

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica

Publicación trimestral y suplementos - Volumen 53 - Número 4 - Año 2022



EDITORIAL

ARTÍCULOS ORIGINALES

Citoquinas de tipo 2 promueven la secreción de CCL26 por las células epiteliales intestinales en pacientes sensibilizados por alimentos

Estudio del perfil Th17 en pacientes pediátricos con candidiasis mucocutánea crónica de la provincia de Mendoza

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Aspectos genéticos e inmunológicos del cáncer papilar de tiroides: una revisión actualizada

MIS-C asociado a COVID-19: una revisión sistemática del mecanismo inmunopatológico

Publicación Oficial de

AAeIC

Asociación Argentina
de Alergia e Inmunología Clínica



Sociedad Chilena
de Alergia e Inmunología



Sociedad Paraguaya
de Alergia, Asma e Inmunología



Sociedad Peruana
de Inmunología y Alergia



Sociedad Uruguaya
de Alergia, Asma e Inmunología



AAIC

Editores

Juan Carlos Muiño, Pablo Moreno

Editores Asociados

Adrián Kahn, Maximiliano Gómez

Secretarios de Redacción

Julio Orellana, Mónica Marocco, Cora Onetti

Comité Consultivo

Ansotegui, Ignacio J. (España)

Ardusso, Ledit R. F. (Rosario)

Báez, José Ricardo (Mendoza)

Beltramo, Dante (Córdoba)

Bottasso, Oscar (Rosario)

Bózzola, Martín (Buenos Aires)

Calvo Gil, Mario (Chile)

Cejas, Arturo Hugo (Córdoba)

Crisci, Carlos D. (Rosario)

Curet, Carlos A. (Córdoba)

Docena, Guillermo H. (La Plata)

Gargiulo, Pascual Ángel (Mendoza)

Isasi, Sadí Cossy (Córdoba)

Juárez, Claudio Patricio (Córdoba)

Juncos, Luis (Córdoba)

Lozano, Alejandro (Córdoba)

Máspero, Jorge F. (Buenos Aires)

Neffen, Hugo E. (Santa Fe)

Parisi, Claudio A. S. (Buenos Aires)

Penissi, Alicia Beatriz (Mendoza)

Saranz, Ricardo J. (Córdoba)

Schuhl, Juan F. (Uruguay)

Serra, Horacio M. (Córdoba)

Esta publicación es propiedad de la Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica.

Registro de propiedad intelectual en trámite

Publicación indexada en LILACS, LATINDEX y THOMSON REUTERS

ISSN 1515-9825

Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica. Fundada el 11 de mayo de 1949.
Personería Jurídica Insp. de Justicia N° C.594°
Afilada a la International Association of Allergy and Clinical Immunology y a la European Academy of Allergy and Clinical Immunology.

Moreno 909 | (C1091AAS) Ciudad Autónoma de Buenos Aires | Rep. Argentina
Tel: +54-11-4334-7680/4331-7356 | Fax: +54-11-4334-7680
secretaria@aaaic.org.ar | aaaic@aaaic.org.ar | <http://www.archivos.alergia.org.ar>

La revista Archivos de Alergia e Inmunología Clínica tiene frecuencia trimestral y publica trabajos relacionados con la alergia y la inmunología en su más amplio sentido. El contenido de los artículos es responsabilidad directa de sus autores y no necesariamente refleja la opinión del Consejo Editorial. En la elección del material publicado se provee información correcta y actualizada, pero la continua evolución de la medicina hace que el médico en última instancia sea quien evalúe si ella es válida y adecuada para un paciente.

Tampoco se asume ningún tipo de responsabilidad científica o jurídica de los productos o servicios publicitados ni se responderá a quejas realizadas por los respectivos responsables.

Producción editorial, comercial y gráfica PUBLICACIONES LATINOAMERICANAS S.R.L.
Piedras 1333 2° C (C1240ABC) Ciudad Autónoma de Buenos Aires | Argentina
tel./fax (5411) 4362-1600 | e-mail info@publat.com.ar | <http://www.publat.com.ar>

SUMARIO ANALITICO

Analytical summary

EDITORIAL

Las enfermedades alérgicas e inmunológicas son un importante desafío en la medicina clínica. En este número exploraremos diversos aspectos de enfermedades con patogenia inmunológica en un intento de profundizar los nuevos elementos que nos permitan conocer acabadamente su origen y desarrollo.

Muño JC

ARTÍCULOS ORIGINALES

CITOQUINAS DE TIPO 2 PROMUEVEN LA SECRECIÓN DE CCL26 POR LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES EN PACIENTES SENSIBILIZADOS POR ALIMENTOS

Diversos procesos inflamatorios intestinales se caracterizan por la acumulación de eosinófilos y se desconocen los mecanismos que median la inducción de este infiltrado celular. En este trabajo estudiamos las células epiteliales de pólipos colorrectales de niños con sangrado rectal y sensibilización alérgica, y el rol de citoquinas tipo 2 en la producción de la quimiocina CCL26. Analizamos 50 pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y evaluamos la presencia de eosinófilos (tinción H&E o eosina), citoquinas proinflamatorias, IgE y CCL26 por microscopía óptica y ELISA; además se analizaron vías de señalización intracelular por *immunoblotting*. En conclusión, nuestros hallazgos indican que los pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y sensibilización alérgica presentan eosinofilia y niveles elevados de CCL26 producidos por células epiteliales a través de la activación de la vía STAT3/STAT6/JAK1-2, inducida principalmente por IL-13.

Vaccaro J y cols.

ESTUDIO DEL PERFIL TH17 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CANDIDIASIS MUCOCUTÁNEA CRÓNICA DE LA PROVINCIA DE MENDOZA

Las células Th17 producen IL-17A, que desempeña un rol relevante en la inmunidad antifúngica. Los linfocitos Th1 producen principalmente IFN γ , responsable de la inmunidad mediada por células. Polimorfismos genéticos asociados a defectos en la diferenciación y proliferación hacia Th17 aumentan la susceptibilidad a la candidiasis mucocutánea crónica (CMC). El objetivo del estudio fue contribuir al diagnóstico de CMC en pacientes pediátricos mediante evaluación del perfil linfocitario Th17. Se aislaron células mononucleares de sangre de pacientes con CMC y de controles, se realizaron cultivos primarios estimulados *in vitro* con PMA/ionomicina, se evaluó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17A y linfocitos T CD4⁺ productores de IFN γ utilizando anticuerpos monoclonales y citometría de flujo. Además, se empleó

la técnica de ELISA para la determinación de la concentración de IL-17A en sobrenadante de cultivo y suero. Se concluyó que la citometría de flujo proporciona un método eficiente para identificar deficiencias en las células productoras de IL-17, aportando valiosa información sobre el fenotipo inmune del paciente, la severidad de su disfunción y la progresión de la enfermedad

Sosa Venturi P y cols.

ARTÍCULO DE REVISIÓN

ASPECTOS GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS DEL CÁNCER PAPILAR DE TIROIDES, UNA REVISIÓN ACTUALIZADA

El cáncer de tiroides en los últimos años ha aumentado su frecuencia especialmente del tipo papilar y su variante más común la cual es la variante folicular posterior a la variante papilar convencional. Los estudios del aspecto genético como la interacción del sistema inmunológico y tumoral e histopatológicos han sido esenciales para la comprensión del comportamiento tumoral, y son la base para futuros enfoques de tratamientos y posibles terapias inmunogénicas.

Lemoine D y cols.

MIS-C ASOCIADO A COVID-19: REVISIÓN SISTEMÁTICA DEL MECANISMO INMUNOPATOLÓGICO

La pandemia por COVID-19 se asocia con enfermedades y condiciones como el síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C), leve en la mayoría de los pacientes pero que produce una respuesta inflamatoria severa post SARS-Cov-2 en menores de 12 años que presentaron una infección asintomática. Hay evidencia de una semejanza entre los signos y síntomas del MIS-C y la enfermedad de Kawasaki (KD) de modo que se considera el reconocimiento del fenotipo como la susceptibilidad de cada uno.

Resultados. Se incluyeron 8 estudios base para el desarrollo de la revisión, teniendo como síntesis de información las referencias a los anticuerpos, marcadores de inflamación y relación de similitud entre MIS-C y KD, que fueron parámetros que engloban la etiología del MIS-C con el COVID-19.

Conclusiones. Se evidencia correlación de marcadores inflamatorios como WBC, ALC, ANC, PLT, CRP, ferritina, niveles de dímero D, LDH, fibrinógeno y VSG con el MIS-C. Dentro de la comparación del MIS-C y la enfermedad de Kawasaki, los pacientes con MIS-C tenían niveles más altos de glóbulos blancos, PCR (mg/l), dímero D (μ g/ml) y ferritina (ng/ml) y niveles más bajos de ALC; siendo el diagnóstico diferencial determinado por problemas cardiovasculares y gastrointestinales. En relación con el COVID-19, la aparición de anticuerpos IgG no descarta posibilidades de enfermedades autoinmunes.

Rodríguez-Alcocer J y cols.

Las enfermedades alérgicas e inmunológicas son un importante desafío en la medicina clínica. En este número exploraremos diversos aspectos de enfermedades con patogenia inmunológica en un intento de profundizar los nuevos elementos que nos permitan conocer acabadamente su origen y desarrollo.

La relevancia fisiológica de los eosinófilos en el epitelio intestinal ha permanecido por muchos años como un enigma. Al respecto, se publica el elegante trabajo conducido por Guillermo Docena y cols., en La Plata, Buenos Aires, Argentina. En él se estudian sensibles a leche de vaca con problemas gastrointestinales, **poliposis**, eosinofilia, citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) y la quimiocina CCL26. Esta investigación, de gran profundidad, permite encontrar aspectos no estudiados previamente. En números anteriores de nuestra revista, Boudet y cols. publicaron aspectos llamativos de los haplotipos mitocondriales del ADN y sensibilidad a leche. Recordamos que su acción sería antibacteriana. Hoy, con este trabajo sobre la citocina CCL26 liberada desde células epiteliales, que reclutan linfocitos Th2, explican aspectos relevantes de su patogenia. Los mismos están presentes en la mucosa del intestino (pólipos), la que induce eosinofilia con clara relación con sensibilidad a leche de vaca, y la acción de IL-13 que actúa vía STAT3 - STAT6. La inhibición de IL-13 lleva a CCL26 a niveles bajos y por lo tanto a presencia de baja concentración de eosinófilos.

Este trabajo obtuvo el primer premio a la forma poster de nuestro Congreso Nacional de Alergia e Inmunología, desarrollado en agosto 2022.

Otro trabajo destacado es el que proponemos sobre candidiasis e IL-17 y poblaciones linfoides determinadas por citometría de flujo y la separación de poblaciones diferentes con deficiencia en su capacidad productora de dicha citocina. Esta investigación fue dirigida por la Profesora Dra. Claudia Sotomayor de Córdoba y encabezada por la Dra. Sosa Venturi y cols., del Servicio de Histocompatibilidad, del Servicio Bioquímico del Hospital Central de Mendoza, Servicio de Inmunodeficiencias, Cátedra de Inmunología Universidad Nacional de Cuyo. Se propone una metodología altamente reproducible, que nos permite llegar al diagnóstico del fondo del problema en esta micosis tan frecuente.

El tercer trabajo presentado en este número, proveniente de Colombia, es el dirigido por el Dr. Múnera y cols., de Cartagena y Medellín. Esta investigación se basa en las variaciones o mutaciones de protooncogenes y la respuesta de inmunidad para cáncer de tiroides. Los estudios de los aspectos genéticos, así como la relación con el sistema inmunológico e histopatología, han sido esenciales para la comprensión del comportamiento tumoral y conforman la base para futuros enfoques de los tratamientos y posibles terapias inmunogénicas.

Por último, publicamos una revisión de metaanálisis realizada por Rodríguez Alcocer y cols. en Arequipa, Perú, sobre las secuelas de la pandemia COVID-19 en pediatría y sus efectos a largo plazo en niños que presentaron formas asintomáticas de la enfermedad; esto le da un carácter de aparente poca importancia, pero su efecto diferido es la presencia de síndrome autoinflamatorio multiorgánico. Esto se refleja por la presencia de altos niveles de reactantes de fase aguda y activación de trombofilia, así como otros hallazgos parecidos a Kawasaki, pero con mayor intensidad. Lo llamativo es la poca afección pulmonar de los pacientes pediátricos y el gran compromiso cardiovascular, digestivo (dolor de abdomen), diarreas, nasal, ocular, que aparecen 5 semanas después. Esta revisión nos pone en alerta de patologías no sospechadas *prima facie* y que deben ser tenidas en cuenta.

Los autores han ensamblado con sus últimos trabajos una desafiante área de la medicina como es la inmunología, alergia y genética. Deseamos que la lectura de estos diversos artículos sirva para transferir los hallazgos encontrados a nuestra práctica médica habitual, así como estimular la investigación médica desde lo básico a lo clínico.

Dr. Juan Carlos Muíño

Editor de AAeIC

jcmuino@gmail.com

CITOQUINAS DE TIPO 2 PROMUEVEN LA SECRECIÓN DE CCL26 POR LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES EN PACIENTES SENSIBILIZADOS POR ALIMENTOS

Type-2 cytokines promote the secretion of CCL26 by intestinal epithelial cells in food-sensitized patients

Julián Vaccaro¹, Karina E. Canziani¹, Luciana Guzmán², Viviana Bernedo², Marcela García³, Eugenia M. Altamirano⁴, Emanuel Feregotti¹, Renata Curciarello¹, Cecilia I. Muglia¹, Guillermo H. Docena¹

RESUMEN

Diversos procesos inflamatorios intestinales se caracterizan por la acumulación de eosinófilos y se desconocen los mecanismos que median la inducción de este infiltrado celular. En este trabajo estudiamos las células epiteliales de pólipos colorrectales de niños con sangrado rectal y sensibilización alérgica, y el rol de citoquinas tipo 2 en la producción de la quimiocina CCL26. Analizamos 50 pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y evaluamos la presencia de eosinófilos (tinción H&E o eosina), citoquinas proinflamatorias, IgE y CCL26 por microscopía óptica y ELISA; además se analizaron vías de señalización intracelular por *immunoblotting*. Encontramos en el estroma de los pólipos un infiltrado celular con predominio de eosinófilos respecto al control de tejido adyacente normal. Nuestros hallazgos muestran un incremento significativo en la producción de IL-4, IL-5 e IL-13. En cortes histológicos se detectó CCL26 en el compartimento epitelial mientras que en el estroma del pólipo se detectaron abundantes células IgE+. Demostramos que IL-13 induce la fosforilación de STAT-3 y STAT-6 y la secreción de CCL26 en células epiteliales intestinales, mientras que el bloqueo del receptor específico de IL-13 o la inhibición de vías de señalización, disminuyeron la secreción de CCL26 a niveles basales.

En conclusión, nuestros hallazgos indican que los pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y sensibilización alérgica presentan eosinofilia y niveles elevados de CCL26 producidos por células epiteliales a través de la activación de la vía STAT3/STAT6/JAK1-2, inducida principalmente por IL-13.

Palabras clave: pólipos colorrectales, células epiteliales intestinales, IL-13, CCL26, STAT/JAK

ABSTRACT

The accumulation of eosinophils characterizes several bowel inflammatory processes, and the mechanisms that govern mucosal infiltration are not fully understood. In this work, we studied intestinal epithelial cells from colorectal polyps of children with rectal bleeding and allergic sensitization and the role of type-2 cytokines in the secretion of the CCL26 chemokine.

We analyzed colorectal polyps (n=50) from pediatric patients with rectal bleeding by H&E and eosin staining, different pro-inflammatory cytokines, IgE and CCL26 by ELISA and confocal microscopy, and intracellular activation pathways by immunoblotting.

We found a dense cell agglomeration within the polyps, with a significantly higher frequency of eosinophils than in control adjacent tissue. IL-4, IL-5 and IL-13 were significantly up-regulated in polyps and CCL26 was elevated in the epithelial compartment, whereas IgE+ cells were revealed only in the stroma of polyps. Experiments with Caco-2 cells showed that the type-2 cytokine IL-13 increased STAT3 and STAT6 phosphorylation and eotaxin-3 secretion. The addition of the blocking antibody Dupilumab or the inhibitor Ruxolitinib to the cytokine-stimulated Caco-2 cells diminished the CCL26 secretion to basal levels in a dose-dependent manner.

In conclusion, our findings demonstrate a high frequency of eosinophils and elevated levels of type-2 cytokines and eotaxin-3 in the inflammatory tissue of colorectal polyps from pediatric patients. Polyp epithelial cells showed to be the cell source of CCL26, and IL-13 was the main trigger of this chemokine through activating the STAT3/STAT6/JAK1-2 pathways.

Keywords: colorectal polyps, intestinal epithelial cells, IL-13, CCL26, STAT/JAK

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2022;53(4):133-144

INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata es una rama de la respuesta inmune altamente conservada en plantas, invertebrados y mamí-

feros cuyo conocimiento ha evolucionado marcadamente con la descripción en las últimas décadas de nuevas células y subpoblaciones celulares, circuitos de activación y regulación, y su impacto en la inducción de los mecanismos

1. Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), UNLP, CONICET, Asociado a CIC PBA, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, La Plata, Argentina.
2. Servicio de Gastroenterología, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Argentina.
3. Sala de Alergia, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Argentina.
4. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Argentina.

EF es estudiante de la Carrera de Bioquímica de la Universidad Nacional de La Plata; JV es bioquímico y becario de CONICET; LG, VB, MG y EMA son médicas del Hospital de Niños de La Plata; KEC, RC, CIM y GHD son Ph.D.

Correspondencia: Guillermo Docena. Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), UNLP, CONICET, Asociado a CIC PBA, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, Boulevard 62 número 1489, 1900 La Plata, Argentina. guidoc@biol.unlp.edu.ar. Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Fuentes de financiación: Proyectos 11/846 (Universidad Nacional de La Plata), PICT 2020 3199 y PICT 20182479 (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Nación).

