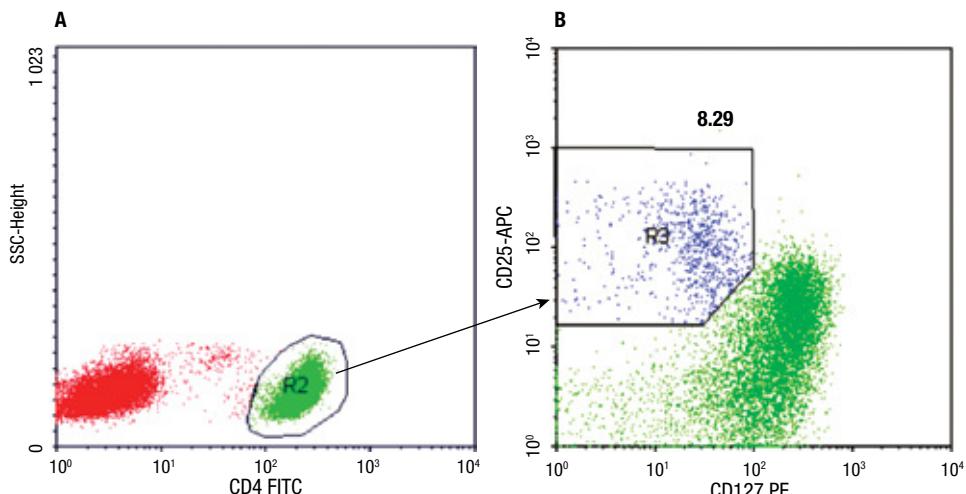
Resultados

Comparación de parámetros inmunológicos entre pacientes y controles: Los niveles de IgE sérica total y los porcentajes de eosinófilos en sangre y en secreción nasal fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles (*p* < 0.0001, *p* = 0.04 y *p* = 0.01, respectivamente); en cambio, no hubo diferencia significativa en las concentraciones de hs-PCR entre ambos grupos (*p* = 0.25).

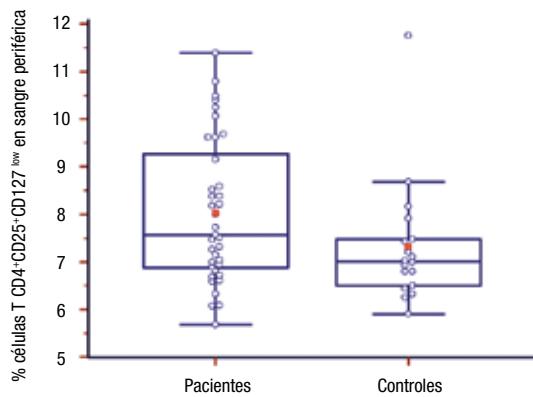
Número de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} en pacientes: Se compararon los porcentajes de células regulatorias T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} en sangre periférica de pacientes y controles. La diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa, fue mayor el número de esas células en el grupo de pacientes (8.03 ± 1.51 vs. 7.32 ± 1.31 , *p* = 0.03) (**Figura 2**).

Correlación de los distintos parámetros inmunológicos con el número de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} en pacientes y controles: Se analizó la correlación entre el porcentaje de células

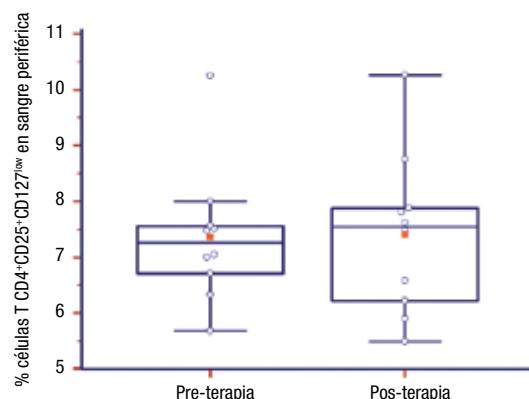
◊ **Figura 1.** Los gráficos corresponden a un experimento. A- Los linfocitos CD4+ (R2) fueron seleccionados en la región de linfocitos totales (R1) identificados por sus parámetros físicos FS vs. SS (tamaño vs granularidad) (gráfico no mostrado). B- La población CD25⁺CD127^{low} (R3) fue identificada y cuantificada en la región de linfocitos CD4⁺ (R2). El porcentaje de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} obtenido se indica sobre R3.



