

## Perfil de producción de citoquinas en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con poliposis nasal y asma bronquial en respuesta a la estimulación con enterotoxina estafilocócica B

### Cytokine production profile in peripheral blood T lymphocytes from patients with nasal polypsis and bronchial asthma in response to staphylococcal enterotoxin B

Juan Pablo Gormaz B<sup>1,2</sup>, Pilar Gajardo O<sup>2</sup>, Alejandro Escobar A<sup>2</sup>, Christian Olavarría L<sup>1</sup>, Patricia Schönfeldt G<sup>3</sup>, Homero Sariego R<sup>4</sup>, Diego Catalán M<sup>2,5</sup>, Juan Carlos Aguillón G<sup>2,5</sup>.

#### RESUMEN

**Introducción:** La poliposis nasal (PN) se presenta frecuentemente asociada a asma bronquial (AB). La enterotoxina estafilocócica B (SEB) jugaría un papel en su patogenia. No se ha estudiado si el perfil de citoquinas inducido por SEB en linfocitos T (LT) de pacientes con PN y AB difiere del de controles sanos.

**Objetivo:** Comparar el perfil de citoquinas de LT de sangre periférica de pacientes con PN-AB y de controles, estimulados con SEB o concanavalina A (ConA).

**Material y método:** Células mononucleares de sangre periférica de 9 pacientes con PN-AB y de 6 controles se estimularon con SEB o ConA. El porcentaje LT CD4+ productores de interferón (IFN)- $\gamma$ , interleuquina (IL) IL-4, IL-5, IL-17 e IL-21 se determinó mediante citometría de flujo.

**Resultados:** El grupo PN-AB presentó un menor porcentaje de LT productores de IL-5 que los controles al estimularse con SEB y con ConA. No hubo diferencia en las otras citoquinas estudiadas.

**Discusión:** Nuestros resultados en sangre periférica difieren de lo descrito en tejido de pólipos nasales.

**Conclusión:** Se sugiere que la respuesta inflamatoria de la PN se originaría localmente ya que los LT de sangre de pacientes con PN-AB no muestran una polarización hacia perfiles proinflamatorios con los estímulos utilizados.

**Palabras clave:** Poliposis nasal, asma bronquial, linfocitos, citoquinas, enterotoxina estafilocócica B.

<sup>1</sup> Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

<sup>2</sup> Laboratorio de Enfermedades Autoinmunes e Inflamatorias, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

<sup>3</sup> Laboratorio de Fisiopatología, Instituto Nacional del Tórax.

<sup>4</sup> Unidad de Otoneurología, Instituto de Neurocirugía Dr. A. Asenjo.

<sup>5</sup> Núcleo Milenio en Inmunología e Inmunoterapia, P07/088-F.

## ABSTRACT

**Introduction:** Nasal polypsis (NP) is frequently associated with bronchial asthma (BA) and its pathogenesis is still unknown. Staphylococcal enterotoxin B (SEB) has been implicated in the development of NP, however if the SEB-induced cytokine profile of peripheral blood T lymphocytes (TL) of PN-BA patients differs from that of normal controls has not been studied.

**Aim:** To compare the cytokine profile of CD4+ TL from NP-BA and controls stimulated with SEB or concanavalin A (ConA).

**Material and method:** Peripheral blood mononuclear cells from 9 NP-BA patients and from 6 controls were stimulated with SEB or ConA. The percentage of interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL) IL-4, IL-5, IL-17, and IL-21 producing TL was analyzed by flow cytometry.

**Results:** The percentage of SEB and ConA stimulated CD4+ IL-5-producing TLs was lower in the NP-BA group compared to the control group. There were no differences in the other cytokine-producing populations.

**Discussion:** Unlike what is described in nasal polyp tissue, our findings show a diminished production of IL-5 by peripheral TL from the NP-AB group.

**Conclusion:** A local sinonasal origin of the chronic inflammation is suggested since peripheral blood TL of NP-BA patients do not show a pro-inflammatory polarization with the tested stimuli.

**Key words:** Nasal polyposis, bronchial asthma, lymphocytes, cytokines, staphylococcal enterotoxin B.

## INTRODUCCIÓN

La fisiopatología de la inflamación crónica de la mucosa de la cavidad nasal y de las cavidades perinasales presente en la poliposis nasal (PN) es aún controvertida, con múltiples tipos celulares y mediadores inflamatorios involucrados.