Recibido: 28/11/2022 | Aceptado: 13/12/2022

de la inmunidad adaptativa. Esto ha generado nuevos paradigmas que transformaron nuestra visión sobre el funcionamiento del sistema inmune. La inmunidad innata y adaptativa han sido estudiadas tradicionalmente como mecanismos independientes entre sí, pero existe actualmente suficiente evidencia para considerarlas mutuamente interactuantes y en muchos aspectos superpuestas.

Entre las células de la inmunidad innata, se encuentra un tipo de granulocitos denominados eosinófilos que son células en un estadio efector final que contribuyen con funciones esenciales tanto en homeostasis como en patología a través de la secreción de numerosas sustancias biológicamente activas. Entre los procesos biológicos más ampliamente estudiados se encuentran como principal función homeostática la defensa frente a infecciones helmínticas¹, mientras que, entre las últimas, su activación desregulada en las mucosas puede ocasionar patologías inflamatorias alérgicas². Sin embargo, recientemente se han descrito otras funciones homeostáticas en diferentes tejidos (desarrollo de órganos, regeneración tisular, etc)^{3,4}, por lo cual comprender los mecanismos de migración desde sangre periférica constituye un desafío. Estas células multifacéticas se encuentran distribuidas heterogéneamente en el tracto gastrointestinal, principalmente en el estroma o lámina propia, aunque también, y con menor frecuencia, en el compartimento epitelial. Son fuente de citoquinas, quimiocinas, mediadores lipídicos y factores de crecimiento por lo cual ejercen diversas funciones en la fisiología de las mucosas⁵. Sin embargo, la eosinofilia tanto en circulación periférica como en los tejidos mucosales constituye un marcador de un proceso infeccioso o de una inflamación alérgica.

A pesar de que mucho se conoce sobre los mecanismos de activación celular, su corta vida media, vías de secreción de sustancias biológicamente activas y de reclutamiento desde la médula ósea a los tejidos, su acumulación en los tejidos es todavía materia de debate y estudio. Estas células expresan en su superficie principalmente CCR3 o receptor de eotaxinas que las guían hacia los tejidos donde se producen las quimiocinas atrayentes. Entre las eotaxinas (eotaxina-1, -2 y -3), se encuentra la eotaxina-3 o CCL26, que es el quimioattractante de eosinófilos más potente descrito. Entre las fuentes celulares descritas para estas quimiocinas, se encuentran distintas células como fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales y células epiteliales^{6,7}. En cuanto a la distribución tisular de los eosinófilos, estos se acumulan en tejidos inmunes y no inmunes, siendo el tracto gastrointestinal el que aloja la mayor cantidad de células (5-25% de los leucocitos)⁸, mientras que en otros tejidos el porcentaje es menor al 4%^{9,10}. Dado que diferentes citoquinas y quimiocinas son críticas en su reclutamiento desde la médula ósea, en este trabajo estudiamos el rol

de citoquinas tipo 2 que previamente hemos descrito como dominantes en pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y sospecha de alergia alimentaria¹¹. En ese trabajo describimos al estroma del pólipo como un órgano linfoides terciario donde el entorno inflamatorio predispone a la síntesis local de IgE y a un infiltrado celular denso que lo diferencia del tejido colónico circundante.

En el presente estudio investigamos el rol de la célula epitelial colónica en la secreción de CCL26 y en la activación celular mediada por citoquinas tipo 2, para promover la expresión y secreción de esta quimiocina en un contexto tisular inflamatorio alérgico.

MÉTODOS

PACIENTES Y MUESTRAS ANALIZADAS

En este trabajo se estudiaron 50 pólipos colorrectales de pacientes que fueron asistidos en la Sala de Gastroenterología y en el Servicio de Alergia del Hospital de Niños Sor María Ludovica de la Plata (Buenos Aires, Argentina), cuyas edades oscilaban entre 3 y 8 años (media: 5,5 años), 65,4% eran de sexo masculino y presentaban sangrado rectal. Por colonoscopia se detectó la presencia de pólipos colorrectales que fueron removidos por precaución y se analizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Niños y en el IIFP. Fueron hallados 39 pólipos en recto y 11 en colon sigmoideo; todos fueron pólipos únicos, pedunculados y con diferente tamaño. Además del tejido de los pólipos (P) se analizaron muestras de biopsias de tejido circundante (TCC) que se obtuvieron como muestra control de cada paciente. Asimismo, se estudiaron como controles muestras de colon sano de pacientes pediátricos sin patología inflamatoria (TCS) (n=10), pólipos tumorales (PT) adenomatosos de pacientes adultos (PA) (n=10) y pólipos colónicos hiperplásicos de pacientes adultos (PH) (n=10).

Los pacientes pediátricos fueron también estudiados en el Servicio de Alergia aplicándose criterios clínicos definidos para indagar sensibilización o alergia alimentaria, y se indicaron test complementarios (pruebas cutánea o *prick test* y serología para IgE)¹¹. La historia clínica incluyó antecedentes familiares y/o personales de dermatitis, rinitis, asma, alergia a drogas, etc. En la **Tabla 1** se incluyen datos de los 50 pacientes en los que se hallaron pólipos colorrectales, encontrándose que en el 90% de los mismos los valores séricos de IgE total fue superior a los valores control, mientras en el 92,3% de los sueros se detectaron niveles elevados de IgE específica para alérgenos alimentarios (leche de vaca, soja o maní). Un único paciente mostró prueba cutánea positiva, mientras que el 60% tenía antecedentes personales o familiares de atopía (dermatitis, urticaria y/o asma).

TABLA I. Datos de pacientes juveniles con sangrado rectal y pólipos.

Características	Pacientes (n=50)
Edad (a), mediana (IQR)	5,50 (3,70-8,0)
Total IgE (IU/ml), mediana (IQR)	212,10 (67,65-444,53)
Total IgE > 60 IU/ml, n (%)	45 (90)
IgE específica para leche de vaca, n (%)	40 (80)
IgE específica para maní, n (%)	44 (88)
IgE específica para soja, n (%)	37 (74)
Prueba cutánea o prick test, n (%)	1 (2)
IgE específica para alérgenos alimentarios, n (%)	42 (92,3)
Atópicos (antecedentes personales y familiares), n (%)	30 (60)
Dermatitis	8 (16)
Urticaria en respuesta a leche de vaca	4 (8)
Asma	4 (8)

IQR: intervalo intercuartílico.

El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Niños de La Plata (Buenos Aires, Argentina) (protocolos 389-2014 y 389-2018), y los pacientes o sus padres dieron el consentimiento firmado para ser parte del estudio.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los tejidos provenientes de los pólipos y de las biopsias se caracterizaron histológicamente mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) o eosina, o con anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos, y luego se analizaron mediante microscopía óptica y confocal, respectivamente. Brevemente, los tejidos se fijaron durante por 12 hs a 4°C en paraformaldehído al 3% y luego se incluyeron en parafina siguiendo los protocolos habituales (Mercer et al., 2009). Se obtuvieron cortes del tejido intestinal de 5 µm, que se desparafinaron y se tiñeron con H&E (Biopur, Santa Fe, Argentina) o se trataron con citrato de sodio pH 6,0 a 95°C durante 15 min para la recuperación antigénica. Luego del bloqueo con albúmina de suero bovino al 2%, se incubó por un lado con anti-IgE humana hecho en cabra y conjugado a FITC (diluida 1:25) (Southern Biotech, Birmingham, AL, EE.UU.) y por otro con anti-CCL26 humana hecho en cabra (diluida 1:20) (R&D Systems, Minnesota, EE.UU.) seguido de anti-IgG de cabra hecho en burro Alexa Fluor® 488 (diluido 1:300) (Abcam, San Francisco, EE.UU.) como anticuerpo secundario. Se empleó yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) para tinción de núcleos. Las fluorescencias se analizaron empleando un microscopio confocal SP5 Leica y las imágenes se analizaron con el software LAS AF Lite (Leica).

La tinción diferencial de eosinófilos se realizó en secciones de 5 µm de tejido de colon fijadas en formalina e incluidas en parafina y se tiñeron con la técnica de Papanicolaou siguiendo los protocolos del fabricante (Biopak, Buenos Aires, Argentina). Brevemente, las secciones de tejido intestinal se desparafinaron y posteriormente se tiñeron con hematoxilina, Orange G y eosina. A continuación, las sec-

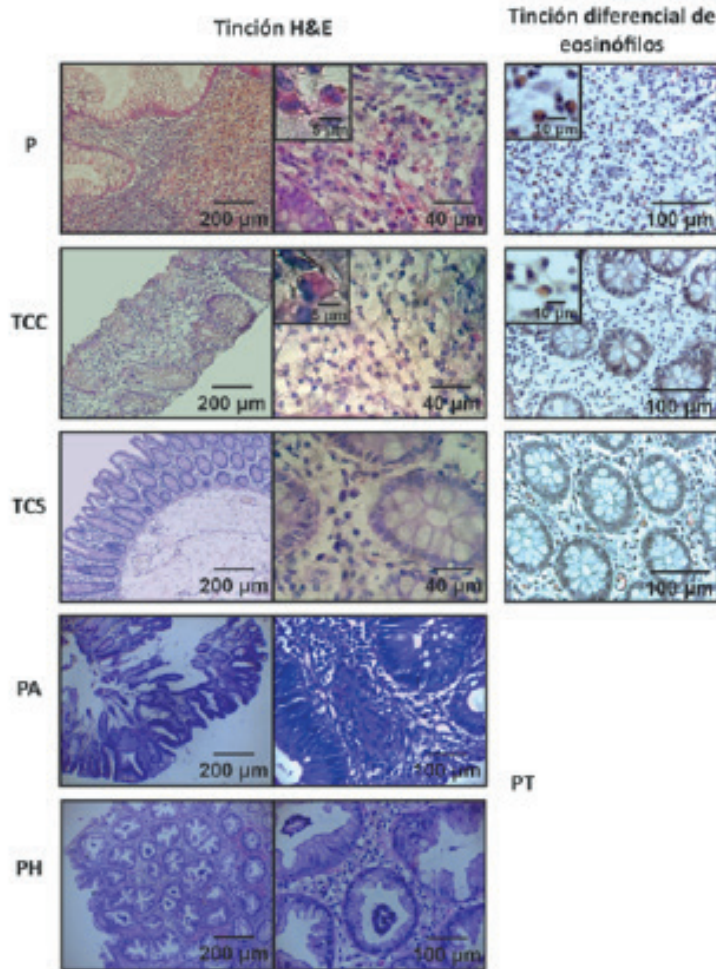
ciones se deshidrataron y montaron con bálsamo canadiense. Para el recuento de eosinófilos se obtuvieron imágenes en un microscopio Leica DM500 con una cámara ICC50HD. Los recuentos de células se realizaron en campo de alta potencia (HPF), que representa un aumento de 400X y corresponde a un área de 0,1 mm² (número de campo de 18 mm). La presencia y frecuencia de eosinófilos se calculó según el recuento de células con un núcleo bilobulado junto con la tinción de sus gránulos conteniendo eosina.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CITQUINAS E IGE EN EL TEJIDO COLÓNICO

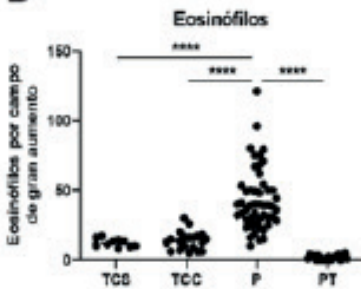
Las proteínas se extrajeron de muestras conservadas a -80°C de pólipos y de biopsias colónicas adyacentes al pólipo mediante homogeneización inmediata, empleando un rotor-estator en PBS con un cóctel de inhibidores de proteasas (SIGMA-Aldrich, MO, EE.UU.). Las citoquinas se cuantificaron en el lisado utilizando kits ELISA comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante: IL-4 (Immunotools, Friesoythe, Alemania), IL-5 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.), IL-13 (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) e IFN-γ (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Para estandarizar los valores obtenidos se pesó cada muestra y se refirió la cantidad de cada citoquina por gramo de tejido.

La IgE tisular específica de leche de vaca e IgE total se evaluaron mediante ELISA¹³, para lo cual se sensibilizaron fosas de microtitulación de poliestireno (NUNC, Maxisorp, Dinamarca) con antisuero policlonal anti-IgE humana (100 µl, 400 µg/ml) (Sigma, MO, EE.UU.) para la cuantificación de IgE total o alérgenos (proteínas de leche de vaca, soja o maní, 10 µg/ml) para la detección de IgE específica. Las fosas se bloquearon con suero equino al 5% en buffer fosfato salino pH 7.4. Se añadieron los lisados de los tejidos y se incubaron durante 1 hora a 37°C, seguido de incubación con el anticuerpo anti-IgE humano obtenido en cabra (específico de la cadena ε) y biotinilado (Vector Laboratories) (diluido 1:2000, 1 hora a

A



B



C

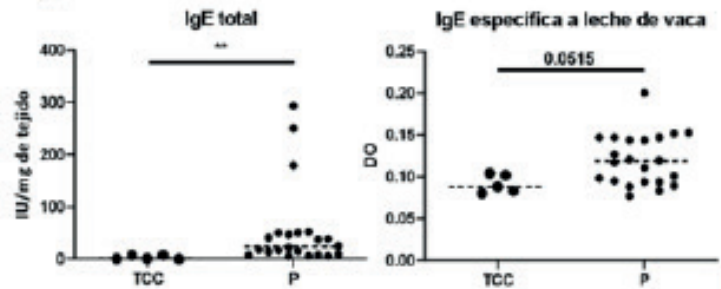


Figura 1. Infiltrado celular y frecuencia de eosinófilos en el estroma de pólipos colorrectales. (A) Histología (tinción H&E y tinción de eosina para eosinófilos) en cortes de pólipos (P), tejido control circundante (TCC), tejido control sano (HCT), pólipos hiperplásicos (PH) y adenomatosos (PA). Se muestran imágenes representativas. (B) Recuento de eosinófilos por microscopía óptica en pólipos colorrectales, pólipos tumorales (PT) y biopsias de tejido circundante. Los valores son expresados en valor medio \pm error estándar de la media (SEM) y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (**** $p < 0,0001$).

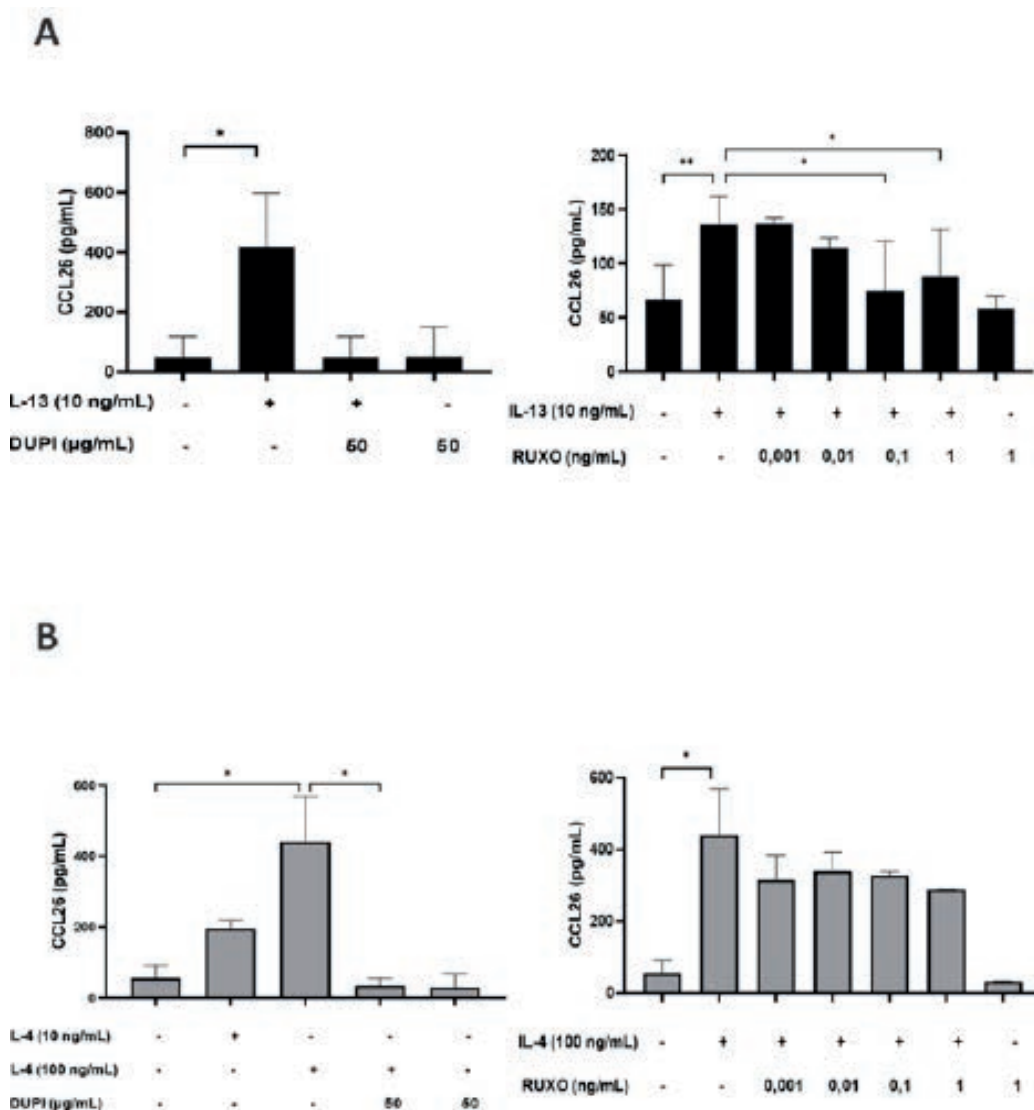


Figura 2. Análisis de IgE y CCL26. (A) IgE total e IgE específica para leche de vaca determinadas por ELISA indirecto en tejido total. (B) Detección de IgE y CD138 por microscopía en pólipos colorrectales y biopsias de tejido circundante. Las flechas indican células con co-localización de marcadores (células plasmáticas). Se muestran imágenes representativas. (C) Expresión de CCL26 por microscopía confocal, destacándose el compartimento epitelial con tinción citosólica de CCL26 (imagen con aumento). Se muestran imágenes representativas. Los valores son expresados en valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (** $p < 0,01$).