◊ **Figura 2.** Porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} de pacientes y controles. La línea media transversal del box marca la mediana.



◊ **Figura 3.** Porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} de pacientes al inicio (pre) y al año de la inmunoterapia (posterior).



T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} y concentración de IgE sérica, porcentajes de eosinófilos en sangre y secreción nasal y concentración sérica de hs-PCR de los pacientes. En ningún caso observamos correlación (respectivamente: $r = 0.32, p = 0.06$; $r = 0.18, p = 0.29$; $r = -0.01, p = 0.95$; $r = -0.15, p = 0.38$). La correlación de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} con esas mismas variables fue investigada, además, en el grupo control obteniéndose valores no significativos (IgE: $r = 0.07, p = 0.79$; eosinófilos en sangre: $r = 0.38, p = 0.12$; eosinófilos en moco nasal: $r = 0.33, p = 0.18$; hs-PCR: $r = 0.12, p = 0.63$).

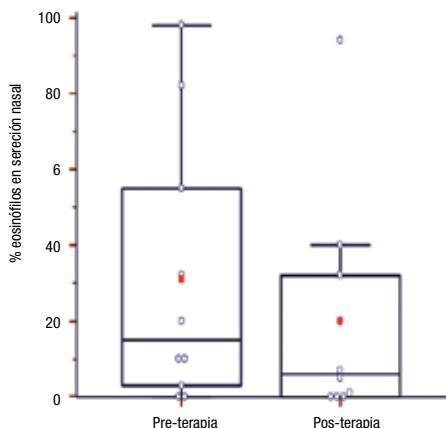
Número de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} en pacientes con inmunoterapia: Se compararon los porcentajes de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} basales y aproximadamente un año después de ITEA en diez pacientes. No encontramos diferencia estadísticamente significativa (pre: 7.36 ± 1.22 vs. post: $7.39 \pm 1.43; p = 0.94$) (**Figura 3**).

Concentración de IgE sérica total, eosinófilos periféricos y en secreción nasal y PCR ultrasensible en pacientes con inmunoterapia: Se compararon los niveles de IgE sérica, porcentajes de eosinófilos en sangre periférica y en secreción nasal, y hs-PCR sérica luego de 12.5 ± 3.47 meses de tratamiento con los valores basales en 10 pacientes. No hubo diferencia estadísticamente significativa para valores de IgE sérica (pre: $114.35 [75.23 - 338.98]$ vs. post: $136.1 [62.25 - 212.35]; p = 0.28$), porcentajes de eosinófilos sanguíneos (pre: $7[3.5 - 7]$ vs. post:

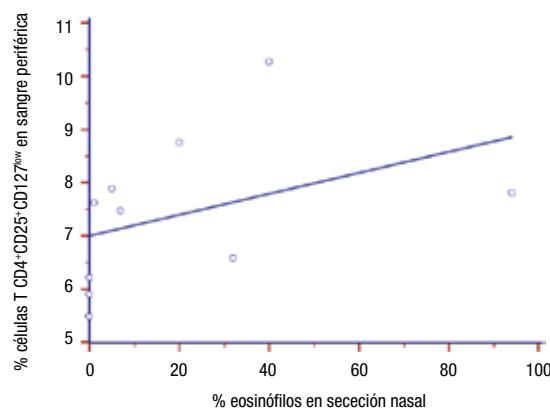
$4.5 [2 - 5]; p = 0.13$) y concentraciones séricas de hs-PCR (pre: $0.5 [0.33 - 2.20]$ vs. post: $0.2 [0.1 - 1.3]; p = 0.49$). En cambio, los porcentajes de eosinófilos en secreción nasal fueron significativamente menores en muestras pos tratamiento ITEA (pre: $15 [4.75 - 49.25]$ vs. post: $6 [0.25 - 29]; p = 0.02$) (**Figura 4**).