Los pólipos nasales (pn) son estructuras pediculadas que histológicamente están compuestas por tejido conectivo laxo, edema, glándulas, capilares y células inflamatorias, entre las cuales los linfocitos son unos de los tipos celulares predominantes<sup>1,2</sup>. Se postula que los linfocitos T (LT), al ser orquestadores de la respuesta inflamatoria y formar parte importante del infiltrado celular de los pn, jugarían un papel protagónico en el desarrollo de la inflamación crónica que caracteriza a esta enfermedad.

Los LT ayudadores CD4+ son fundamentales en la iniciación de la respuesta inmune, interviniendo sobre otras células. Los LT ayudadores CD4+ clásicamente han sido subdivididos en 2 subgrupos, los Th1 y los Th2, caracterizados por

un perfil de citoquinas y funciones efectoras distintas<sup>3</sup>. Los LT Th1 producen interferón (IFN)- $\gamma$  y activan una respuesta inmune adaptativa celular, mientras los LT Th2 sintetizan principalmente interleuquina (IL) IL-4, IL-5 e IL-13, las que son esenciales para la generación de anticuerpos y de una respuesta inmune humoral. Recientemente se ha descrito un tercer subgrupo de LT ayudadores, los Th17, productores de IL-17 e IL-21 y cuyo un rol fisiológico es aún poco claro<sup>4</sup>.

El perfil de producción de citoquinas de los linfocitos de pn ha sido descrito por varios autores, tanto en la era pre como posTh17, con resultados discordantes. Se ha descrito un predominio del perfil Th1 como también un perfil inflamatorio de tipo mixto Th1 y Th2<sup>5,6</sup>. Reportes recientes que han investigado la respuesta Th17 en PN también muestran resultados disímiles<sup>7-11</sup>.

La enterotoxina estafilocócica B (SEB), producida por la bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), se ha postulado como un probable agente causante y/o perpetuador de la PN basado en las siguientes observaciones: 1) Alta tasa de portación de *S. aureus* en la

cavidad nasal de pacientes portadores de PNI<sup>12</sup>, con un alto porcentaje de cepas productoras de SEB<sup>13</sup>; 2) Presencia de SEB en mucus y tejido de pn<sup>14</sup>; 3) Alta prevalencia de IgE específica contra SEB en tejido de pn<sup>12</sup>; 4) Selección de dominios variables  $\beta$  (V $\beta$ ) del receptor antigénico de LT (TCR) que ligan SEB en pn<sup>13,15</sup>; 5) Correlación entre la expansión de LT con TCRs con dominios V $\beta$  específicos en tejido de pn e IgE anti SEB sérica en los mismos pacientes<sup>6,16</sup>. El tejido de pn produce citoquinas Th1, Th2 y Th17 al estimularse con SEB<sup>17</sup>.

Existe evidencia que el SEB podría estar involucrado en la fisiopatología del asma bronquial (AB) asociada a rinosinusitis crónica (RSC). Es así como Liu et al. describen una mayor producción de IL-4 por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con RSC y AB al ser estimulados con un antígeno al cual se encontraban previamente sensibilizados y SEB simultáneamente, siendo mayor que en pacientes con AB sin RSC y controles sanos, lo que no se observó con IFN- $\gamma$ <sup>18</sup>.

El objetivo del presente estudio es comparar el perfil de producción de citoquinas Th1, Th2 y Th17 de LT CD4+ de sangre periférica de pacientes con PN-AB y de controles sanos en respuesta a la estimulación con SEB.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *Pacientes y controles*

Se reclutaron 9 pacientes chilenos (90% hombres, edad promedio 53 años, rango de 24 a 73 años; Tabla 1) con el diagnóstico PN y AB de quienes se obtuvo una muestra de 50 mL de sangre venosa periférica previo consentimiento informado aprobado por los Comités de Ética Científica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y del Servicio de Salud Metropolitano Oriente.

El diagnóstico de PN y AB se realizó siguiendo las guías EPOS 2007<sup>19</sup> y la guía clínica para asma bronquial en adultos del Ministerio de Salud de Chile 2008<sup>20</sup>, respectivamente. La confirmación del diagnóstico de AB se efectuó mediante una espirometría pre y posbroncodilatador y una prueba de provocación bronquial con metacolina siguiendo las recomendaciones del manual de espirometría de la Sociedad Chilena de Enfermedades

Respiratorias 2006<sup>21</sup> y de la *American Thoracic Society*<sup>22</sup>. Para ambas pruebas se utilizó un espirómetro Medgraphics con el programa *Breeze* 6.1A (*Medical Graphics Corporation, St. Paul, MN, USA*). Se evaluó la sensibilización a alérgenos inhalantes de los pacientes con PN y AB mediante *prick test*. Esta prueba se llevó a cabo por una enfermera entrenada, siguiendo la técnica descrita por Pepys<sup>23</sup>. Se utilizó como control negativo una solución glicerosalina fenolada al 50% y como control positivo una solución de fosfato de histamina 10 mg/mL en base a glicerosalina al 50% (*Greer Laboratories Inc., Lenoir, NC, USA*). Se utilizaron un total de 26 extractos alérgicos estandarizados: 6 pastos, 5 malezas, 11 árboles, 3 hongos y 5 inhalantes intradomiciliarios (todos de *Greer Laboratories Inc., Lenoir, NC, USA*). Se midió la reacción a los 15 minutos y se consideraron como reacciones positivas aquellas con una pápula de un diámetro mayor o igual a 3 mm sobre el control negativo.