37°C) seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma, MO, EE.UU.) (diluido 1:10000, 1 hora a 37°C) para la cuantificación de IgE total; o mediante el empleo de anti-IgE humana conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma, MO, EE.UU.) (diluido 1:1000, 2 horas a 37°C) para la detección de IgE específica. Para la cuantificación de IgE total se construyó una curva de calibración por duplicado utilizando un estándar de referencia (1000 UI/ml) para IgE total. Como sustrato se utilizó orto-fenilendiamina (MP Biomedicals, CA, EE.UU.) y peróxido para IgE total, se detuvo la reacción con H_2SO_4 2M y se

midió la densidad óptica (DO) a 492 nm. Para la IgE específica se utilizó p-nitrofenil fosfato (Sigma, MO, EE.UU.), se detuvo la reacción con EDTA 0,1 N y se midió la DO a 405 nm. Se empleó para la lectura de DO un lector de placas Varioskan Lux (Thermo Scientific).

ENSAYO DE ELISA PARA CCL26

Para la cuantificación de la quimiocina CCL26 se empleó un ELISA comercial y se evaluó el sobrenadante de cultivo de células Caco-2 previamente estimuladas, como así también en lisados celulares de tejido colónico, siguiendo

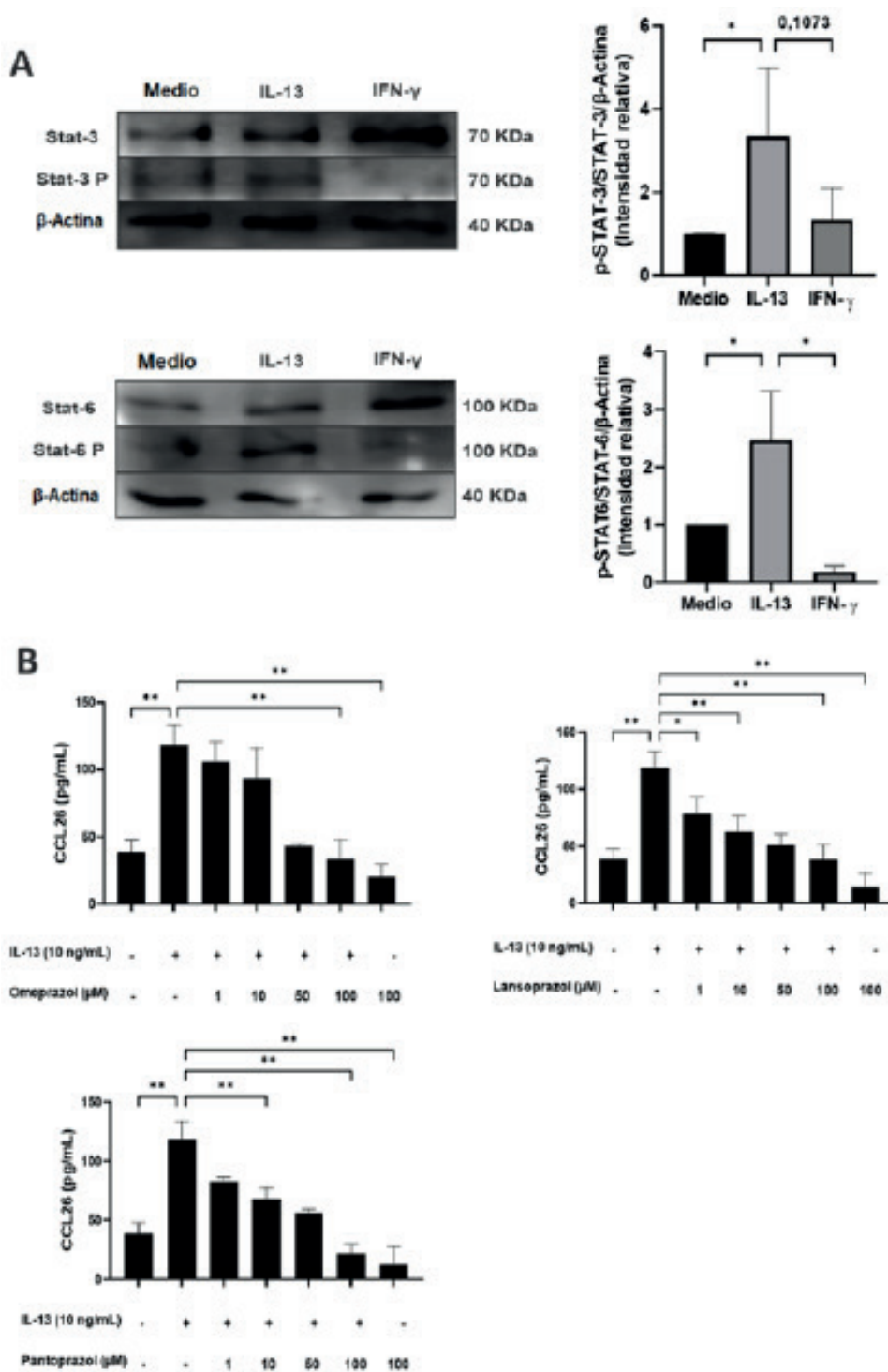


Figura 3. Análisis de citoquinas y secreción de CCL26. (A) Concentración de citoquinas por ELISA de captura en pólipos y biopsias. (B) Secreción de CCL26 por ELISA de captura en sobrenadante de cultivo de células epiteliales colónicas humanas Caco-2 estimuladas con distintas concentraciones de IL-13 e IL-4 (C) y co-cultivo con dupilumab (anticuerpo monoclonal específico de la cadena α común a los receptores de IL-4 e IL-13) (DUPI), y ruxolitinib, inhibidor de JAK 1 y 2 (RUXO). Los valores son expresados en valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (* p <0,1 y ** p <0,01).

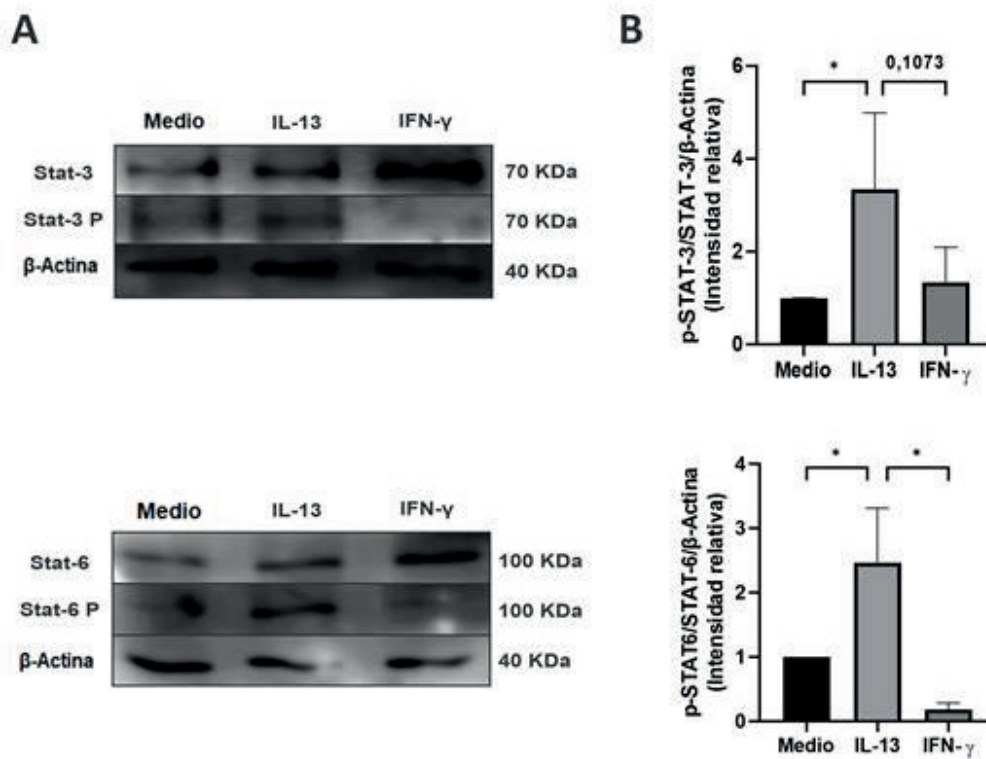


Figura 4. Análisis de la activación de las vías intracelulares de STAT3 y STAT6. (A) *Immunoblotting* para STAT3, STAT3 fosforilado, STAT6 y STAT6 fosforilado en lisado de Caco-2 estimuladas con IL-13 (10 ng/ml) o IFN γ (10 ng/ml) por 90min. (B) Análisis semicuantitativo de la intensidad de las bandas del *immunoblotting* mostrado como pSTAT-3/STAT-3/ β -actina y pSTAT-6/STAT-6/ β -actina representativos de la activación de cada vía intracelular. Los valores en cada columna representan valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (* $p < 0,1$).

las instrucciones del fabricante (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La cuantificación final se realizó empleando la curva de calibración del kit comercial y se midió DO a 405 nm empleando el lector de ELISA mencionado.

CULTIVO DE CÉLULAS Y EMPLEO DE ESTIMULADORES E INHIBIDORES CELULARES

Células Caco-2 se cultivaron en DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml y piruvato 110 mg/l. Las células confluentes cultivadas en placas de 24 pocillos se mantuvieron sin SFB durante 12 horas y luego se estimularon con IFN- γ humano recombinante (rh-IFN- γ) (10 ng/ml) o rh-IL-13 (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) durante 90 min. Se analizó la concentración de CCL26 en el sobrenadante de cultivo (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) como se describió anteriormente.

En paralelo se incubaron las células en presencia de los estímulos y dupilumab (anticuerpo monoclonal an-

ti-receptor alfa de interleuquina-4 humano) (50 μ g/ml) (Sanofi Genzyme, Regeneron, NY, EE.UU.) durante 48 horas a 37°C o de un inhibidor específico de JAK1 y JAK2, ruxolitinib, a distintas concentraciones (0,001, 0,01, 0,1, 1 ng/ml) (Novartis, Stein, Suiza) durante 2 horas a 37°C. Además, empleamos diferentes inhibidores de bomba de protones (IBP), omeprazol (Biotenk, Buenos Aires, Argentina), lansoprazol (Roemmers, Buenos Aires, Argentina) y pantoprazol (Baliarda S.A., Buenos Aires, Argentina) a diferentes concentraciones (1, 10, 50, 100 μ M) durante 2 horas a 37°C. Luego se cuantificaron los niveles de CCL26 como se indicó anteriormente.

ENSAYOS DE INMUNOTRASFERENCIA Y ESTUDIO DE LAS VÍAS INTRACELULARES DE ACTIVACIÓN

Las células Caco-2 fueron lisadas y recolectadas con 10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl y 0.1% Igepal en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y vanadato de sodio (VO₄Na) como inhibidor de fosfatasa. Se empleó el ensayo del ácido bicin-

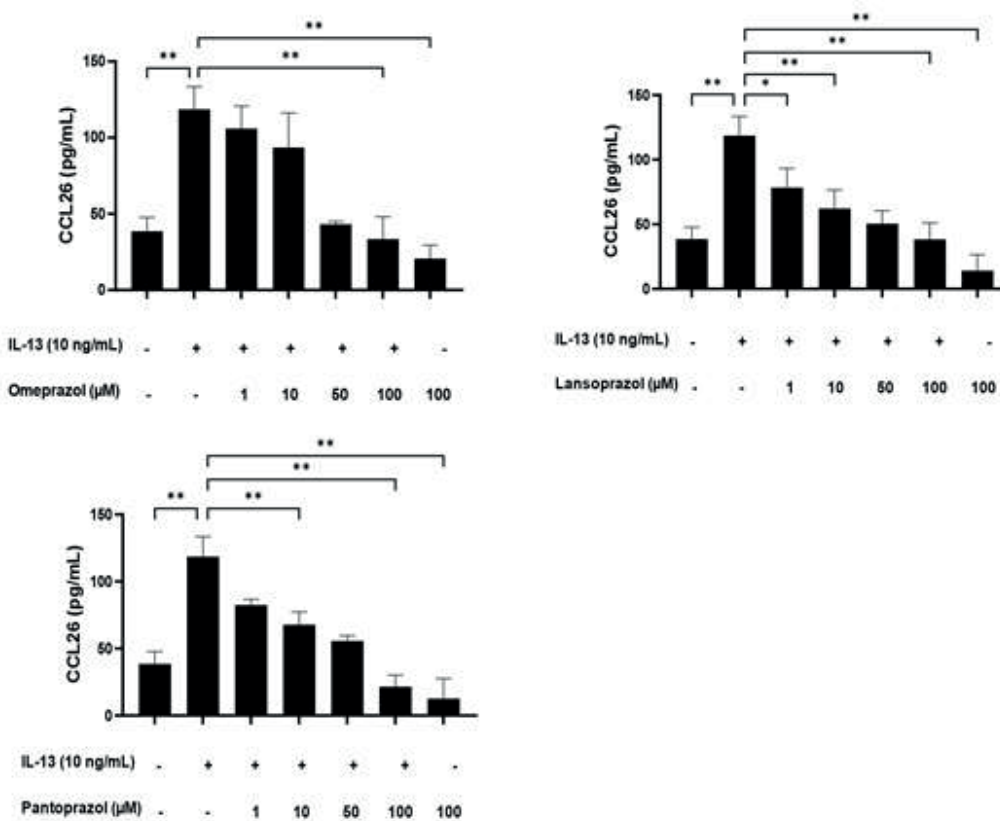


Figura 5. Análisis de la producción de CCL26 en Caco-2. Células Caco-2 fueron estimuladas con IL-13 y expuestas a diferentes inhibidores de la bomba de protones en distintas concentraciones (1-100 μ M). Los resultados están expresados en valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (* $p < 0,1$ y ** $p < 0,01$).

conínico (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) para determinar la cantidad total de proteína de cada lisado celular. Los extractos de proteínas de las células Caco-2 se resolvieron en geles SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras (Bio-Rad Mini Protean III; Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.) y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempsted, Reino Unido) durante 1 hora a 300 mA. Las membranas transferidas se bloquearon (suero equino/TBS) y se incubaron con anticuerpos anti-STAT6 o anti-fosfo STAT6 hechos en ratón, diluidos 1:600 y 1:2000, respectivamente (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EE.UU.) o con anticuerpos anti-STAT3 o anti-fosfo-STAT3 hechos en ratón diluidos 1:600 y 1:300, respectivamente (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EE.UU.) como anticuerpos primarios: luego se empleó un anticuerpo IgG antirratón obtenido en cabra conjugado con HRP diluida 1:3000 como anticuerpo secundario (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se empleó β -actina como control de carga interno empleando un anticuerpo primario anti- β -actina obtenido en conejo, diluido 1:2000 (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.) seguido de un anticuerpo IgG anticonejo obtenido en cabra conjugado con HRP diluida 1:3000 como anticuerpo secundario

(Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las bandas de proteínas se visualizaron mediante reactivos de quimioluminiscencia mejorados (ECL Plus; GE Healthcare, Danderyd, Suecia) y se escanearon con un escáner C digit (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, EE.UU.). La intensidad de cada banda se cuantificó empleando el software ImageJ.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación entre grupos pareados se realizó mediante la prueba t de Student. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,1$. Se utilizó GraphPad Prism 8.00 (San Diego, CA, EE. UU.) para el análisis estadístico.

RESULTADOS

ANÁLISIS DEL INFILTRADO CELULAR DE LOS PÓLIPOS COLORRECTALES

Estudios previos de nuestro grupo reportaron que un 47,9% de pacientes con sangrado rectal y sospecha de alergia alimentaria presentan pólipos colorrectales, pedunculados, en su gran mayoría únicos, con diferentes tamaños

y confinados a la porción del recto¹¹. Aquí analizamos 50 pólipos de este tipo y evidenciamos que el estroma presenta un infiltrado celular a diferencia del tejido analizado en biopsias obtenidas de zonas circundantes. En la **Figura 1A** se muestran imágenes representativas de estos infiltrados celulares y puede observarse que la celularidad de los pólipos está marcadamente incrementada en comparación al tejido circundante control o muestras colónicas de individuos sin patología inflamatoria. En este infiltrado celular se observa una elevada frecuencia de células mononucleares, mastocitos y eosinófilos (se muestran en forma magnificada en las fotos individuales). En la figura también se muestran como controles el análisis histológico de cortes obtenidos de pólipos adenomatosos (PA) e hiperplásicos (PH) obtenidos de pacientes adultos, dado que estos pólipos tumorales son infrecuentes en población pediátrica. En ninguno de estos casos se observa un infiltrado celular inflamatorio con presencia de eosinófilos.

La tinción de eosinófilos nos permitió realizar el recuento de los mismos y, como se muestra en la **Figura 1B**, encontramos un aumento significativo de la frecuencia de eosinófilos en los pólipos colorrectales en comparación con los controles analizados (TCC, TCS y PT) (43,06±22,32 vs 13,75±6,67, 12,10±2,98 y 3,23±2,66 eosinófilos o/HPF, respectivamente).

Dado que el infiltrado celular de P muestra características de ser inflamatorio y alérgico, analizamos los niveles de IgE en los diferentes tejidos colónicos (**Figura 2A**). Nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de IgE total en el estroma de los pólipos en comparación con las respectivas biopsias control de cada paciente (TCC) ($p < 0,01$). Asimismo, analizamos los niveles de IgE específica para diferentes alérgenos alimentarios y encontramos un aumento de los niveles de IgE específica para proteínas de leche de vaca en los pólipos en comparación con tejido circundante control ($p < 0,1$) (**Figura 2A**). Previamente demostramos una elevada frecuencia de células IgE⁺¹¹ en el estroma de los pólipos, con valores reducidos en el tejido circundante. Aquí, el análisis de la IgE total y específica sérica de los pacientes en los cuales se hallaron y removieron los pólipos mostró que el 90% de los mismos tienen IgE total elevada, mientras que el 6,8% tienen IgE específica para leche de vaca elevada (**Tabla 1**). Estos hallazgos se corresponden con los niveles elevados de IgE hallados en el tejido del pólipo.