Correlación de parámetros inmunológicos con el número de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} en pacientes con inmunoterapia: Se determinó la correlación entre número de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} con valores de IgE sérica, porcentajes de eosinófilos en sangre y en secreción nasal y niveles séricos de hs-PCR posterior al año de tratamiento con ITEA. No hubo correlación del número de esas células con valores de IgE ($r = -0.006, p > 0.9$), con el porcentaje de eosinófilos sanguíneos ($r = 0.449, p = 0.19$), y con niveles hs-PCR en suero ($r = 0.12, p = 0.73$). En cambio encontramos correlación de las células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} con eosinófilos en secreción nasal ($r = 0.718, p = 0.02$) (**Figura 5**). Además, la correlación fue analizada entre esas variables y el porcentaje de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} en los 10 pacientes antes del inicio de la inmunoterapia. No hubo correlación entre el nivel de esas células y: concentraciones de IgE en suero ($r = 0.29, p = 0.43$), porcentaje de eosinófilos en sangre ($r = 0.32, p = 0.37$), porcentaje de eosinófilos en secreción nasal ($0.26, p = 0.47$), y niveles séricos de hs-PCR ($r = 0.37, p = 0.30$).

◊ **Figura 4.** Porcentaje de eosinófilos en secreción nasal de pacientes al inicio (previo) y al año de la inmunoterapia (posterior).



◊ **Figura 5.** Correlación del porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} con el porcentaje de eosinófilos en los pacientes al año de inmunoterapia.



Discusión

Algunos estudios han sido diseñados para investigar si los defectos en el número o en la función de las células Treg (CD4⁺CD25⁺) en humanos están relacionados al desarrollo y la severidad de enfermedades atópicas. Sin embargo, los resultados de estudios en pacientes asmáticos o con rinitis alérgica, son discordantes.

En este estudio encontramos un porcentaje de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low} en sangre periférica de pacientes adultos con rinitis alérgica sin tratamiento, levemente superior al de la población control. En concordancia con nuestro hallazgo, se ha descrito un aumento del número de células Treg (CD4⁺CD25⁺) en sangre de pacientes con asma comparado con controles no atópicos.²¹ Algunos autores, en cambio, han reportado un número equivalente de células Treg en sangre periférica de pacientes atópicos y de controles sanos.^{22,23} Inclusive, en un trabajo reciente, en el que se identificó la población regulatoria a través de la expresión de mismos marcadores utilizados en este estudio (CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{low}) en sangre periférica de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica y en individuos sanos, la cantidad de las células halladas entre ambos grupos no presentó diferencia significativa.²⁴ En cambio, otras investigaciones han reportado cantidades disminuidas de células Treg en sangre periférica en individuos alérgicos.^{25,26} En niños con asma y rinitis alérgica se demostró

un porcentaje menor de células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25^{high} que en niños sanos.²⁵ Una debilidad de nuestro estudio es no haber evaluado la intensidad y frecuencia de los síntomas y su asociación con el número de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low}.