Además, a cada paciente se le aplicó la encuesta SNOT-20<sup>24</sup> para determinar la severidad de sus síntomas rinosinuales, se le realizó una evaluación endoscópica rinosinusal etapificándola según el *score* de Lund-Mckay<sup>25</sup> para determinar la extensión de su PN y se registró el antecedente de tabaquismo, considerándose como positivo el consumo de al menos 1 paquete año.

Como controles se reclutaron 6 pacientes chilenos (50% hombres, edad promedio 42 años, rango de 26 a 68 años), sin historia de alergia respiratoria ni cutánea y sin antecedentes de enfermedades rinosinuales ni bronquiales, confirmado mediante una encuesta de síntomas nasales<sup>26</sup> y otra de síntomas de AB<sup>27</sup>. Todos ellos tenían un examen otorrinolaringológico, incluyendo endoscopia nasal, y broncopulmonar normal. De ellos se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica de 50 mL.

### *Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)*

La sangre venosa periférica obtenida de los pacientes con PN y AB y de los controles sanos se recolectó en tubos heparinizados y las CMSP se obtuvieron mediante separación en un gradiente de *Ficoll-Hypaque* (*Axis-Shield, Noruega*), siendo con-

geladas y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para su procesamiento, las células obtenidas se descongelaron y distribuyeron en tres partes iguales, incubando cada alícuota a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI/ suero fetal bovino (SFB) al 5% a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en placas de 96 pocillos (*BD Biosciences*, San José, CA, USA), ya sea en presencia de 100 ng/mL de SEB (*Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, MO, USA), 5 µg/mL del mitógeno concanavalina A (ConA, *Sigma-Aldrich Co.*) o RPMI/SFB5% (control negativo sin estímulo) por 48 horas con el fin de estudiar si el SEB era capaz de producir una polarización en la producción de citoquinas característica. Se agregó brefeldina A 10 µg/mL (BFA; *eBioscience Inc.*, San Diego, CA, USA) a cada pocillo 4 horas antes de la tinción para citometría de flujo.

### **Tinción de superficie e intracelular**

Las CMSP tratadas fueron transferidas a una placa de 96 pocillos con fondo en V y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti CD4 (*mouse anti-human*, clon RPA-T4, *eBioscience Inc.*), conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 30 minutos a 4°C y en oscuridad. A continuación, las PBMCs fueron lavadas con PBS-SFB1% 2 veces, fijadas y permeabilizadas con la solución *Fixation/Permeabilization* (*eBioscience Inc.*) por 60 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las CMSP se lavaron 2 veces con tampón permeabilización (*eBioscience Inc.*) e incubadas con un anticuerpo anti IFN-γ (*mouse anti-human*, clon 4S.B3), anti IL-4 (*rat anti-human*, clon MP4-25D2), anti IL-5 (*rat anti-human*, clon TRFK5), anti IL-17 (*mouse anti-human*, clon eBio64DEC17) o anti IL-21 (*mouse anti-human*, clon eBio3A3-N2; todos de *eBioscience Inc.*), conjugados con ficoeritrina (PE), en 20 µL de tampón permeabilización por 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Por último, las CMSP se lavaron 2 veces con tampón de permeabilización y resuspendidas en PBS/SFB 1%. Las células marcadas se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su análisis por citometría de flujo.

### **Citometría de flujo**

Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCanto (*BD Biosciences*, USA). Se analizaron entre 10.000 y

30.000 células con ventana en la población correspondiente a linfocitos, según tamaño y granularidad. El análisis de datos se realizó utilizando el programa FCS Express V3 (*de Novo Software*, Los Angeles, CA, USA).

### **Análisis estadístico**

Se compararon las células positivas a la marcación con los anticuerpos antes descritos entre el grupo control y el grupo con PN utilizando la prueba de Wilcoxon para muestras independientes. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para correlacionar los puntajes de la encuesta SNOT-20, del *score* endoscópico de Lund-Mckay y el porcentaje de células positivas a la marcación en el grupo con PN. Se consideró un  $p < 0,05$  como significativo. Para estos procedimientos estadísticos se utilizó el *software* Prism 5 para Windows (*GraphPad Software Inc*, La Jolla, CA, USA).