En la **Figura 2B** se muestran células IgE⁺ en el estroma de los pólipos únicamente, algunas de las cuales corresponden a eosinófilos, por la forma bilobular de sus núcleos. Los tejidos controles analizados mostraron frecuencias reducidas de células IgE⁺. Asimismo, analizamos la presencia de CCL26 y en la figura 2C se muestra la presencia de esta quimiocina en las células del compartimento epitelial.

Las muestras de TCC correspondientes a las de P de cada paciente mostraron niveles reducidos de células IgE⁺ y ausencia de CCL26.

PRODUCCIÓN DE CCL26 POR CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES

Para estudiar las citoquinas predominantes en los tejidos, se cuantificaron por ELISA citoquinas tipo 1 (IFN- γ) y tipo-2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en lisados de biopsias colónicas y de pólipos de cada paciente. Nuestros hallazgos muestran un aumento de las citoquinas tipo 2 en los pólipos en comparación con las respectivas muestras de biopsias de tejido circundante (**Figura 3A**). El mayor incremento se observa para IL-13 ($p < 0,005$) y es importante resaltar que la relación IL-13/IFN- γ se encuentra significativamente más elevada en los pólipos, lo cual indica el predominio de un microentorno inflamatorio tipo 2.

Posteriormente, analizamos la secreción de CCL26 en la línea epitelial colónica humana Caco-2, ampliamente utilizada y validada para este tipo de estudios. El análisis de CCL26 o eotaxina-3 se fundamenta en que es una potente quimiocina para atraer eosinófilos a diferentes tejidos^{14,15}. En la **Figura 3B** se muestra el efecto de IL-13 sobre la secreción de CCL26. Puede observarse que esta citoquina tipo 2 promueve significativamente la producción y secreción de CCL26 en comparación con las células incubadas con medio de cultivo ($p < 0,5$). En la **Figura 3C** se muestran los resultados del estímulo de las células epiteliales con IL-4. Nuevamente observamos que la secreción de CCL26 es dosis-dependiente de esta citoquina y que el bloqueo del receptor de IL-13 o IL-4 mediante el empleo de dupilumab reduce marcadamente la producción y secreción de esta quimiocina. Asimismo, observamos que la producción de CCL26 inducida por IL-13 e IL-4 se suprime mediante el empleo de ruxolitinib, el cual inhibe a las kinasas intracelulares JAK1 y JAK 2.

Estos resultados indican que la vía STAT/JAK se encuentra implicada en la inducción de la expresión y secreción de CCL26 por citoquinas tipo 2. Para confirmar este hallazgo evaluamos la fosforilación de STAT3 y STAT6 por *immunoblotting* luego de incubar a las células epiteliales con IL-13, o IFN- γ como control (**Figura 4**). En la **Figura 4A** mostramos los resultados hallados en lisados celulares de Caco-2 incubadas con las citoquinas mencionadas. Observamos que sólo IL-13 indujo la fosforilación y consiguiente activación de STAT3, como puede observarse en el gráfico de la relación fosfo-STAT3/STAT3 ($p < 0,1$) (**Figura 4B**). En forma similar, encontramos que la vía de STAT6 se induce al incubar las células epiteliales con IL-13. En la **Figura 4B** se muestra la relación de la intensidad de las bandas de fosfo-STAT6 con respecto a la de la banda STAT6 ($p < 0,1$), en comparación con la condición control de células incubadas únicamente con medio de culti-

vo. Por lo tanto, IL-13 induce, a través de su receptor específico de membrana, la activación de las vías STAT3/JAK y STAT6/JAK y la consiguiente secreción de CCL26. Finalmente, evaluamos el efecto de los inhibidores de bombas de protones sobre la secreción de CCL26 promovida por IL-13. Como se observa en la **Figura 5**, omeprazol, lansoprazol y pantoprazol inhiben significativamente en forma dosis-dependiente la producción de eotaxina-3 por parte de células epiteliales colónicas humanas. También puede observarse que ninguna de las 3 drogas induce la secreción de CCL26 por sí solas.

DISCUSIÓN

Diferentes procesos inflamatorios que afectan el tracto gastrointestinal se caracterizan por un aumento en la frecuencia de los eosinófilos en el tejido afectado. Sin embargo, los mecanismos que gobiernan el reclutamiento de estas células no son del todo conocidos y probablemente difieran según se trate de una situación de homeostasis o patología. En este estudio, investigamos el rol que las células epiteliales tendrían como fuente de eotaxina-3 en la quimioatracción de eosinófilos en un entorno tisular dominado por citoquinas de tipo 2. Para ello estudiamos la producción y secreción de esta quimiocina en un tejido caracterizado por la presencia de alarminas y otras citoquinas que frecuentemente se encuentran elevadas en una inflamación alérgica¹⁶. En este trabajo demostramos que células Caco-2 estimuladas con IL-4 e IL-13 expresan y secretan eotaxina-3 a través de la activación de las vías intracelulares de señalización dependiente de STAT-3 y de STAT-6. Este proceso es específico de las citoquinas tipo 2 dado que con dupilumab, agente biológico bloquea a los receptores de membrana de IL-4 e IL-13, se inhibe su secreción. Por lo tanto, estos hallazgos indican que la célula epitelial colónica está implicada en la producción y secreción de eotaxina-3 que recluta activamente a los eosinófilos al tejido. También aquí mostramos que el estroma de pólipos colorrectales de pacientes con sensibilización alérgica a alérgenos alimentarios presenta un entorno dominado por citoquinas tipo-2, en especial IL-13, y que la secreción de CCL26 se da principalmente en el compartimento epitelial. Por el contrario, en tejido periférico no inflamado, donde IL-13 no se encuentra incrementada, los niveles de CCL26 son significativamente menores. En trabajos previos, demostramos que en el estroma de los pólipos se encuentran centros germinales activos en los cuales se sintetiza IgE a través de mecanismos de cambio de isotipo a ϵ ¹¹. La ausencia de niveles elevados de IgE en el tejido circundante al pólipo indica que la IgE se sintetiza en el mismo y que no proviene de sangre periférica. Por lo tanto,

el contexto inflamatorio del pólipo, probablemente inducido por las células epiteliales, es crítico en la promoción de la síntesis de IgE y el reclutamiento de eosinófilos al tejido mucosal.

En el tracto gastrointestinal, los eosinófilos son componentes celulares fisiológicos, tanto en intestino delgado como en colon. Se ha reportado que en homeostasis la frecuencia de estas células oscila en 9-26 eosinófilos/HPF en intestino delgado, mientras que en colon normal, el rango asciende a 20-50 eosinófilos/HPF, y principalmente se encuentran dispersos en la lámina propia aunque con localización cercana a las criptas^{17,18}. Esto probablemente implique una relación funcional entre las células epiteliales y los eosinófilos. En este estudio, hallamos que los eosinófilos se encuentran en un rango de 13-20 eosinófilos/HPF en colon normal (tejido circundante), mientras que, en los pólipos, la frecuencia se encuentra significativamente elevada (43,06+/-22,32 eosinófilos/HPF). Otros autores han reportado valores similares en pólipos nasales con un elevado recuento de eosinófilos y de quimiocinas asociadas al reclutamiento de estas células¹⁹. Del mismo modo, CCL26 ha sido descrita en situaciones similares en tejido pulmonar y en piel, siendo producida por células epiteliales bronquiales²⁰ y keratinocitos²¹ en un entorno inflamatorio alérgico en pacientes con asma y dermatitis²²⁻²⁴. Sin embargo, CCL26 no ha sido descrita en el contexto mucosal de pacientes con alergia alimentaria. La sobreexpresión de IL-13 ha sido también descrita como promotora de la disrupción de la integridad física de la barrera epitelial intestinal y la consiguiente inducción de un proceso inflamatorio que promueve el remodelamiento histológico²⁵⁻²⁸. En nuestro estudio, hallamos que distintas citoquinas tipo 2 están marcadamente incrementadas, pero IL-13 es la que se encuentra en mayores niveles. Esto generó la hipótesis de trabajo de nuestro estudio, que nos permitió demostrar que esta citoquina está fundamentalmente implicada en la secreción de CCL26 por parte de las células epiteliales. En este sentido, solo existe bibliografía que muestra resultados similares en líneas celulares. Blanchard y cols. reportaron que las líneas celulares colónicas humanas HT-29 CL.19A y T84 secretan eotaxina-3 al ser estimuladas por IL-4 o IL-13 en forma dosis-dependiente²⁹. Otros autores han reportado resultados en este sentido, en los cuales CCL26 se induce a través de la activación de la vía de STAT-6/JAK1. Aquí describimos que en células epiteliales colónicas humanas, las vías de activación celular dependientes de STAT-3 y STAT-6 asociadas a JAK1 y 2 se encuentran implicadas en el mecanismo de producción de eotaxina-3. Lan y cols. demostraron que biopsias de pacientes con cáncer colorrectal mostraron niveles elevados de CCL26 en estadios avanzados³⁰, proceso que se encuentra asociado a la evolución a malignidad. Asimismo, STAT-6 se ha demostrado que regula la expre-

sión de CCL26 en células esofágicas³¹ y en muestras de pacientes con esofagitis eosinofílica en las cuales existe un infiltrado inflamatorio alérgico³². Por el contrario, no hemos hallado correlación entre inflamación, eosinofilia y niveles tisulares de CCL5 o RANTES, a pesar que estas células expresan el receptor CCR1³³ y que RANTES se ha descrito como una quimiocina activa en la atracción de eosinófilos a los tejidos periféricos³⁴. Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que hay mecanismos específicos de inducción de condiciones quimioattractivas de eosinófilos en un entorno inflamatorio alérgico, dependiente principalmente del eje IL-13-CCL26.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que el estroma de los pólipos colorrectales de pacientes con sensibilización alérgica contienen un denso infiltrado celular inflamatorio dominado por eosinófilos y citoquinas tipo 2. El compartimento epitelial de los pólipos, y no del tejido circundante normal, muestra niveles elevados de eotaxina-3 y citoquinas tipo 2. El empleo de la línea epitelial

colónica humana Caco-2 nos permitió alcanzar una mayor comprensión de los mecanismos que promueven la secreción de este potente quimioattractante de eosinófilos. Hemos generado evidencia experimental por la cual las citoquinas tipo 2, IL-4 e IL-13, principalmente esta última, induce a través de sus receptores específicos, la activación de las vías de STAT-3/JAK1 y STAT-6/JAK-1 para activar la transcripción de CCL26. En conjunto, estos resultados sugieren que la inflamación alérgica, probablemente inducida en pacientes atópicos expuestos a alérgenos alimentarios, las células epiteliales juegan un papel central en las etapas tempranas de inducción de un infiltrado alérgico y posterior atracción de eosinófilos periféricos al tejido mucosal.

AGRADECIMIENTOS

JV y KEC son becarios de CONICET; RC, CIM y GHD son Investigadores de CONICET.

BIBLIOGRAFIA

- Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lubert KL, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophils mediate protective immunity against secondary nematode infection. *J Immunol* 2015;194:283–290. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1402219.
- Akuthota P, Weller P. Eosinophils and disease pathogenesis. *Semin Hematol*. 2012; 49:113–119. doi: 10.1053/J.seminhematol.2012.01.005.
- Travers J, Rothenberg ME. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol*. 2015;8:464–475. doi: 10.1038/MI.2015.2.
- Shah K, Ignacio A, McCoy KD, Harris NL. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2020;13:574–583. doi: 10.1038/S41385-020-0281-Y.
- Coakley G, Wang H, Harris NL. Intestinal eosinophils: multifaceted roles in tissue homeostasis and disease. *Semin Immunopathol*. 2021;43:307–317. doi: 10.1007/S00281-021-00851-2.
- Ahrens R, Waddell A, Seidu L, Blanchard C, Carey R, Forbes E, Lampinen M, Wilson T, Cohen E, Stringer K, et al. Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis. *J Immunol*. 2008;181:7390–7399. doi: 10.4049/JIMMUNOL.181.10.7390.
- Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J Immunol*. 2001;166:7571–7578. doi: 10.4049/JIMMUNOL.166.12.7571.
- DeBrosse CW, Case JW, Putnam PE, Collins MH, Rothenberg ME. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol*. 2006;9:210–218. doi: 10.2350/11-05-0130.1.
- Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirrottin D, Janss T, Starkl P, Ramery E, Henket M, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest*. 2016;126:3279–3295. doi: 10.1172/JCI85664.
- Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011;332:243–247. doi: 10.1126/SCIEN-CE.1201475.
- Canziani KE, Pucci Molineris M, Guzman L, Bernedo V, Garcia M, Altamirano EM, Muglia CI, Docena GH. Direct evidence for local IgE production in the human colonic mucosa. *Allergy*. 2021;76:1545–1549. doi: 10.1111/ALL.14594.
- Mercer N, Guzman L, Cueto Rua E, Drut R, Ahmed H, Vasta GR, Toscano MA, Rabinovich GA, Docena GH. Duodenal intraepithelial lymphocytes of children with cow milk allergy preferentially bind the glycan-binding protein galectin-3. *Int J ImmunopatholPharmacol*. 2009; 22:207–217. doi: 10.1177/039463200902200123.
- Docena G, Rozenfeld P, Fernández R, Fossati CA. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy*. 2002;57:83–91. doi: 10.1034/J.1398-9995.2002.103219.X.
- Baumann R, Rabaszowski M, Stenin I, Tilgner L, Scheckenbach K, Wiltfang J, Schipper J, Chaker A, Wagenmann M. Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27:266–272. doi: 10.2500/AJRA.2013.27.3913.
- Provost V, Larose M-C, Langlois A, Rola-Pleszczynski M, Flaman N, Laviolette M. CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *J Leukoc Biol*. 2013;94:213–222. doi: 10.1189/JLB.0212074.
- Chan R, Stewart K, Misirovs R, Lipworth BJ. Targeting Downstream Type 2 Cytokines or Upstream Epithelial Alarmins for Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10:1497–1505. doi: 10.1016/J.JAIP.2022.01.040.
- DeBrosse CW, Case JW, Putnam PE, Collins MH, Rothenberg ME. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol*. 2006;9:210–218. doi: 10.2350/11-05-0130.1.
- Shah K, Ignacio A, McCoy KD, Harris NL. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2020;13:574–583. doi: 10.1038/s41385-020-0281-y.

19. Saito H, Honda K, Asaka C, Ueki S, Ishikawa K. Eosinophil chemotaxis assay in nasal polyps by using a novel optical device EZ-TAXIScan: Role of CC-chemokine receptor 3. *Allergol Int.* 2016;65:280–285. doi: 10.1016/J.ALIT.2016.01.001.
20. Komiya A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, Hanai N, Furuya A, Ohta K, Matsushima K, et al. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol.* 2003;225:91–100. doi: 10.1016/j.cellimm.2003.10.001.
21. Kagami S, Saeki H, Komine M, Kakinuma T, Tsunemi Y, Nakamura K, Sasaki K, Asahina A, Tamaki K. Interleukin-4 and interleukin-13 enhance CCL26 production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *Clin Exp Immunol.* 2005;141:459–466. doi: 10.1111/J.1365-2249.2005.02875.X.
22. Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Torii H, et al. Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2003;134:309–313. doi: 10.1046/J.1365-2249.2003.02273.X.
23. Larose MC, Chakir J, Archambault AS, Joubert P, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:904–913. doi: 10.1016/J.JACI.2015.02.039.
24. Guttman-Yassky E, Bissonnette R, Ungar B, Suárez-Fariñas M, Ardeleanu M, Esaki H, Suprun M, Estrada Y, Xu H, Peng X, et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:155–172. doi: 10.1016/J.JACI.2018.08.022.
25. Purwar R, Werfel T, Wittmann M. IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T cells: possible role in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1043–1051. doi: 10.1038/SJ.JID.5700085.
26. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine.* 2015;75:25–37. doi: 10.1016/J.CYTO.2015.05.008.
27. Tazawa T, Sugiura H, Sugiura Y, Uehara M. Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 2004;295:459–464. doi: 10.1007/S00403-004-0455-6.
28. Koppes SA, Brans R, LjubojevicHadzavdic S, Frings-Dresen MHW, Rustemeyer T, Kezic S. Stratum Corneum Tape Stripping: Monitoring of Inflammatory Mediators in Atopic Dermatitis Patients Using Topical Therapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170:187–193. doi: 10.1159/000448400.
29. Blanchard C, Durual S, Estienne M, Emami S, Vasseur S, Cuber JC. Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2559–2573. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2005.06.010.
30. Lan Q, Lai W, Zeng Y, Liu L, Li S, Jin S, Zhang Y, Luo X, Xu H, Lin X, et al. CCL26 Participates in the PRL-3-Induced Promotion of Colorectal Cancer Invasion by Stimulating Tumor-Associated Macrophage Infiltration. *Mol Cancer Ther.* 2018;17:276–289. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0507.
31. Goswami R, Jabeen R, Yagi R, Pham D, Zhu J, Goenka S, Kaplan MH. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol.* 2012;188:968–975. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1102840.
32. Krishnamurthy P, Sherrill JD, Parashette K, Goenka S, Rothenberg ME, Gupta S, Kaplan MH. Correlation of increased PARP14 and CCL26 expression in biopsies from children with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:577–580.e2. doi: 10.1016/J.JACI.2013.09.031.
33. Phillips RM, Stubbs VEL, Henson MR, Williams TJ, Pease JE, Sabroe I. Variations in eosinophil chemokine responses: an investigation of CCR1 and CCR3 function, expression in atopy, and identification of a functional CCR1 promoter. *J Immunol.* 2003;170:6190–6201. doi: 10.4049/JIMMUNOL.170.12.6190.
34. Kuna P, Alam R, Ruta U, Gorski P. RANTES induces nasal mucosal inflammation rich in eosinophils, basophils, and lymphocytes in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:873–879. doi: 10.1164/AJRCCM.157.3.9610052.