Un factor que podría contribuir a la diferencia de resultados obtenidos en las distintas investigaciones sobre el número de células Treg en pacientes con enfermedades alérgicas, es la selección de marcadores de superficie con los que esas células son identificadas. En nuestro trabajo se reconoció la población T regulatoria según el grado de expresión en la superficie celular de tres marcadores (CD4, CD25 y CD127); sin embargo, la mayoría de los estudios que reporta la bibliografía, lo hacen sólo a través de CD4 y CD25.^{21-23,25,26}

Con respecto a la eficacia de la inmunoterapia y el posible rol que tendrían las células Treg en ella podemos decir que, aunque los pacientes de nuestra investigación refirieron mejoría en sus síntomas cuando fueron evaluados al año de inmunoterapia, los parámetros inmunológicos analizados permanecieron sin cambios significativos con respecto a los valores hallados al inicio de la terapia, excepto el porcentaje de eosinófilos en mucosa nasal que presentó una disminución significativa al año de ITEA. Estos hallazgos concuerdan con algunos informes que señalan disminución de la IgE sérica total y específica después del primer año de inmunoterapia.^{16,17} Debido a que el número de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} se mantuvo

estable luego de un año de ITEA, mientras que los síntomas y los eosinófilos en secreción nasal mostraron una disminución, se podría pensar que los mecanismos de acción de la ITEA no se relacionan con un aumento de la población Treg.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en este estudio se podría inferir que el incremento de las células Treg en sangre periférica es una respuesta fisiológica que trata de limitar la inflamación crónica de las vías aéreas en las patologías estudiadas, y que los efectos moderadores de la respuesta alérgica causados por la inmunoterapia no se deben a la inducción de células Treg, al menos tras un periodo corto de inmunoterapia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Dres. Virginia Rivero (Centro de Investigación en Bioquímica Clínica - CIBICI-CONICET- Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba) y Juan Carlos Copioli (Profesor Titular Cátedra de Clínica Médica I, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) por el asesoramiento científico y técnico brindado en la realización de este estudio.

Referencias

- Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008. *Allergy* 2008;63(Suppl86):8-160.
- Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008;31:143-178.
- Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:30-7.
- Passalacqua G, Ciprandi G. Allergy and the lung. *Clin Exp Allergy* 2008;153(Suppl1):12-6.
- Akbari O, Stock P, DeKruyff R, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003;15:627-33.
- Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest* 2004;114:1389-97.
- Sakaguchi S, Sakaguchi M, Asano M, et al. 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.
- Gambinieri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:430-5.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 2005;22:321-41.
- Baecker-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-53.
- Chen WJ, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ Naïve T cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF-β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693-700.
- Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
- Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:780-9.
- Sin B, Misirligil Z, Aybay C, et al. Effect of allergen specific immunotherapy (IT) on natural killer activity (NK), IgE, INF-gamma levels and clinical response in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1996;6:341-7.
- Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, et al. Serologic study of the working mechanisms of immunotherapy for children with perennial allergic rhinitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:1337-46.
- Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1467-82.
- Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, et al. CD4⁺CD25⁺T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* 2005;202:1549-61.
- Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR, et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 2006;203:2649-60.
- Shi HZ, Li S, Xie ZF, et al. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol* 2004;113:172-8.
- Zhang Q, Qian FH, Liu H, et al. Expression of surface markers on peripheral CD4⁺CD25^{high} T cells in patients with atopic asthma: role of inhaled corticosteroid. *Chin Med J* 2008;121:205-12.
- Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, et al. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1364-72.
- Geraldes L, Morgado J, Almeida A. Expression patterns of HLA-DR⁺ or HLA-DR⁻ on CD4⁺CD127^{low} regulatory T cells in patients with allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:201-9.
- Lee JH, Yu HH, Wang LC, et al. The levels of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 2007;148:53-63.
- Ling EM, Smith T, Nguyen XD, et al. Relation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004;363:608-15.
- Takemura M, Matsumoto H, Niimi A, et al. High sensitivity C-reactive protein in asthma. *Eur Respir J* 2006;27:908-12.
- Dykejewicz MS, Fineman S. Executive summary of joint task force practice parameters on diagnosis and management of rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:463-8.
- Brasó JV, Jorro G. Inmunoterapia para la enfermedad por aeroalergenos. Manual de Alergia Clínica. Madrid: Masson; 2003,pp.205-19.