## **RESULTADOS**

### **Demografía, reactividad a alérgenos a través de prick test y hábito de tabaco de pacientes con PN**

Siete (77,8%) de los pacientes con PN tuvieron un *prick test* positivo a aeroalérgenos y dos pacientes (22,2%) no se encontraban sensibilizados a los alérgenos examinados. De aquellos pacientes con un *prick test* positivo, tres (42,9%) presentaron sensibilización a cinco o menos alérgenos, tres (42,9%) a entre seis y diez alérgenos y un paciente (28,6%) presentó sensibilización a más de diez alérgenos (Tabla 1). Los grupos de alérgenos a los cuales los pacientes presentaron una reacción positiva con mayor frecuencia fueron las malezas y pastos (77,8%), seguido por los árboles e inhalantes intradomiciliarios (55,6%). Ningún paciente tuvo reacción a los hongos probados (datos no mostrados). Cuatro (44,4%) de los pacientes estudiados tenían antecedente de tabaquismo (Tabla 1).

### **Evaluación del perfil de citoquinas intracitoplasmáticas en linfocitos T CD4+ de pacientes con PN y controles sanos frente al estímulo con SEB o concanavalina A**

Nuestros resultados indicaron que la proporción de células CD4+ IL-5+ fue significativamente menor en

**Tabla 1. Demografía, reactividad a alérgenos a través de *prick test* y hábito tabáquico de pacientes con poliposis nasal y asma bronquial estudiados**

Paciente	Edad	Género	Número de alérgenos reactivos en <i>Prick Test</i>	Tabaquismo
1	57	M	6	Positivo
2	47	F	12	Positivo
3	24	M	5	Negativo
4	58	M	3	Negativo
5	67	M	5	Negativo
6	57	M	10	Negativo
7	65	M	9	Positivo
8	73	M	0	Negativo
9	27	M	0	Positivo

el grupo de PN respecto a los controles sanos, tanto con la estimulación con ConA ( $p=0,0466$ ) como con SEB ( $p=0,0088$ ;) (Figuras 1E y 1F). El porcentaje de células CD4+ productoras de las citoquinas efectoras IFN- $\gamma$  (Figuras 1A y 1B), IL-4 (Figuras 1C y 1D), IL-17 (Figuras 1G y 1H) e IL-21 (Figuras 1I y 1J) no presentó diferencias entre el grupo PN y los controles sanos, respondiendo de manera similar a la estimulación con ConA y con SEB.

Finalmente, la asociación entre el número de alérgenos positivos al *prick test*, puntaje de la encuesta SNOT-20, puntaje de evaluación endoscópica y el porcentaje de células CD4+ productoras de citoquinas no mostraron una asociación estadísticamente significativa (datos no mostrados).

## DISCUSIÓN

La evaluación de los ejes de LT CD4+ efectores Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 e IL-5) y Th17 (IL-17 e IL-21) permite definir la participación de cada uno de éstos en la patogénesis de la PN.

En este estudio se muestra por primera vez en la literatura el porcentaje de LT CD4+ obtenido de sangre periférica de pacientes con PN y AB, productores de citoquinas Th1, Th2 y Th17, en respuesta a la estimulación con SEB o ConA, comparándolos con linfocitos de sangre periférica de controles sanos. Las células T CD4+ de pacientes con PN productoras de la citoquina Th2 IL-5

fueron significativamente menos que las de los controles sanos, sin que hubiera diferencias al analizar otra citoquina del mismo eje como IL-4, ni tampoco para el eje Th1 (IFN- $\gamma$ ) ni Th17 (IL-17 e IL-21). En la literatura se han estudiado los niveles de producción de citoquinas de tipo Th1 y Th2 en pacientes con AB, sin PN, con resultados discordantes. Es así como se han descrito niveles séricos elevados de IL-5 en pacientes con AB, tanto atópica como no atópica<sup>28</sup> y un porcentaje aumentado de LT CD4+ productores de IL-5 estimulados con los mitógenos miristato de forbol (PMA) y ionomicina de pacientes con AB atópica, medido mediante citometría de flujo<sup>29</sup>. Asimismo, se ha pesquisado una elevada producción de IL-4 en sangre total estimulada con lipopolisacárido (LPS), en AB atópica y no atópica, y producción elevada de IFN- $\gamma$  en sangre total estimulada con el mitógeno fitohemoglutina (PHA) en AB atópica<sup>30</sup>. Por otro lado, se ha demostrado una producción deficiente de IFN- $\gamma$  con niveles normales de IL-4 e IL-5 en CMSP estimuladas con PHA<sup>31</sup>. Además, Koch y cols<sup>32</sup> describen un aumento en la producción inducida por anti-CD3/anti-CD28 de IL-5 de linfocitos de sangre periférica de pacientes con AB, sin que hubiera diferencia en la producción de IFN- $\gamma$  respecto a controles sanos, sin embargo al estimular adicionalmente los linfocitos con IL-4 vieron que el grupo con AB presentaba menores niveles de producción de IL-5 que los controles, lo que concuerda con nuestros hallazgos. Una posible explicación