ESTUDIO DEL PERFIL TH17 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CANDIDIASIS MUCOCUTÁNEA CRÓNICA DE LA PROVINCIA DE MENDOZA

Th17 profile in chronic mucocutaneous candidiasis pediatric patients in Mendoza province

Paula Sosa Venturi¹, Adriana Silvia González^{2,3}, Ana María Carolina Marín⁴, Sofía Carla Angiolini⁵, Claudia Elena Sotomayor^{6,7}

RESUMEN

Introducción. Las células Th17 producen IL-17A, que desempeña un rol relevante en la inmunidad antifúngica. Los linfocitos Th1 producen principalmente IFN γ , responsable de la inmunidad mediada por células. Polimorfismos genéticos asociados a defectos en la diferenciación y proliferación hacia Th17 aumentan la susceptibilidad a la candidiasis mucocutánea crónica (CMC).

Objetivo. Contribuir al diagnóstico de CMC en pacientes pediátricos mediante evaluación del perfil linfocitario Th17.

Diseño y población. Estudio observacional, transversal, analítico, prospectivo en individuos de 0 a 17 años con CMC. Se incluyeron 22 individuos controles de igual rango etario.

Método. Se aislaron células mononucleares de sangre de ambos grupos en estudio, se realizaron cultivos primarios estimulados in vitro con PMA/ionomicina. Se evaluó la frecuencia de linfocitos T CD4+ productores de IL-17A y linfocitos T CD4+ productores de IFN γ utilizando anticuerpos monoclonales y Citometría de Flujo. Además, se empleó la técnica de ELISA para la determinación de la concentración de IL-17A en sobrenadante de cultivo y suero.

Resultados. Se observó disminución en la frecuencia de linfocitos Th17 con aumento de los linfocitos Th1 en pacientes con CMC. Esta disminución no guardó relación con el diagnóstico referido, recurrencia de los síntomas, ni con la presentación clínica de la CMC. El análisis de la relación Th1/Th17 mostró desequilibrio, con un claro aumento (3,57 veces) en pacientes con CMC. No se observó correlación entre la frecuencia de células Th17 con la concentración de IL-17A.

Conclusiones. La citometría de flujo proporciona un método eficiente para identificar deficiencias en las células productoras de IL-17, aportando valiosa información sobre el fenotipo inmune del paciente, la severidad de su disfunción, la progresión de la enfermedad y como herramienta diagnóstica y facilitadora hacia la identificación del defecto molecular y el correcto tratamiento en pacientes con CMC.

Palabras clave: dandiasis, CMC, IL-17A, IFN γ , síndrome de hiper-IgE, STAT1-GOF, Th17, Th1, citometría de flujo, ELISA.

ABSTRACT

Introduction. Th17 cells produce IL-17A which is relevant for antifungal immunity. On the other hand, Th1 cells mainly produce IFN γ , which is responsible for cell-mediated immunity. Genetic polymorphisms associated with defects in differentiation and proliferation of Th17 cells increase susceptibility to chronic mucocutaneous candidiasis (CMC).

Objective. Contribute to CMC diagnosis in the pediatric population by evaluating the Th17 profile.

Design and population. An observational, cross-sectional, analytical, prospective study in individuals from 0 to 17 years of age with CMC was performed. Twenty-two control patients of the same age range were included.

Method. Blood mononuclear cells were isolated from both study groups, primary cultures generated with PMA/ionomycin as stimulant. The frequency of IL-17A and IFN γ -producing CD4+ T lymphocytes was evaluated using monoclonal antibodies and Flow Cytometry (FC). In addition, the ELISA technique was used to determine the concentration of cytokines in culture supernatant and serum.

Results. A decrease in the frequency of Th17 cells with an increase in Th1 cells was observed in patients with CMC. This decrease was not related to the referred diagnosis, recurrence of symptoms, or the clinical presentation of CMC. Analysis of the Th1/Th17 ratio showed an imbalance, with a clear increase (3.57-fold) in patients with CMC. No correlation was observed between the frequency of Th17 cells and the concentration of IL-17.

Conclusions. Flow Cytometry provides an efficient method to identify deficiencies in Th17 cells, providing valuable information on the patient's immune phenotype, the severity of its dysfunction, the progression of the disease; as a diagnosis and facilitator to identify the molecular defect and the correct treatment in CMC's patients.

Keywords: candidiasis, CMC, IL-17A, IFN γ , hyper-IgE syndrome, STAT1-GOF, Th17, Th1, flow cytometry, ELISA.

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2022;53(4):145-156

1. Bioquímica. Laboratorio de Histocompatibilidad dependiente del Instituto Coordinador de Ablaciones e Implantes de Mendoza (InCAIMen). Mendoza. Argentina
2. Licenciada en Bioquímica. Sección Inmunología. Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Central de Mendoza. Mendoza. Argentina.
3. Licenciada en Bioquímica. Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.
4. Bioquímica. Laboratorio de Citometría de Flujo dependiente del Programa Provincial de SIDA e Inmunodeficiencias (PAPSI). Mendoza. Argentina
5. Bioquímica. Becaria Doctoral. Departamento de Bioquímica Clínica. CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.
6. Dra. en Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina
7. Investigadora Principal, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Correspondencia: Claudia Elena Sotomayor. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre y Medina Allende, Córdoba. claudia.sotomayor@unc.edu.ar

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 19/07/2022 | Aceptado: 02/08/2022

INTRODUCCIÓN

La candidiasis mucocutánea crónica (CMC) es un grupo de trastornos genéticamente heterogéneos que se caracteriza por infecciones crónicas o recurrentes que afectan piel, uñas y membranas mucosas, típicamente causada por el género *Candida*, con *C. albicans* como el agente etiológico más frecuente¹.

C. albicans es un hongo pleomórfico perteneciente a la familia Saccharomycetaceae. En su morfotipo levaduriforme se comporta como un microorganismo saprófito y convive en simbiosis con su huésped. Forma parte del microbioma habitual de la mucosa del tracto digestivo, vaginal y respiratorio sin causar enfermedad². Cambios en el microambiente local y desequilibrios en los mecanismos de control, le permiten al hongo desplegar sus atributos de virulencia e iniciar los cambios morfológicos. La emisión de pseudomicelio y expresión de adhesinas facilitan la adherencia y penetración tisular, y la transición al morfotipo hifal contribuye a la invasión tisular y transformación en microorganismo patógeno^{3,4}. Este hongo puede provocar infecciones profundas⁵ o superficiales presentando diferentes manifestaciones de acuerdo a su localización³. En este último tipo, las formas clínicas de presentación de la enfermedad incluyen candidiasis oral u orofaríngea (OPC) también conocida como muguet, la cual también puede diseminarse hacia esófago, candidiasis intestinal, infección vaginal^{6,7} y candidiasis cutáneas, pudiendo manifestarse como intertrigos candidiásicos u onicomicosis^{2,8}.

En la respuesta inmune antifúngica, las células T CD4 + *helper* 17 (Th17), desempeñan un rol relevante^{4,8}. Esta población celular deriva de precursores CD4+ *naive* o vírgenes a través de la señalización de varias citoquinas inductivas incluyendo interleucinas (IL) como IL-6, IL-1 β , TGF- β e IL-23⁹, mientras que la IL-23 también es requerida para la expansión, mantenimiento y función efectora de este linaje¹⁰. Los factores de transcripción ROR γ t (*retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*) y STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) están implicados en la diferenciación y la función de las células Th17. Esta población celular produce IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y GM-CSF, siendo la IL-17A la citoquina referente de este perfil⁴. La IL-17 activa la señalización a través del receptor de IL-17, que induce la secreción de citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos relevantes para la actividad antifúngica local¹¹. La importancia de IL-17 en la inmunidad antifúngica protectora se evidenció en modelos animales en ratones y en humanos, donde varios defectos genéticos relacionados con la vía de señalización de IL-17 están asociados a una mayor susceptibilidad a adquirir CMC¹². Recientemente se demostró que las células T de memoria humana específicas de *Candida* son predominantemente células Th17¹³.

Las células Th1 también son importantes en la defensa antifúngica ya que mediante la liberación de citoquinas activan macrófagos y otros fagocitos potenciando los mecanismos candidicidas¹⁴. Estas células producen principalmente interferón gamma (IFN γ), citoquina considerada como marcadora de su perfil, e IL-2. Por otra parte, se ha sugerido que la señalización de IFN γ dependiente de STAT1 participa en la regulación negativa de las respuestas Th17^{15,16}. De este modo, el balance Th1 *vs.* Th17 puede ser utilizado como predictor de un determinado perfil de respuesta en patologías que involucran su función¹⁷.

Si bien la CMC es común en pacientes con inmunodeficiencias marcadas de células T, la mayor susceptibilidad a las infecciones por *Candida* spp. se debe a defectos inmunitarios en el reconocimiento del hongo y en las respuestas mediadas por células Th17 con diferentes mutaciones genéticas de fondo^{4,8,10}. La forma aislada del trastorno, que algunos autores denominan como *chronic mucocutaneous candidiasis disease* (CMCD) se presenta principalmente, o solamente, con candidiasis mucocutánea. Por el contrario, la forma sindrómica del trastorno se caracteriza por presentar infecciones no invasivas por *Candida* acompañado de infecciones recurrentes causadas por otros microorganismos^{18,19}.

Polimorfismos genéticos que conducen a defectos en el reconocimiento de *Candida* (CARD9, DECTIN-1), diferenciación y proliferación Th17 (STAT3, STAT1, TYK2, IL-12B, IL-12RB1) o señalización posterior a través de los receptores de IL17 (IL-17RA, IL-17RC, ACT1, IL-17F) aumentan la susceptibilidad a la CMC y proporcionan evidencia de la importancia del perfil Th17 en la inmunidad antifúngica^{18,20}.

El síndrome de hiper-IgE (HIES) es causado por mutaciones dominantes negativas en los dominios de unión a ADN o SH2 de STAT3 las cuales conducen a una deficiencia significativa en los Th17, presentando los pacientes, una mayor susceptibilidad a padecer CMC²¹. Las mutaciones con ganancia de función en el gen STAT1 (STAT1-GOF) son la etiología genética más común para CMC. Estas mutaciones conducen a respuestas defectuosas en las células Th1 y Th17. Se ha postulado que el desarrollo deficiente de las células productoras de IL-17 se debe al rol regulador negativo de IFN γ vía STAT1 en esta población celular^{15,16}.

En el presente trabajo se estudió el fenotipo inmune de 9 pacientes pediátricos con CMC de diferente etiología, concurrentes al Hospital Dr. Humberto Notti, de la ciudad de Mendoza, Argentina. Con el objetivo de contribuir al diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, se evaluó la frecuencia de Li Th17, Th1, su asociación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, recurrencia de los síntomas y mutaciones identificadas en los pacientes. Se evaluó también la correlación entre los resultados ob-

tenidos para una misma determinación por diferentes metodologías. La importancia de nuestro trabajo radica, por otro lado, en haber podido satisfacer la necesidad de implementar en la provincia una técnica de identificación de defectos del perfil Th17 como herramienta que colabore con el diagnóstico de CMC, para un abordaje temprano de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional, transversal, analítico y prospectivo en 9 pacientes con CMC y 22 individuos controles concurrentes al hospital pediátrico Dr. Humberto Notti de la ciudad de Mendoza reclutados en el período de febrero a mayo del año 2022.

Se incluyeron pacientes en el rango etario comprendido entre 1 a 17 años de edad, de sexo femenino y masculino, diagnosticados con CMC por el servicio de Inmunología del hospital Dr. Humberto Notti. Se excluyeron del estudio a los mayores de 17 años, individuos con inmunodeficiencias adquiridas, endocrinopatías o enfermedades autoinmunes y con diagnóstico negativo para CMC. Como grupo control se utilizaron muestras de individuos apareados en edad y sexo, sin signos clínicos de infección aguda ni antecedentes de enfermedades crónicas.

Todos los pacientes brindaron su aprobación para participar del estudio. Se firmaron formularios de consentimiento y/o asentimiento informado de acuerdo a la edad de cada individuo. El diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Salud del Hospital Dr. Humberto Notti. Acta N° 15/2022.

TOMA DE MUESTRA

De los pacientes con CMC y los individuos controles se extrajo por venopunción entre 7 a 10 ml de sangre entera, la cual se dividió en dos alícuotas. Una fue anticoagulada con EDTA y utilizada para la recuperación de células mononucleares para estudios de citometría de flujo y la otra, para obtención de suero. Las muestras conteniendo células se procesaron de manera inmediata, mientras que el suero se alícuotó y conservó a -80°C hasta la determinación de citoquinas por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

MÉTODOS

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

A partir de la muestra de sangre total anticoagulada se procedió a la purificación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll Hypaque 1.077 g/

cm^3 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania). Una vez aislada la interfase de células mononucleares, se realizaron dos lavados con *phosphate buffered saline* (PBS) y se ajustó la concentración a 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 (Cat#11875093, Gibco Laboratories, New York, USA) mediante recuento en cámara de Neubauer.

CULTIVO Y ESTIMULACIÓN ANTIGÉNICA IN VITRO

Para este estudio se utilizó PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) más Ionomicina (*calcium ionophore*). El PMA en combinación con la ionomicina son agentes activadores farmacológicos de células T y son utilizados para inducir la producción de citoquinas. Las citoquinas pueden ser posteriormente evaluadas en el sobrenadante del cultivo o acumuladas en el citoplasma celular empleando un bloqueante del transporte intracelular (*stop Golgi*) para impedir su secreción, lo cual permite la posterior identificación de células productoras de una determinada citoquina.

A tal fin se fraccionó la suspensión de CMSP en alícuotas de 1 ml cada una para ser utilizada en tres condiciones de cultivo diferente:

- Cultivo 1: control de respuesta basal y muerte celular. CMSP cultivadas en RPMI 1064 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich), en ausencia de estímulo e incubadas durante 5 hs.
- Cultivo 2: CMSP cultivadas en RPMI 1064-10% SBF, en presencia de PMA (Cat#P1585, Sigma-Aldrich) más Ionomicina (Cat#I0634, Sigma-Aldrich) en una concentración de 50 ng/ml y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente, durante 5 hs. Tres horas antes de cosechar las células se adicionó 0,7 μl de stop Golgi (Cat#554724 Becton Dickinson, Nueva Jersey, USA).
- Cultivo 3: CMSP cultivadas en RPMI 1064-10% SBF, en presencia de PMA más Ionomicina en una concentración de 50 ng/ml y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente, durante 5 hs. El sobrenadante de cultivo se recuperó para la posterior determinación de citoquinas por ELISA.

Todos los cultivos se realizaron en condiciones de esterilidad y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%²².

CITOMETRÍA DE FLUJO

Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales

Luego del cultivo y previo a la marcación con anticuerpos monoclonales, las células se lavaron dos veces con 1 ml de *stain buffer* (Cat#554656, Becton Dickinson) cada vez. Se realizó la inmunomarcación utilizando un Kit comercial: Human *Th1/Th17 Phenotyping kit* (Cat#560752, Becton Dickinson) conteniendo un cóctel de anticuerpos monoclonales (CD4 PerCP-Cy5.5 clon: SK3, IFN- γ FITC clon: B27, IL-17A PE clon: N49-653) Las cé-

lulas se fijaron con buffer de fijación (Cat#554655, Becton Dickinson), posteriormente se permeabilizaron (Cat#554723, Becton Dickinson) y finalmente se realizó la marcación con anticuerpos monoclonales de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para este Kit. Se utilizaron controles de isotipo para confirmar la especificidad de unión del anticuerpo y descartar interacciones inespecíficas²³.

Adquisición y evaluación de las muestras

Las muestras se adquirieron con un citómetro de flujo FACs CANTO II (Becton Dickinson), considerando un mínimo de 20.000 eventos CD4+. El porcentaje de células positivas para IL-17A e IFN- γ se midió dentro de la población CD4+. Los datos se analizaron con el programa FACsDiva (BD FACs Diva v9.0 Software).

Estrategia de selección de la población celular (Gate)

En primer lugar se realizó un *gate* morfológico para linfocitos (Li), en donde la población celular de interés se seleccionó por tamaño y complejidad interna (P1) *Forward versus Side Scatter* (FSC vs SSC). Posteriormente, a partir de P1, se seleccionaron aquellas células que expresan CD4+ en su superficie (P2) (**Figura 1**). Sobre esta población de linfocitos CD4+ (100%), se determinó el porcentaje de células que expresaron IL-17A intra-citoplasmáticamente, quedando así definido la población celular Th17 (CD4+IL-17A+); el mismo procedimiento se realizó para evaluar el porcentaje de células con expresión citoplasmática de IFN γ , definiendo así el perfil Th1 (CD4+IFN γ +).

ELISA DE CAPTURA

Con el fin de evaluar la producción de interleuquinas a través de una segunda técnica, el suero de los pacientes y el sobrenadante de cultivo de PBMC, se utilizaron para medir las concentraciones de IL-17A (*Human IL-17A ELISA*, Cat#DY317, RD Systems) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron por extrapolación de la curva estándar²⁴.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante la prueba de la t de Student para datos apareados con el propósito de comparar pacientes con CMC y control sano. Los resultados se expresaron como medias \pm SEM y el nivel de significación se estableció en un valor de $p \leq 0,05$. ANOVA con post test de Bonferroni para poder comparar entre 3 grupos de pacientes. Correlación de Pearson entre dos variables para una misma muestra. Los datos se analizaron con el software GraphPad PRISM 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON CMC PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

La CMC corresponde a un grupo heterogéneo de patologías asociado a desórdenes monogénicos o mutaciones puntuales, que comprometen la defensa antifúngica. Los estudios inmunológicos permiten aportar evidencia sobre el fenotipo de los pacientes con CMC y la severidad de la disfunción²³. Con el objetivo de contribuir al diagnóstico y seguimiento de estos pacientes en la provincia de Mendoza, se procedió a la implementación de la técnica diagnóstica por citometría de flujo, estudiando la población de linfocitos Th17 en una cohorte de 9 pacientes con CMC concurrentes al Hospital Dr. Humberto Notti de Mendoza (**Tabla 1**). El rango etario de los pacientes fue entre 1 y 17 años, 6 de ellos de sexo masculino y 3 femenino. Respecto al diagnóstico y genotipo de los pacientes, 4 de ellos presentaron sintomatología clínica característica y se diagnosticaron como CMC, 2 de ellos hermanos; otros 3 individuos presentaron CMC con una mutación en STAT1-GOF, 2 de ellos hermanos; y los 2 pacientes restantes con HIGES con mutación en STAT3. Se constató la localización de las lesiones a nivel de los tractos mucosos y/o cutáneos, como así también la recurrencia de los síntomas en el transcurso de un año, los años de evolución desde el diagnóstico de la enfermedad, y el tratamiento indicado en cada caso. Además, se incluyeron 22 muestras de pacientes controles sanos apareados en edad y sexo.

LOS PACIENTES CON CMC PRESENTAN UNA ALTERACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS HACIA EL PERFIL TH17

Las células Th17 desempeñan un rol clave en la respuesta inmune antifúngica, participando en la inmunidad protectora a nivel de las barreras mucosas y cutáneas²⁵. Su efecto biológico es mediado por la liberación de citoquinas, principalmente por la IL-17²⁶. La capacidad funcional de esta población celular puede ser determinada *ex vivo* luego de la estimulación de las CMSP con un mitógeno, y anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas o marcadores expresados en la superficie celular, o en citoplasma. En este trabajo evaluamos la producción intracelular de citoquinas en la subpoblación de Li T CD4+ de pacientes con CMC e individuos controles, mediante la estimulación *in vitro* de CMSP con PMA/ionomicina y posterior identificación por citometría de flujo de (**Figura 1**). Basados en la morfología celular (FSC vs SSC) y en la expresión del marcador de superficie CD4, definimos la población de estudio, sobre la cual se determinó la producción de citoquinas intracelulares (**Figura 1A**). La técnica de CF permite la identificación simultánea de diferentes perfiles in-

TABLA I. Datos demográficos, genéticos y clínicos de los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica.

Sexo	Edad	Diagnóstico/ Defecto genético	Manifestación clínica			Tratamiento
			Sitios anatómicos afectados	Nº de episodios anuales	Tiempo de evolución desde el diagnóstico	
M	11	CMC	Mucosa oral	3	1 año	Sin tratamiento
F	12	CMC	Mucosa oral	2	5 años	Fluconazol Dosis tratamiento (150 mg/día durante 30 días)
			Mucosa vaginal Cutánea inguinal	2 0 a 1		
F ¹	15	CMC	Mucosa oral Cutánea ungueal	0 a 1 Persistente	15 años	Profilaxis con fluconazol (150 mg/semana)
M ¹	6	CMC	Mucosa oral	10 a 12	6 años	Profilaxis con fluconazol (50 mg/semana)
F ²	11	STAT1-GOF	Mucosa Oral	7 a 8	2 años	Profilaxis con fluconazol (50mg/semana)
M ²	12	STAT1-GOF	Mucosa oral	5	3 años	Profilaxis con fluconazol (50 mg/semana)
M	17	STAT1-GOF	Mucosa oral	7 a 8	1 año	Profilaxis con fluconazol (150 mg/semana)
			Cutánea ungueal	1		
			Mucosa esofágica	1		
M	1	CMC+HIGES	Mucosa oral	10 a 12	1 año	Profilaxis con fluconazol (50 mg/semana)
M	7	CMC+HIGES	Mucosa oral	1	3 años	Sin tratamiento

F (Femenino); M (Masculino); HIGES (Síndrome de hiperinmunoglobulina E); STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1); GOF (gain-of-function); STAT-3 (signal transducer and activator of transcription-3). ^{1,2} Hermanos de una misma familia.

munológicos dependiendo de las proteínas que expresen. De esta manera, en una misma muestra, puede establecerse el perfil Th1 y Th17 determinado por la expresión intracelular de IFN γ e IL-17A, respectivamente.

Se evaluó la frecuencia de Li T CD4+ productoras de IL-17A e IFN γ en pacientes con CMC e individuos controles sanos. La **Figura 1B** muestra *dot plots* representativos de cada grupo evaluado. Se observó, que el porcentaje de células productoras de IL-17A, se redujo significativamente en los pacientes con CMC en comparación con los individuos controles (**Figura 1C**), evidenciando una disminución de la población de los Li Th17 en los individuos con la patología. Cuando el perfil Th1 fue evaluado, observamos que el porcentaje de células productoras de IFN γ aumentó significativamente en los pacientes con CMC en comparación con controles sanos (**Figura 1D**).

El estudio del porcentaje de linfocitos CD4+ IL-17A+ en 20 individuos controles sanos incluidos en esta cohorte, nos permitió establecer el valor muestral de media \pm SEM igual a 0,89% \pm 0,37% para los Li T CD4+ IL-17A+, con un rango de variación entre 0,52% a 1,26%. Los resultados obtenidos para la población Th17 en los pacientes con CMC mostraron que un 66,6% de los individuos afectados poseen valores por debajo o en el límite inferior del rango establecido.

También se determinó el porcentaje de Li T CD4+ IFN γ + en 22 individuos controles, estableciéndose el valor de la media \pm SEM de 7,07% \pm 4,04%, con un rango de variación que osciló entre 3,03% y 11,11%. Se observó que solo el 44,4% de los pacientes con CMC presentan valores por encima de este intervalo.

LA FRECUENCIA DE LI TH17 EN LOS PACIENTES CON CMC NO GUARDA RELACIÓN CON LOS SITIOS COMPROMETIDOS, NI CON LA RECURRENCIA DE LOS SÍNTOMAS

Con el propósito de establecer si la disminución de la frecuencia de células productoras de IL-17A guarda alguna relación con las diferentes localizaciones de la infección por *Candida*, se agruparon a los pacientes en dos categorías; Aquellos pacientes con presentación clínica únicamente a nivel mucoso, como muguet o candidiasis vaginal, o aquellos con la presentación de la enfermedad asociada con afectación a nivel cutáneo (**Figura 2A**). Debido a que también se observaron cambios en la frecuencia de células productoras de IFN γ en estos pacientes, se analizó la existencia de alguna asociación según las lesiones fueran mucosas o mucocutáneas. La **Figura 2B** muestra la distribución individual en cada paciente con CMC según el sitio comprometido con la infección y la frecuencia de Li Th1; no se observaron diferencias significativas cuando ambos grupos se compararon. Los valores promedios de cada grupo de pacientes, se compararon con los valores de referencia establecidos para individuos controles sanos para ambas poblaciones celulares en estudio; no se observaron diferencias significativas entre los grupos cuando la frecuencia de células productoras de IL-17A fue comparada (**Figura 2C**). Al realizar este análisis sobre la frecuencia de células productoras de IFN γ , tampoco se encontraron diferencias significativas (**Figura 2D**).

Las infecciones superficiales causadas por *C. albicans* en pacientes con CMC se caracterizan por presentarse de manera recurrente o persistente a lo largo del tiempo¹. Con el objetivo de establecer si existe asociación entre la periodi-

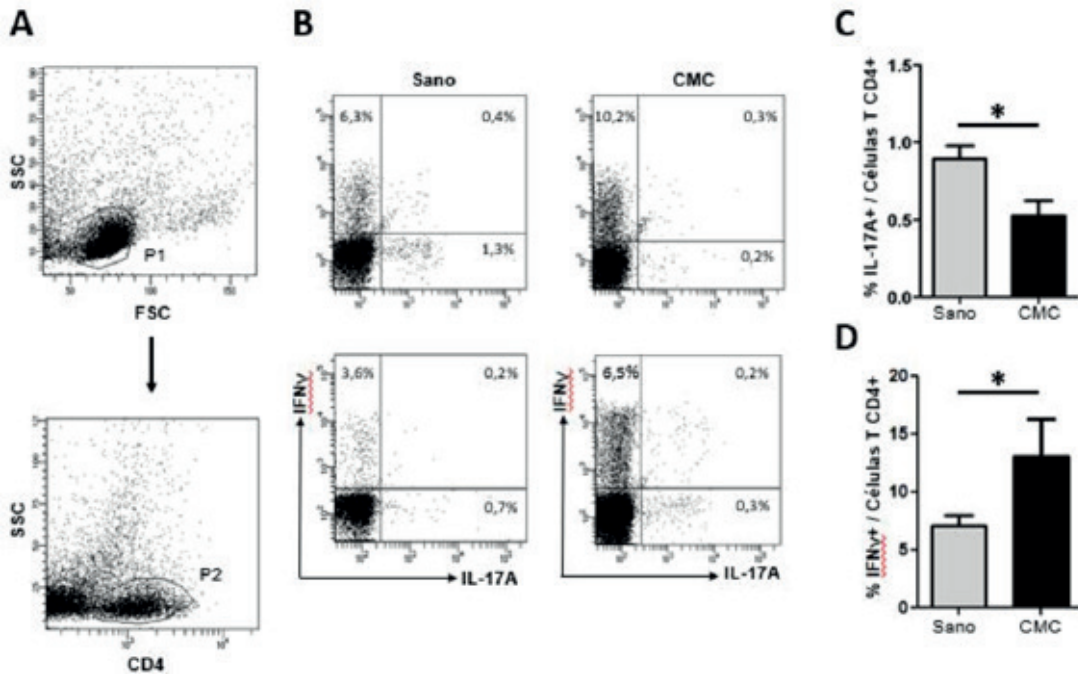


Figura 1. Producción de IL-17A e IFN γ en pacientes con CMC. CMSP de pacientes con CMC e individuos controles, estimuladas in vitro e inmunomarcadas con Ac anti-CD4, Ac anti-IL-17A y Ac anti-IFN γ , evaluadas por citometría de flujo. A) Dot plots representativos de la estrategia de gate utilizada, P1 gate morfológico para linfocitos (FCS vs SSC), P2 linfocitos con expresión CD4 de superficie. B) Dot plots representativos que muestran el análisis por citometría de flujo de los porcentajes de linfocitos CD4+ estimulados (P1 and P2) productores de IL-17A e IFN γ . C) Porcentaje de células con expresión de IL-17A en individuos control sano (n=20) y en pacientes con CMC (n=9). D) Porcentaje de células con expresión de IFN γ en individuos control sano (n=22) y pacientes con CMC (n=9). C y D) Se utilizó estadístico T test. Media \pm SEM *p<0,05.

cidad de los síntomas y el porcentaje de células Th17, se estableció la frecuencia promedio anual de la recurrencia de síntomas de la cohorte en estudio y, en base a eso, los pacientes se clasificaron según presentaran una frecuencia menor o mayor 7 episodios de candidiasis en el transcurso de un año. No se observaron diferencias significativas para este parámetro (**Figura 2E**). Resultados similares se hallaron cuando la frecuencia de células Th1 y la recurrencia de los síntomas fue analizada (**Figura 2F**).

LA FRECUENCIA DE LI TH17 ES INDEPENDIENTE DE LA MUTACIÓN MOLECULAR QUE PRESENTE EL PACIENTE

La incidencia real de la enfermedad de CMC se desconoce, y se carece de datos nacionales de referencia. En tal sentido, el grupo de pacientes incluidos en este trabajo representa una muestra sumamente valiosa para el análisis de diferentes parámetros clínicos de la enfermedad y su relación con el fenotipo inmune de cada paciente. Aunque el número de pacientes en nuestra cohorte fue de 9 individuos, y en virtud de la escasez de publicaciones nacionales que pueden ser consultadas, es que se procedió a estudiar la existencia de algún per-

fil particular en el grupo de pacientes. Evaluamos la frecuencia de células productoras de IL-17A, teniendo en cuenta el diagnóstico referido que acompaña a la presentación clínica de CMC como principal síntoma, ya sea se trate de un síndrome de hiper-IgE con mutación en STAT3, pacientes con mutación STAT1-GOF, o pacientes que no tienen una mutación genética confirmada al momento de realizar este estudio. Los resultados obtenidos para cada grupo se compararon entre sí, y con el grupo de individuos controles. No encontramos diferencias significativas entre los grupos de pacientes estudiados (**Figura 3A**). Al realizar este mismo análisis sobre la frecuencia de células productoras de IFN γ , observamos un aumento significativo en los pacientes que presentan CMC asociada a HIGES respecto a los individuos controles (**Figura 3B**), sin observar diferencias estadísticas para el resto de los grupos analizados.

EXISTE UN MARCADO AUMENTO EN LA RELACIÓN TH1/TH17 EN PACIENTES CON CMC

La variación en el balance entre linfocitos de diferente perfil funcional puede ser indicador de defectos en los mecanismos de respuesta inmune en distintas patologías^{27,28}.

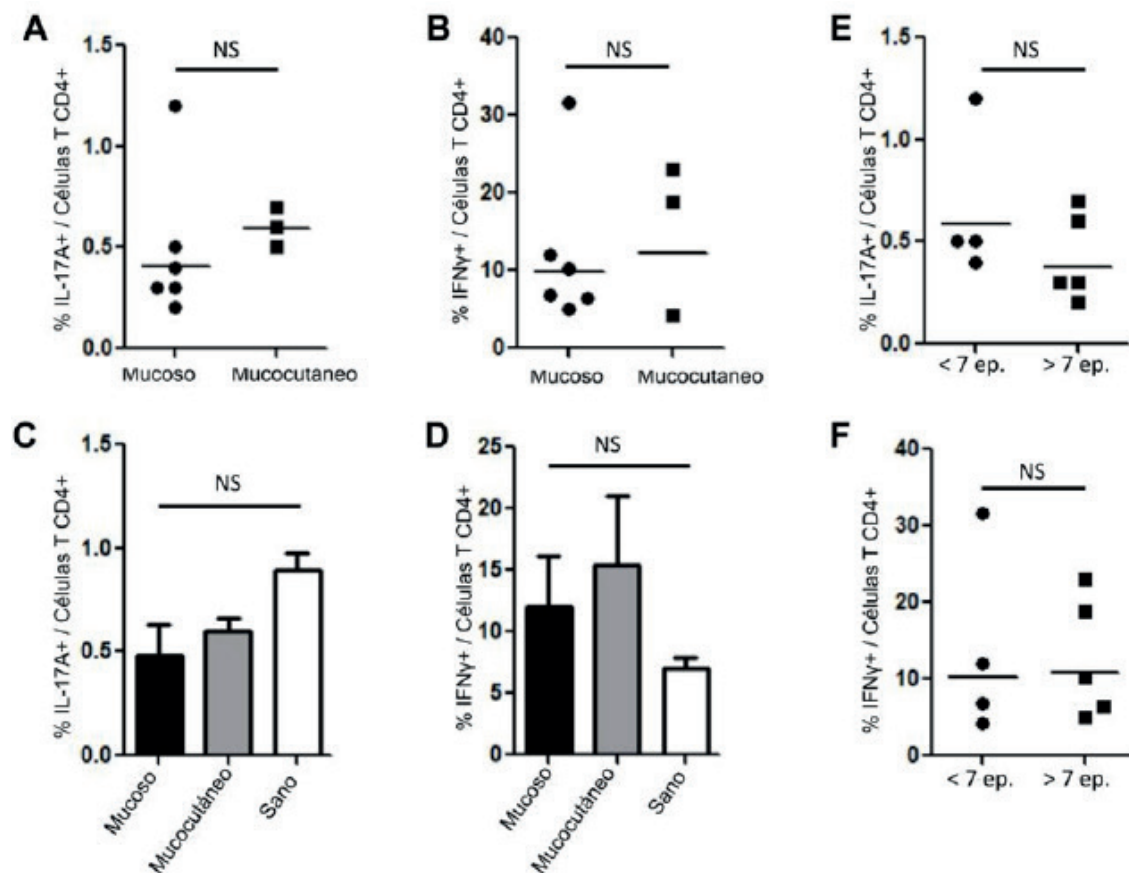


Figura 2. Localización y recurrencia de los síntomas en CMC. Células productoras de IL-17A e IFN γ de acuerdo a la localización y recurrencia de los síntomas en pacientes con CMC e individuos controles. A) Distribución individual del porcentaje de linfocitos CD4+ con expresión de IL-17A según la localización de síntomas a nivel mucoso o mucocutáneo (n=9). B) Distribución individual del porcentaje de linfocitos CD4+ IFN γ + según localización mucoso o mucocutáneo (n=9). C) Medias poblacionales que muestran comparación del porcentaje de linfocitos CD4+ IL-17A+ según la localización de síntomas a nivel mucoso (n=6) o mucocutáneo (n=3) y en pacientes control sano (n=20). D) Medias poblacionales mostrando comparación del porcentaje de linfocitos CD4+ IFN γ + para diferente localización de síntomas mucoso (n=6) o mucocutáneo (n=3) y en pacientes control sanos (n=22). E) Distribución individual del % de Li CD4+ IL-17A+ según la frecuencia de presentación de episodios de CMC sea menor o mayor a 7 presentaciones anuales (n=9). F) Distribución individual del % de Li CD4+ IFN γ + según la frecuencia de presentación de episodios (ep.) (n=9). A,B,E y F) Se utilizó estadístico T test Media \pm SEM $p < 0,05$. C y D) Se utilizó estadístico de ANOVA con post test de Bonferroni $p < 0,05$.

Con este propósito, establecimos el cociente entre los porcentajes de células con perfil Th1, en relación a las células con perfil Th17 (ratio Th1/Th17) en pacientes con CMC. Observamos, que este parámetro fue estadísticamente diferente con respecto al valor obtenido para el grupo control, siendo significativamente mayor (3,57 veces) en los pacientes con la patología (Figura 4A). En el panel B de la figura 4, se muestra la correlación entre el porcentaje de células productoras de IFN γ vs. el porcentaje de células productoras de IL-17A, para una misma muestra. No observamos correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de ambas poblaciones celulares en estudio en el grupo de pacientes con CMC, como así tampoco en los individuos sanos (Figura 4B).