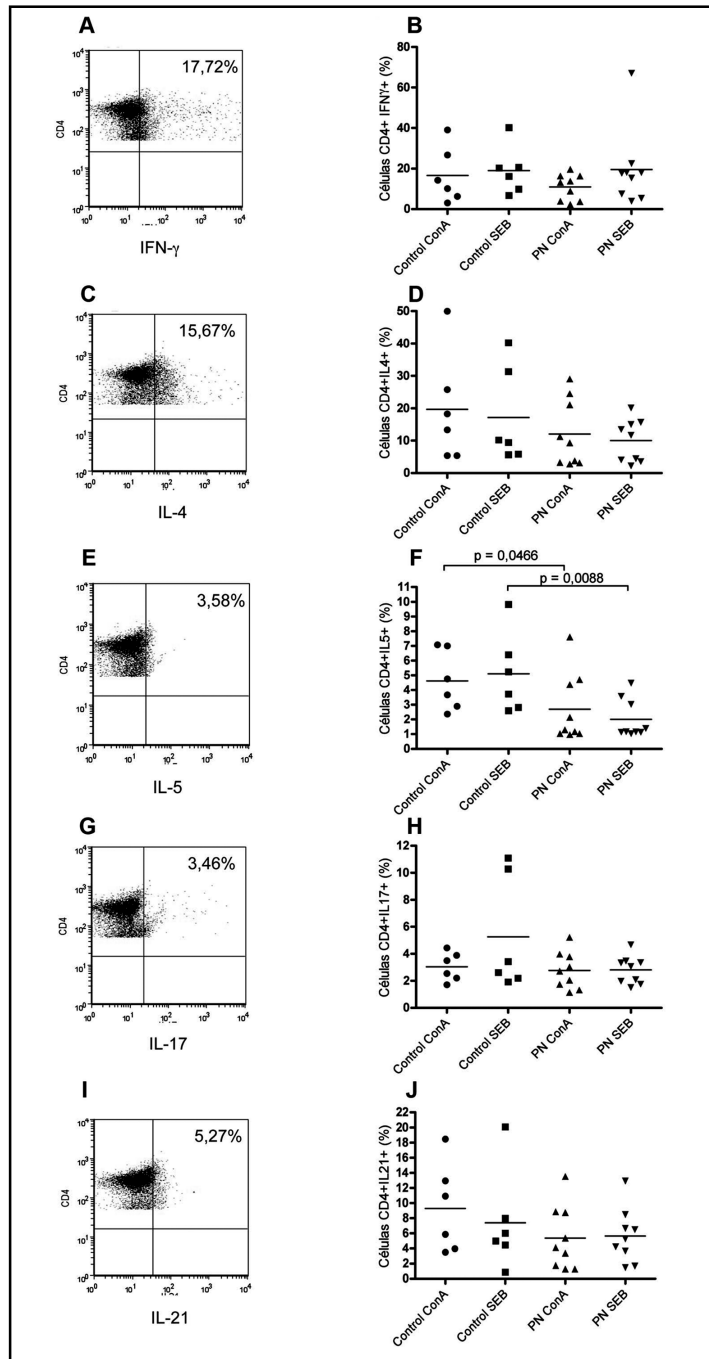


Figura 1. Presencia de las distintas poblaciones de linfocitos T CD4+ efectores en sangre periférica de pacientes con poliposis nasal (PN) y controles sanos. Células mononucleares de sangre periférica provenientes de ambos grupos en estudio fueron sometidas a estimulación con concanavalina A (ConA) o enterotoxina estafilocócica B (SEB) por 48 horas. La producción de citoquinas por los linfocitos T CD4+ fue evaluada mediante tinción intracelular de éstas a través de citometría de flujo. A, C, E, G, I. *Dot plots* representativos de un paciente con PN, en donde se hizo selección de linfocitos T CD4+ estimulados con SEB sobre la base del marcador CD4, mientras el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-17 e IL-21 fue marcado en el cuadrante superior derecho de cada recuadro. B, D, F, H, J. Porcentaje de células T CD4+ productoras de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-17 e IL-21. La línea horizontal en cada grupo representa la mediana.

a la poca concordancia en los estudios publicados podría ser que en cada uno de ellos se utilizó un modelo experimental distinto, midiéndose niveles basales de citoquinas<sup>28</sup> o estimulando células en distintas condiciones (CMSPs, sangre total o linfocitos de sangre periférica) con diferentes mitógenos (PHA, PMA/ionomicina, LPS, antiCD3/antiCD28 o IL-4). Nosotros estimulamos CMSPs de pacientes con PN-AB con SEB y ConA.

Por otra parte, también hay que considerar que múltiples factores podrían influir sobre los niveles de producción de citoquinas a nivel de sangre periférica y que no son investigados en los estudios focalizados en la vía aérea, incluido el nuestro. Por ejemplo, pacientes asmáticos y con alergia alimentaria presentan niveles elevados de IL-4 e IL-5 tras el desafío con alérgeno oral<sup>33</sup>. Lo mismo ocurre con los niveles séricos de IL-5 en pacientes con dermatitis de contacto sensibles al níquel tras el desafío oral con el mismo<sup>34</sup>. De similar manera, se ha descrito que CMSP de pacientes con periodontitis de desarrollo precoz producen mayor cantidad de IL-4 y menor de IFN- $\gamma$  ante la estimulación con mitógenos<sup>35</sup>. Los niveles de hormonas sexuales circulantes también influirían en los niveles de producción de IL-4 e IFN- $\gamma$  de CMSP, tanto en hombres como en mujeres<sup>36</sup>.

A diferencia de lo que ocurre a nivel de LT de sangre periférica, el perfil de producción de citoquinas de los LT de pn ha sido descrito por variados autores. En 1994, Miller y cols<sup>37</sup>, estimularon clones de LT, obtenidos de pn, con los mitógenos PHA y PMA más IL-2, encontrando un perfil inflamatorio predominantemente de tipo Th1, con alta producción de IFN- $\gamma$  y baja producción de IL-4, utilizando ELISA. Por otra parte, Sánchez-Segura y cols, describieron un perfil inflamatorio de tipo mixto Th1 y Th2, con producción de IFN- $\gamma$  e IL-5, medido en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares obtenidas de pn, mediante ELISA<sup>6</sup>. También se ha demostrado la producción de citoquinas, tanto de tipo Th1, IFN- $\gamma$ , como Th2, IL-4 e IL-5, por LT de pn estimulados con PMA, mediante citometría de flujo<sup>5</sup> y en condiciones basales<sup>38</sup>.

También se ha descrito un aumento de IL-17 en tejido de pn comparado con mucosa control, tanto en pacientes con PN como en pacientes con PN-AB<sup>7,8</sup>. Estudios recientes muestran resultados con-

trapuestos, describiéndose un predominio de las respuestas Th1 y Th2 sobre la Th17 en pacientes de origen europeo<sup>9</sup>, y un predominio de una respuesta Th1 y Th17 en pacientes de origen chino<sup>10</sup>. Por otra parte, un estudio también realizado en pacientes chinos demuestra un predominio de las respuestas Th1 y Th2 sin que la respuesta Th17 se encuentre exacerbada<sup>11</sup>. Este hecho pone en discusión al factor racial como determinante de las características de la inflamación presente en los pn, llamando la atención sobre otros factores que habría que tener en cuenta al momento de analizar los resultados, como por ejemplo el limitado número muestral de las publicaciones o la posibilidad de una gran variabilidad interindividual en los perfiles inflamatorios, independiente del origen étnico de los pacientes.

La única publicación a la fecha que ha estimulado tejido disgregado de pn con SEB<sup>17</sup> muestra, a diferencia de lo que hemos observado en sangre periférica, que hay un aumento generalizado en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13. Cabe destacar que en esta investigación no se analizó la respuesta Th17. Diferencias en los perfiles de citoquinas de los linfocitos tras la estimulación con SEB y otras enterotoxinas ya habían sido descritas por Sperber y cols<sup>39</sup>, mostrando distintas características según el origen de los LT estimulados (de sangre periférica, lámina propia o intraepiteliales).

Nuestro hallazgo de un menor porcentaje de LT CD4+ productores de IL-5 en CMSP del grupo PN-AB comparado con los controles podría explicarse por una migración desde la sangre periférica a la mucosa nasal y/o bronquial inflamada de estos pacientes.