LA FRECUENCIA DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-17A, NO MOSTRÓ CORRELACIÓN CON LA SECRECIÓN DE IL-17A

El estudio de las poblaciones inmunes productoras de una determinada citoquina por la técnica de citometría de flujo requiere una infraestructura compleja y por ello no es una metodología disponible en todos los laboratorios de análisis clínicos; en tanto, las técnicas que permiten evaluar la concentración de una citoquina en sobrenadante de cultivo o suero son más accesibles. Con el fin de comparar dos metodologías que permitan evaluar el perfil de respuesta Th17 en los pacientes con CMC, se determinó para un mismo individuo la expresión de células productoras de IL-17A en CMSP por citometría de flu-

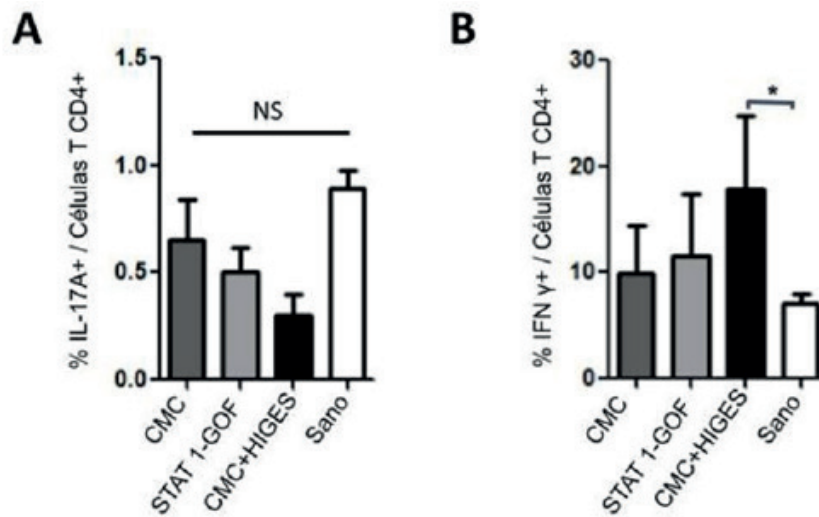


Figura 3. Mutaciones moleculares que acompañan a la CMC. Células productoras de IL-17A e IFN γ teniendo en cuenta el diagnóstico referido que acompaña a la manifestación clínica de candidiasis y en pacientes control sano. A) Media poblacional que muestra la comparación del porcentaje de linfocitos CD4+ IL-17A+ entre el grupo de pacientes sin mutación genética confirmada al momento de realizar este estudio (CMC), pacientes con Síndrome de Hiper IgE (HIGES), pacientes con mutación en STAT1 con ganancia de función (STAT1-GOF) (n=9) entre sí y con pacientes control sano (n=20). B) Media poblacional mostrando la comparación entre el porcentaje de linfocitos CD4+ IFN γ + para los diferentes diagnósticos que acompañan a CMC (n=9) y en pacientes control sanos (n=22). A y B) Se utilizó estadístico de ANOVA con post test de Bonferroni p<0,05.

jo (%CD4+ IL-17A+) y se correlacionó con la concentración de IL-17A (pg/ml) en sobrenadante de cultivo utilizando la técnica de ELISA (Figura 5). El análisis efectuado permitió establecer que no existe correlación en los resultados obtenidos por ambas técnicas para un mismo paciente con CMC.

Finalmente, y con el mismo propósito antes mencionado, se consideró implementar la determinación de la concentración sérica de IL-17A (pg/ml) utilizando la técnica de ELISA. Se procedió a realizar la determinación en una muestra representativa de individuos de nuestra cohorte (n=6) y en individuos controles (n=6), la concentración de esta citoquina resultó no detectable por la metodología utilizada. Estos resultados están en concordancia con lo reportado para pacientes con otras formas de infección por este hongo⁷.

DISCUSIÓN

La CMC es una enfermedad que afecta a la población pediátrica, con una mayor incidencia en la primera infancia. Generalmente se manifiesta asociada a fallas o disfunciones inmunes congénitas en los mecanismos de respuesta antifúngicos^{1,18,19}. En nuestro país, no existen datos de la incidencia de esta patología, hecho posiblemente asociado a la falta de registros públicos y a la complejidad de

realizar un diagnóstico inmunológico y genético que permita su correcta identificación. Por otro lado, Argentina cuenta con escasos laboratorios con posibilidades de realizar este tipo de estudios, lo cual determina la gran relevancia del desarrollo y puesta a punto de metodologías sensibles, como herramientas que colaboren con el diagnóstico de CMC, para un abordaje temprano de la enfermedad.

Este trabajo se centró en el estudio de la población de Li Th17 en 9 pacientes pediátricos con CMC de diferente etiología, concurrentes al Hospital Dr. Humberto Notti, de Mendoza. El objetivo fue contribuir al diagnóstico, orientar sobre la severidad de la enfermedad y el seguimiento de su evolución. En esta cohorte, se evaluó la frecuencia de las poblaciones de linfocitos Th17 y Th1 de en sangre periférica, el balance entre las mismas expresado como la relación Th17/Th1 y la existencia de posibles asociaciones con características clínicas de la CMC. Se incluyeron también 22 individuos controles. Las poblaciones celulares se evaluaron por citometría de flujo, y la concentración de IL-17A por la técnica de ELISA.

Nuestros resultados mostraron que la frecuencia de células Th17 estuvo significativamente disminuida en pacientes con CMC, en comparación con los individuos controles. De esta manera, se aporta al diagnóstico clínico evidencia sobre la característica de la disfunción inmune presente en estos pacientes. Estos resultados están de acuerdo

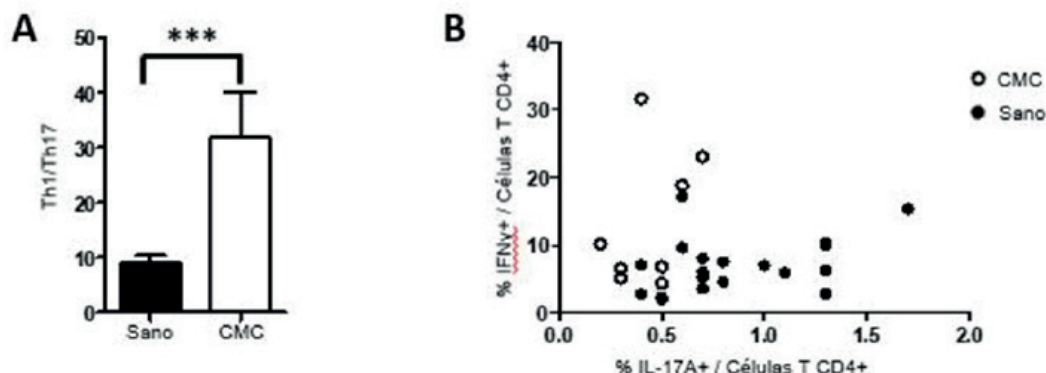


Figura 4. Balance en poblaciones linfocitarias Th1 y Th17. Relación entre LiTh1 y Th17 en pacientes con CMC e individuos controles. A) Valor promedio de la relación entre las poblaciones celulares Th1/Th17 de individuos controles y en pacientes con CMC. Se utilizó estadístico T test Media \pm SEM $p < 0,05$. B) Correlación de Pearson entre los porcentajes de células CD4+ con expresión de INF γ e IL-17A para una misma muestra en pacientes con CMC ($r=0,387$; $p=0,343$) y pacientes controles ($r=0,383$; $p=0,087$).

con lo reportado por otros autores^{29,30} y reafirman que las fallas o defectos en la población Th17 contribuyen a la falta y/o alteración de respuesta inmune frente a la infección por *Candida* ssp.³¹ Los mecanismos por los cuales ocurre esta disminución aún no se comprenden por completo y continúan siendo tema de estudio. Trabajos en modelos animales de infecciones mucosas por *Candida* en ratones normales, o con deleciones en algunos elementos que conducen a la diferenciación y a las vías intracelulares dependiente de IL-17, aportan evidencia en este sentido^{32,33}. En pacientes con la enfermedad y mutaciones puntuales identificadas, la característica de la disfunción fue establecida^{34,35}. En nuestro estudio, el 66,6% de los pacientes presentó valores de linfocitos Th17 por debajo del rango determinado en los individuos controles. En este sentido, la determinación de este parámetro inmunológico podrían ser de utilidad como marcador de enfermedad, contribuyendo así con el diagnóstico de CMC. Actualmente, en nuestro país la identificación este tipo de deficiencias solo se realiza en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, por lo tanto, la implementación de esta metodología diagnóstica en un hospital de referencia en la región de Cuyo constituye un aporte significativo para la precoz identificación de estos pacientes y su temprano tratamiento.

La frecuencia de células productoras de INF γ , hallada en los pacientes de esta cohorte, fue superior en el grupo de individuos con CMC en comparación con los controles, evidenciando un predominio del perfil Th1 en detrimento del perfil Th17. Cerboni y cols.¹⁷ sostienen que este fenómeno ocurre como un mecanismo compensatorio de respuesta frente a la disfunción, y que está determinado por la plasticidad de las células T *helper* en búsqueda de desarrollar una respuesta inmune efectiva frente a la infección

por *Candida* ssp. De esta manera, se desencadena una respuesta inmune protectora de tipo Th1, aunque finalmente resulta insuficiente para contrarrestar la infección. Por otra parte, Park y cols.³⁶ también señalan que, debido a la falta de una respuesta antifúngica eficiente y al hecho de que el mecanismo de retroalimentación negativa que regula la expansión de las células Th1 con el fin de mantener la homeostasis, también se ve alterado, la respuesta Th1 se encuentra potenciada. Sin embargo, nuestros resultados muestran que solo un 44,4% de los pacientes con CMC presentaron valores por encima del rango de referencia de nuestra cohorte para células productoras de INF γ . Los efectos biológicos de los Li Th17 son mediados por citoquinas liberadas por estas células, y dentro de ellas la IL-17A desempeña un rol relevante^{11,12}. En este trabajo evaluamos su concentración en sobrenadante de cultivo. No encontramos correlación entre los resultados obtenidos para IL-17A (ELISA) y la población de Li productores de IL-17A determinados por citometría de flujo. Aunque la técnica de ELISA es una metodología más económica y asequible a varios laboratorios clínicos, cuenta con un nivel de sensibilidad que resulta insuficiente para la medición de este tipo de citoquinas. Aquí reportamos valores detectables solo para algunas muestras de sobrenadante de cultivo, e incluso su concentración resultó indetectable en todas las muestras de suero analizadas⁷. Estas observaciones denotan la importancia de la realización de los cultivos celular primarios y la estimulación linfocitaria *in vitro* para aumentar la sensibilidad de la medición²², resaltando la importancia del estudio funcional de la población Th17, utilizando citometría de flujo, como tecnología de vanguardia para el estudio de este tipo de patologías.

La CMC puede presentar diferente etiología. Pacientes con HIES y mutación en STAT1-GOF desarrollan CMC

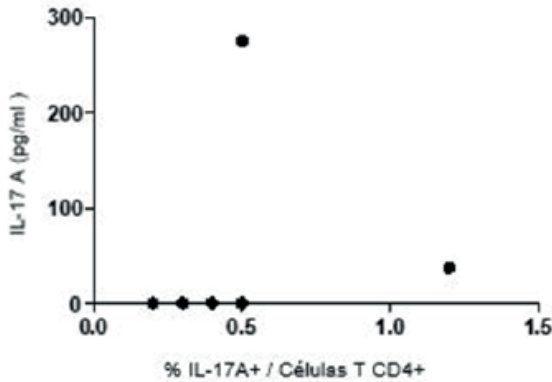


Figura 5. Estudio de correlación entre las determinaciones de Citometría de Flujo y ELISA. Correlación de Pearson para pacientes con CMC entre la frecuencia de células productoras de IL-17A (% LiCD4+IL-17A+) obtenidos por citometría de flujo, en comparación con la secreción de IL-17A (pg/ml) obtenidos por ELISA en sobrenadante de cultivo ($r=0,107$; $p=0,42$).

como un fenotipo infeccioso importante que es categorizado como CMC sindrómico. Por el contrario, en la CMCD, las manifestaciones mucocutáneas características del fenotipo se dan en ausencia de otros signos clínicos prominentes, y asociado también con defectos genéticos que tiene un impacto directo en la señalización de IL-17¹⁸. La incidencia real de la enfermedad se desconoce, sin embargo, las cifras para HIES en Argentina es de 1 en 1.000.000 recién nacidos vivos, con una relación de prevalencia de hombres respecto de las mujeres de 2:1³⁷. No obstante, y a pesar de que el número de pacientes que pudieron ser reclutados fueron 9, la cohorte en estudio representa el espectro de estas tres formas de CMC. En ella, se observó que la prevalencia de la enfermedad respecto al sexo fue 2:1, hombre respecto de mujeres y en el caso particular de CMC-HIES, los dos pacientes fueron varones. Nuestro estudio arrojó resultados que concuerdan con lo publicado por otros autores^{29,30}, encontrando disminución de la frecuencia de células Th17, aunque esta disminución fue independiente de si el paciente presentó una mutación molecular o fuera clasificado como CMC. El vínculo común entre todos estos trastornos es una deficiencia en la función efectora de la población Th17. Mientras que en la CMC aislada el pronóstico es bueno, la morbilidad está relacionada con la cronicidad y persistencia de las infecciones por *Candida* en piel, uñas y membranas mucosas; por lo que comprender mejor la biología Th17 con el fin de modular su función, mediante la implementación de diferentes tratamientos, podría ser de gran utilidad para disminuir sus consecuencias³⁸.

Nosotros observamos que la disminución en la frecuencia de linfocitos Th17 en los pacientes con CMC no guarda relación con los sitios comprometidos ni con la recurrencia de los síntomas. No obstante, observamos una ten-

dencia de disminución más marcada en la frecuencia de células productoras de IL-17A en pacientes con HIES con respecto a los controles, y de manera similar pero no tan pronunciada en los pacientes con la mutación de STAT1-GOF. Solo se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los individuos controles para el aumento de las células Th1 en pacientes con HIES. Posiblemente, la inclusión de un mayor número de casos permitirá establecer de manera más certera el fenotipo inmune asociado a cada presentación de la CMC.

Respecto al balance entre las poblaciones Th1/Th17, los resultados indicaron que existe un claro desequilibrio entre los perfiles de células Th1 respecto de las Th17 células^{18,27,28}. El desequilibrio entre estas poblaciones podría ser un marcador importante para el diagnóstico, y para predecir el grado de la disfunción inmune del paciente, constituyendo también un parámetro a tener en cuenta durante el monitoreo del tratamiento^{39,40}. Aunque no observamos la existencia de correlación entre ambos perfiles celulares en un mismo individuo, indicando que no existe un aumento proporcional de células productoras de IFN γ que resulte en detrimento de la disminución de la población Th17, se pudo observar una clara tendencia de agrupación de los pacientes con CMC en los niveles más bajos para el porcentaje de linfocitos Th17, independientemente del valor individual de frecuencia de Li Th1 que presente. Para los individuos controles, observamos valores más bajos de frecuencia de células productoras de IFN γ , acompañados de valores variables de IL-17A.

La técnica de CF proporciona un método rápido, aunque complejo, para identificar deficiencias en las células productoras de IL-17, lo cual podría usarse como guía para el diagnóstico de mutaciones genéticas específicas, lo que facilita un enfoque y un tratamiento más personalizado, teniendo en cuenta las nuevas oportunidades terapéuticas, evitando las complicaciones dadas por la cronicidad de la infección por *Candida*. Sería de gran importancia poder realizar más estudios como el presente en otros centros hospitalarios de nuestro país, que posibilite incluir un mayor número de pacientes con CMC, que permitan extender las observaciones reportadas en este trabajo, no solo con el fin de establecer la incidencia real de la CMC en nuestro medio, sino además para tener un mejor conocimiento de las inmunidad anti *Candida* mediada por la IL-17.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Laboratorio de Citometría de Flujo dependiente del Programa Provincial de SIDA e Inmunodeficiencias (PAPSI) por el apoyo económico, y a los miembros de este laboratorio por la colaboración permanente. Y a los miembros del Servicio de Inmunología del Hospital Pediátrico Dr. H. Notti.