En la presente investigación quisimos estudiar el perfil de citoquinas de sangre periférica de pacientes con PN y AB ya que ellos presentan una mayor actividad inflamatoria sistémica que en los pacientes solo con PN, demostrada por mayores niveles de leucotrienos urinarios<sup>40</sup> de manera tal de poder contrastar de manera más clara con el grupo control sano.

Por otra parte, el hecho que los perfiles en sangre periférica de las distintas citoquinas de los pacientes con PN-AB de este estudio no se correlacionara con la severidad de la enfermedad, medida por la encuesta SNOT-20 y el *score*

endoscópico de Lund-Mckay, sugiere que probablemente la inflamación local en el tejido de pn sería la predominante en el desarrollo de esta enfermedad.

Concordantemente con lo descrito en la literatura<sup>19</sup>, la condición de atopia de los pacientes del presente estudio no se correlacionó con la severidad de la enfermedad, ni con el porcentaje de LT CD4+ productores de citoquinas, lo que hace poco probable que la atopia, al menos a alergenitos inhalados, juegue un rol fisiopatológico en esta enfermedad.

Nuestros hallazgos, en conjunto con lo descrito en la literatura, refuerzan la teoría de una respuesta inflamatoria de predominio local en la PN, pudiendo cumplir un papel en desencadenar o mantener localmente esta inflamación el SEB. Se hace indispensable complementar lo encontrado en LT de sangre periférica con los patrones inflamatorios presentes en el tejido de pn de estos mismos pacientes para tener un mejor entendimiento de la fisiopatología de la PN.

*Fuente de financiamiento:* Fondo de Investigación de la Sociedad Chilena de Otorrinolaringología, Medicina y Cirugía de Cabeza y Cuello 2005 y Núcleo Milenio en Inmunología e Inmunoterapia P07/088-F.

## BIBLIOGRAFÍA

1. STOOP AE, VAN DER HEIDJEN HA, BIEWENGA J, VAN DER BAAN S. Eosinophils in nasal polyps and nasal mucosa: an immunohistochemical study. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 616-22.
2. STOOP AE, VAN DER HEIDJEN HA, BIEWENGA J, VAN DER BAAN. Lymphocytes and nonlymphoid cells in human nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 470-5.
3. MOSMANN TR, COFFMAN RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
4. HARRINGTON LE, HATTON RD, MANGAN PR, TURNER H, MURPHY TL, MURPHY KM, WEAVER CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6: 1124-32.
5. BERNSTEIN JM, BALLOW M, RICH G, ALLEN C, SWANSON M, DMOCHOWSKI J. Lymphocyte subpopulations and cytokines in nasal polyps: Is there a local immune system in the nasal polyp? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 526-35.
6. SÁNCHEZ-SEGURA A, BRIEVA JA, RODRÍGUEZ C. T lymphocytes that infiltrate nasal polyps have a specialized phenotype and produce mixed Th1/Th2 pattern of cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 953-60.
7. MOLET SM, HAMID QA, HAMILLOS DL. IL-11 and il-17 expression in nasal polyps: relationship to collagen deposition and supresión by intranasal fluticasone propionate. *Laryngoscope* 2003; 113: 1803-12.
8. SAITOH T, KUSUNOKI T, YAO T, ET AL. Role of interleukin-17a in the eosinophil accumulation and mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps associated with asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151: 8-16.
9. VAN BRUAENE N, PÉREZ-NOVO CA, BASINSKI TM, ET AL. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1435-41.
10. ZHANG N, VAN ZELE T, PÉREZ-NOVO C, ET AL. Different types of t-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 961-8.
11. SHI J, FAN Y, XU R, ZUO K, CHENG L, XU G, LI H. Characterizing t-cell phenotypes in nasal polyposis in chinese patients. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2009; 19: 276-82.
12. VAN ZELE T, GEVAERT P, WATELET JB, ET AL. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 981-3.
13. BERNSTEIN JM, BALLOW M, SCHLIEVERT PM, RICH G, ALLEN C, DRYJA D. A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Am J Rhinol* 2003; 17: 321-6.
14. SEIBERLING KA, CONLEY DB, TRIPATHI A, GRAMMER LC, SHU L, HAINES GK, SCHLEIMER R, KERN RC. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal



- exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope* 2005; 115: 1580-5.
15. CONLEY DB, TRIPATHI A, SEIBERLING KA, ET AL. Superantigens and chronic rhinosinusitis II: analysis of T-cell receptor V $\beta$  domains in nasal polyps. *Am J Rhinol* 2006; 20, 451-5.
  16. TRIPATHI A, KERN R, CONLEY DB, ET AL. Nasal polyposis: analysis of systemic and local responses. *Am J Rhinol* 2005; 19: 327-33.
  17. PATOU J, GEVAERT P, VAN ZELE T, HOLTAPPELS G, VAN CAUWENBERGE P, BACHERT C. Staphylococcus aureus enterotoxin b, protein a, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 110-5.
  18. LIU T, WANG BQ, YANG PC. A possible link between sinusitis and lower airway hypersensitivity: the role of Staphylococcal enterotoxin B. *Clin Mol Allergy* 2006; 7: 4-7.
  19. FOKKENS W, LUND V, MULLOL J. European Position Paper on Nasal Polyps 2007. *Rhinology* 2007; 20: 1-139.
  20. MINISTERIO DE SALUD. Guía Clínica Asma Bronquial del Adulto Santiago: MINSAL 2008.
  21. GUTIÉRREZ M, BEROÍZA T, BORZONE G, ET AL. Espirometría: manual de procedimientos. Sociedad Chilena de Enfermedades Respiratorias 2006. *Rev Chil Enf Respir* 2007; 23: 31-42.
  22. CRAPO RO, CASABURI R, COATES AL, ET AL. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 309-29.
  23. PEPYS J. Skin testing. *Br J Hosp Med* 1975; 14: 412-25.
  24. PICCIRILLO JF, MERRITT MG, RICHARDS ML. Psychometric and clinimetric validity of the 20-Item Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-20). *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126: 41-7.
  25. HOPKINS C, BROWNE JP, SLACK R, LUND V, BROWN P. The Lund-Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict? *Otolaryngol Head and Neck Surg* 2007; 137: 555-61.
  26. KLOSSEK JM, NEUKIRCH F, PRIBIL C, ET AL. Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study. *Allergy* 2005; 60: 233-7.
  27. BATEMAN ED, HURD SS, BARNES PJ, ET AL. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31: 143-78.
  28. JOSEPH J, BENEDICT S, SAFA W, JOSEPH M. Serum interleukin-5 levels are elevated in mild and moderate persistent asthma irrespective of regular inhaled glucocorticoid therapy. *BMC Pulm Med* 2004; 4: 2.
  29. SHIOTA Y, ARIKITA H, HORITA N, HIYAMA J, ONO T, YAMAKIDO M. Intracellular IL-5 and T-lymphocyte subsets in atopic and nonatopic bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 294-8.
  30. BETTIOL J, BARTSCH P, LOUIS R, DE GROOTE D, GEVAERTS Y, LOUIS E, MALAISE M. Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy* 2000; 55: 1134-41.
  31. NURSE B, HAUS M, PUTERMAN AS, WEINBERG EG, POTTER PC. Reduced interferon- $\gamma$  (but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 662-8.
  32. KOCH A, KNOBLOCH J, DAMMHAYN C, ET AL. Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF- $\gamma$  and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics. *Clin Immunol* 2007; 125: 194-204.
  33. KROGULSKA A, WASOWSKA-KROLIKOWSKA K, POLAKOWSKA E, CHRUL S. Cytokine profile in children with asthma undergoing food challenges. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2009; 19: 43-8.
  34. JENSEN CS, LISBY S, LARSEN JK, VEIEN NK, MENNÉ T. Characterization of lymphocyte subpopulations and cytokine profiles in peripheral blood of nickel-sensitive individuals with systemic contact dermatitis after nickel exposure. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 31-8.
  35. BÁRTOVÁ J, KRÁTKÁ-OPATRŇNÁ Z, PROCHÁZKOVÁ J, ET AL. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators Inflamm* 2000; 9: 115-20.
  36. VERTHELYI D, KLINMAN DM. Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology* 2000; 100: 384-90.

37. MILLER CH, PÚDICA DR, HAREM F, LOONEY RJ. Accumulation of interferon gamma-producing TH1 helper T cells in nasal polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 51-8.
38. PÉREZ-NOVO CA, KOWALSKI ML, KUNA P, ET AL. Aspirin sensitivity and IgE antibodies to staphylococcus aureus enterotoxins in nasal polyposis: studies on the relationship. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133: 255-60.
39. SPERBER K, SILVERSTEIN L, BRUSCO C, MAYER L. Cytokine secretion induced by superantigens in peripheral blood mononuclear cells, lamina propria lymphocytes, and intraepithelial lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 473-7.
40. ROYER M, GUZMÁN MA, GORMAZ JP, NAZAR G. Urinary leukotriens in patients with nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 138: 633-6.

---

Dirección: Dr. Juan Pablo Gormaz B.  
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago, Chile.  
E mail: jpgormaz@gmail.com