BIBLIOGRAFÍA

- Green L, Dolen WK. Chronic Candidiasis in Children. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017 May;17(5):31. doi: 10.1007/s11882-017-0699-9.
- Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 2022 Dec;13(1):89-121. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950.
- Sotomayor CE, Miró MS, Masih DT. Cap. 28 Respuesta inmune a infecciones fúngicas. En: *Microbiología Biomédica*, editores: Basualdo, Coto, De Torres. 2° ed. CABA. Ed. Atlante. 2018.
- Miró, MS; Vigezzi, C; et al. Receptores Innatos e IL-17 en la respuesta inmune frente a hongos patógenos humanos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba*. 2016; 73(3):188-96.
- Riera FO, Caeiro JP, Angiolini SC, et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jun 30;11(7):877. doi: 10.3390/antibiotics11070877.
- Miró MS, Rodríguez E, Icelly PA, et al. Recurrent vulvovaginal candidiasis: an old disease with new challenges. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2017;33(4):1130-406.
- Miró MS, Caeiro JP, Rodríguez E, et al. *Candida albicans* Modulates Murine and Human Beta Defensin-1 during Vaginitis. *J Fungi* 2022, 8(1), 20; <https://doi.org/10.3390/jof8010020>
- Gaffen SL, Moutsopoulos NM. Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Sci Immunol*. 2020 Jan 3;5(43):eaau4594. doi: 10.1126/sciimmunol.aau4594.
- Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int* 2015;2015:521957. doi: 10.1155/2015/521957.
- Annunziato F, Romagnani S. Do studies in humans better depict Th17 cells? *Blood*. 2009 Sep 10;114(11):2213-9. doi: 10.1182/blood-2009-03-209189.
- Song X, Gao H, Qian Y. Th17 differentiation and their proinflammation function. *Adv Exp Med Biol*. 2014;841:99-151. doi: 10.1007/978-94-017-9487-9_5.
- Mengesha BG, Conti HR. The Role of IL-17 in Protection against Mucosal *Candida* Infections. *J Fungi (Basel)*. 2017 Sep 27;3(4):52. doi: 10.3390/jof3040052.
- Acosta-Rodríguez EV, Rivino L, Geginat J et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):639-46. doi: 10.1038/ni1467.
- Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*. 2019 Jul;16(7):634-643. doi: 10.1038/s41423-019-0220-6.
- Okada S, Asano T, Moriya K, et al. Human STAT1 Gain-of-Function Heterozygous Mutations: Chronic Mucocutaneous Candidiasis and Type I Interferonopathy. *J Clin Immunol*. 2020 Nov;40(8):1065-1081. doi: 10.1007/s10875-020-00847
- van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 2011 Jul 7;365(1):54-61. doi: 10.1056/NEJMoa1100102.
- Cerboni S, Gehrman U, Preite S, Mitra S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases. *Immunology* 2021 May;163(1):3-18. doi: 10.1111/imm.13280.
- Okada S, Puel A, Casanova JL, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clin Transl Immunology*. 2016 Dec 2;5(12):e114. doi: 10.1038/cti.2016.71.
- Puel A, Cypowij S, Maródi L, Abel L, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012 Dec;12(6):616-22. doi: 10.1097/ACI.0b013e328358cc0b.
- Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 2009 Oct 29;361(18):1727-35. doi: 10.1056/NEJMoa0810719.
- Conti HR, Baker O, Freeman AF, et al. New mechanism of oral immunity to mucosal candidiasis in hyper-IgE syndrome. *Mucosal Immunol* 2011 Jul;4(4):448-55. doi: 10.1038/mi.2011.5.
- Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, et al. *Candida albicans* up-regulates the Fas-L expression in liver Natural Killer and Natural Killer T cells. *Immunobiology* 2015 Nov;220(11):1210-8. doi:10.1016/j.imbio.2015.06.014.
- Freer G, Rindi L. Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances. *Methods* 2013 May 15;61(1):30-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.03.035.
- Babaloo Z, Oskoei MR, Kohansal MH, Barac A, Ahmadpour E. Serum profile of IL-1 β and IL-17 cytokines in patients with visceral leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2020 Apr;69:101431. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101431.
- Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 2016 Jul 7;535(7610):75-84. doi:10.1038/nature18848.
- Bacher P, Hohnstein T, Beerbaum E, et al. Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell*. 2019 Mar 7;176(6):1340-55.e15. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.041.
- Nurjadi D, Kain M, Marcinek P, Gaile M, Heeg K, Zanger P. Ratio of T-Helper Type 1 (Th1) to Th17 Cytokines in Whole Blood Is Associated With Human β -Defensin 3 Expression in Skin and Persistent *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *J Infect Dis*. 2016 Dec 1;214(11):1744-1751. doi: 10.1093/infdis/jiw440.
- Bazzazi H, Aghaei M, Memarian A, Asgarian-Omran H, Behnampour N, Yazdani Y. Th1-Th17 Ratio as a New Insight in Rheumatoid Arthritis Disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2018 Feb;17(1):68-7
- McDonald DR. TH17 deficiency in human disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jun;129(6):1429-35; quiz 1436-7. doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.034.
- Eyerich K, Foerster S, Rombold S, Seidl HP, Behrendt H, Hofmann H, Ring J, Traidl-Hoffmann C. Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol*. 2008 Nov;128(11):2640-2645. doi: 10.1038/jid.2008.139. Epub 2008 Jul 10. PMID: 18615114.
- Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol*. 2010 May;7(3):164-74. doi: 10.1038/cmi.2010.21.
- Conti HR, Bruno VM, Childs EE, Daugherty S, Hunter JP, Mengesha BG, et al. IL-17 receptor signaling in oral epithelial cells is critical for protection against oropharyngeal candidiasis. *Cell Host Microbe*. (2016) 20:606-17. doi: 10.1016/j.chom.2016.10.001
- Conti HR, Gaffen SL. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J Immunol (2015)* 195:780-8. doi: 10.4049/jimmunol.1500909
- Puel A, Cypowij S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* (2011) 332:65-8. doi: 10.1126/science.1200439
- Shamriz O, Tal Y, Talmon A, Nahum A. Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Early Life: Insights Into Immune Mechanisms and Novel Targeted Therapies. *Front Immunol* 2020 Oct 16;11:593289. doi: 10.3389/fimmu.2020.593289.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41. doi: 10.1038/ni1261.

37. Orphanet. Noviembre 2022 https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=es&Expert=2314
38. Marazzi MG, Bondi E, Giannattasio A, Strozzi M, Savio-li C. Intracranial aneurysm associated with chronic mucocuta-neous candidiasis. *Eur J Pediatr* 2008 Apr;167(4):461-3. doi: 10.1007/s00431-007-0490-3.
39. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1849-61. doi: 10.1084/jem.20070663.
40. Lee YK, Turner H, Maynard CL, et al. Late developmen-tal plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):92-107. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.005.

ASPECTOS GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS DEL CÁNCER PAPILAR DE TIROIDES, UNA REVISIÓN ACTUALIZADA

Genetic and immunological aspects of papillary thyroid cancer, an updated review

David Lemoine¹, Herlinda Monsalve¹, Andrés Sánchez^{2,3}, Marlon Múnera²

RESUMEN

Antecedentes. El cáncer de tiroides se considera uno de los que ha tenido mayor aumento en su prevalencia en las últimas décadas. Se sabe que las mutaciones puntuales en los genes BRAF y RAS como en la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), aunque se presentan en bajas frecuencias, se asocian con el desarrollo de este tipo de cáncer. A nivel de RAS, se considera que las mutaciones se dan al menos en el 45% de los pacientes. La tumorigénesis durante el desarrollo del cáncer tiroideo es el resultado de la inestabilidad genómica, en el que las células pierden su capacidad de diferenciarse y madurar completamente. Esto sucede en varios pasos que permiten la proliferación de células mutadas y el desarrollo de masa neoplásica. Los aspectos genéticos de este tipo de cáncer así como su fisiopatología son importantes, por eso, en este trabajo se abordan desde una visión molecular y clínica.

Objetivo: brindar una actualización sobre el cáncer de tiroides a nivel genético e inmunológico.

Conclusión. El cáncer de tiroides en los últimos años ha aumentado su frecuencia especialmente del tipo papilar y su variante más común la cual es la variante folicular posterior a la variante papilar convencional. Los estudios del aspecto genético como la interacción del sistema inmunológico y tumoral e histopatológicos han sido esenciales para la comprensión del comportamiento tumoral, y son la base para futuros enfoques de tratamientos y posibles terapias inmunogénicas.

Palabras clave: cáncer; tiroides, mutación, tumor, células.

ABSTRACT

Background. Thyroid cancer is considered one of those that has had the greatest increase in its prevalence in recent decades. It is known that point mutations in the BRAF and RAS genes, as well as in phosphoinositol 3-kinase (PI3K), although they occur in low frequencies, are associated with the development of this type of cancer. At the RAS level, mutations are considered to occur in at least 45% of patients. Tumorigenesis during thyroid cancer development is the result of genomic instability, in which cells lose their ability to fully differentiate and mature. This happens in several steps that allow the proliferation of mutated cells and the development of neoplastic mass. The genetic aspects of this type of cancer as well as its pathophysiology are important, therefore, in this work they are approached from a molecular and clinical perspective.

Objective. To provide an update on thyroid cancer at the genetic and immunological level.

Conclusion. Thyroid cancer in recent years has increased its frequency, especially of the papillary type and its most common variant, which is the follicular variant after the conventional papillary variant. Studies of the genetic aspect such as the interaction of the immune system and tumor and histopathology have been essential for understanding tumor behavior; being the basis for future treatment approaches and possible immunogenic therapies.

Keywords: cancer; thyroid, mutation, tumor; cells.

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2022;53(4):157-163

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de tiroides (CT) ha triplicado su incidencia en los últimos años, y el carcinoma papilar de tiroides (CPT) es el más frecuente entre los tipos de CT². Debido a la prevalencia de patrones histológicos diferentes en el CPT y

perfiles genéticos, se ha convertido objeto de múltiples estudios genéticos^{1,2} para la comprensión de las mutaciones en las células foliculares del tejido tiroideo que predisponen a la aparición de CPT y sus diferentes variables.

Gracias a estudios de caracterización de mutaciones o genes de fusión en tumores de tiroides mediante secuenciación de próxima generación (NGS)³, se sabe que hasta un 70% de las mutaciones dan lugar a la activación de alteraciones somáticas de genes que codifican efectores en la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), incluidas las mutaciones puntuales de BRAF y los genes RAS², al igual que las mutaciones descubiertas en la vía de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), como PTEN, PIK3CA y AKT1, a bajas frecuencias^{2,3}.

Las mutaciones puntuales más comunes son en los genes RAS y BRAFV600, siendo esta última un impulsor oncogénico asociado con comportamientos tumorales agresivos y una mayor mortalidad entre los pacientes con CPT, la cual ocurre en casi el 45% de las CPT^{2,4}. BRAF es un gen que codifica para una proteína quinasa de serina-treonina citoplasmática, que desempeña un papel fundamen-

1. Programa de Medicina, Corporación Universitaria Rafael Nuñez, Cartagena, Colombia.

2. Grupo de investigación GINUMED, Programa de Medicina, Corporación Universitaria Rafael Nuñez, Cartagena, Colombia.

3. Clinical and Experimental Allergy Group (GACE), IPS University, University of Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Prof. Marlon Múnera. Grupo de Investigación Médica (GINUMED). Corporación Universitaria Rafael Nuñez Claustro 2. San Francisco, Cartagena, Colombia Tel: +57 300 529 5164. marmunera@gmail.com.

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 09/08/2022 | Aceptado: 02/09/2022

tal en la vía de señalización de MAPK; la vía de la proteína quinasa es activada en mitocondrias, y se presenta en la mayoría de los CT derivados de las células foliculares. En ella, se da una sustitución *V600E*, que induce la activación de la quinasa de manera constitutiva, provocando la transformación de las células foliculares, lo que la hace la mutación más común y representa más del 90% de todas las mutaciones encontradas en el gen *BRAF*⁴.

Es importante conocer la función de *RAS* y *BRAF* en las diferentes vías de señalización para la comprensión del proceso de carcinogénesis en el CPT; *BRAF* es parte de la familia del protooncogén *RAS*, que codifica una proteína que funciona como traductor de señales de factores de crecimiento celular. *BRAFV600* es la mutación más frecuente en el desarrollo del CPT, el cual es una de las variantes de la familia de *RAS*; este funciona como un componente central de la vía de señalización MAPK altamente conservada (también conocida como vía de señalización celular RAS-RAF-MEK-ERK). La vía MAPK transfiere señales desde la matriz extracelular al núcleo a través de receptores tirosina quinasa (RTK) y juega un papel crítico en la mediación de la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y supervivencia^{3,4}.

La desregulación de la vía de señalización dependiente de las proteínas de activación mitogénica (MAPK) es un mecanismo fundamental en la oncogénesis del CPT. Este proceso de señalización inicia con la actuación de *RAS* como primer transductor de señal, operando en dos conformaciones, una activa y otra inactiva, de manera secuencial. Mientras que *RAS* desencadena la activación de MAP3 cinasa conocida igualmente como RAF, este permite la activación de MAP2 cinasa o MEK posterior, dando así la activación de MAP cinasa o ERK. Este último tiene la capacidad de translocar al núcleo, y ahí puede fosforilar directamente un gran número de factores de transcripción como c-jun o c-Myc de manera que tendremos la conformación de MAPK con tres cinasas (RAF-MEK-ERK)^{4,5}.

2. BRAFV600E COMO ONCOGÉN EN RELACIÓN CON EL CPT

Inicialmente los genes *RAF* han sido identificados como oncogenes que mutaban en modelos ratones transgénicos, de los cuales se logró identificar tres subgrupos de genes *A-RAF*, *B-RAF* y *RAF-1* (o *C-RAF*)^{4,5}. El interés en los estudios genéticos de este oncogén es determinar cómo surge el reordenamiento cromosómico o sus mutaciones en las células foliculares de tiroides, que a su vez en estas *BRAF* es predominante.

La vía de transducción de señal permite la regulación de expresión de varios genes responsables de la proliferación de celular, activada por factores de crecimiento, hormonas y citoquinas generando fosforilación de *BRAF* que activa

constitutivamente ERK iniciando así un gran número de mecanismos implicados en la carcinogénesis⁴.

Los estudios realizados en la última década asocian la mutación *V600E* en *BRAF* con mal pronóstico², debido a que esta presenta una alta actividad quinasa que genera una inestabilidad genética en el CPT. Esto induce la activación secuencial de alteraciones secundarias en la vía fosfoinositol 3-quinasa-AKT/treonina quinasa (PI3-AKT), lo que induce progresión a un cáncer más agresivo. La desregulación de esta vía sobre todo su implicación en la carcinogénesis de múltiples tumores en el ser humano permitiendo identificar diferentes agentes de esta misma tales como protooncogenes por ende es un hallazgo frecuente en patologías carcinogénicas. Ver activaciones aberrantes de la vía MAPK con más alteración genética específica del CPT⁵.

3. RAS COMO ONCOGÉN EN RELACIÓN CON EL CPT

RAS es un protooncogén que actúa como transductor de señal de receptores de factores de crecimiento. La mutación de *RAS* es uno de los trastornos más prevalentes, ya que afecta a un 30% de los cánceres en el humano^{4,6}. Se han descrito tres tipos de mutaciones de *RAS*: *H-Ras*, *K-Ras* y *N-Ras*. Estas se han encontrado en diversas variables histológicas de carcinoma de tiroides además de ser las primeras en asociarse a las mutaciones predisponentes para el desarrollo de CPT.

Se ha evidenciado gracias a estudios genéticos que la mayoría de las mutaciones oncogénicas de *RAS* ocurren un 85% en la isoforma *K-RAS*, un 11% en la *N-RAS*, y un 4% en la *H-RAS*⁷. *RAS* actúa como interruptor entre dos estados, uno que se presenta el GTP activo y otro con el GDP inactivo. El estado GTP activo tiene más afinidad para impulsar múltiples vías de señalización de crecimiento celular. El funcionamiento como conmutador molecular de *RAS* está equilibrado por dos clases de proteínas activadoras de GTPasa (GAP), que inactivan *RAS* al aumentar su actividad GTPasa, y factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), que catalizan la disociación de GDP⁷.

Cuando esta vía de señalización está alterada, se inhiben genes específicos como *TTF1* (factor de transcripción tiroidea 1) y *PAX8* (*paired box gene-8 protein*), factores esenciales para el desarrollo y diferenciación de las células foliculares de tiroides⁵. Al igual se ha relacionado a estas mutaciones de *RAS* con daño a nivel del ADN, así como alteraciones en la organización de los cromosomas durante la mitosis, formación micronúcleos y amplificación de los centrosomas.

Tanto *BRAF V600E* y *RAS* han sido relacionados directamente con estadios avanzados y del CPT³, aunque en

otros estudios se ha hallado una relación entre mutaciones de estadios tempranos de CPT con *BRAF V600E*. Sin embargo, en diversos tipos de cánceres, se cree que las mutaciones *RAS* ocurren muy temprano dando lugar a la oncogénesis y, por lo tanto, la naturaleza homeostática de la vía probablemente juega un papel central en la determinación de si una célula mutante *RAS* progresa hacia la malignidad⁷. En esta cascada de las quinasas se involucra MEK-ERK, que ayudan al desarrollo de tumores en CT.

4. RESPUESTA INMUNE CONTRA EL CPT

La tumorigénesis durante el desarrollo del cáncer tiroideo es el resultado de la inestabilidad genómica, en la que las células pierden su capacidad de diferenciarse y madurar completamente. Esto sucede en varios pasos que permite la proliferación de células mutadas y el desarrollo de masa neoplásica. Aquí, está implicada una población heterogénea de células que incluyen células cancerosas, células madre cancerosas, células estromales (como fibroblastos, células estromales, mesenquimales, células endoteliales, pericitos) y células inmunes [como linfocitos T y B, células asesinas naturales (NK) y macrófagos asociados a tumores (TAM)]. En estas células, las moléculas producidas (como citocinas, quimiocinas, enzimas y otros factores solubles) y la matriz extracelular constituyen el microambiente tumoral (TME)⁸.

De los resultados de múltiples estudios, hoy, se sabe que la progresión y supervivencia de las células tumorales está dada por la capacidad de evadir la respuesta inmune antitumoral^{2,8}. Las células cancerígenas evaden el sistema inmunitario actuando directamente sobre la vigilancia inmunogénica para dar paso a la inmunoelección, estas células expresan antígenos tumorales sobre su superficie⁹, y normalmente son eliminadas por el sistema inmune. Este proceso de supervivencia celular tiende a desarrollar un número amplio de mutaciones acumuladas que les proporciona la capacidad de variar los antígenos. Esto permite evadir la vigilancia del sistema inmune. Finalmente, la acumulación adicional y progresiva de mutaciones genéticas y la modificación en la TME permiten que el tumor evite por completo la respuesta inmunológica^{8,9}.

Las células estromales juegan un rol importante dentro del microambiente específico, llamado nicho de células madre y se sostiene por diferentes factores solubles⁹ que son secretados por estas células que mantienen el microambiente tumoral para el desarrollo de determinado tumor. Este medio tanto celular como acelular, en el cual las células madre cancerosas se desarrollan, recluta varias células estromales e inmunes para formar y mantener este entorno autosostenido. El grupo heterogéneo de células incluye células cancerosas, células madre cancerosa, células estroma-

les (como fibroblastos, células estromales, mesenquimales, células endoteliales, pericitos), células inmunes (como linfocitos T y B, células asesinas naturales (NK)) y macrófagos asociados a tumores (MAT).

5. CÉLULAS ENDOTELIALES VASCULARES Y LINFÁTICAS

Estas células cumplen un papel muy importante, tanto en el tejido sano como el neoplásico; permiten el soporte del tejido vascular dando inicio a la angiogénesis promovida por células tumorales y endoteliales hasta el punto de permitir la progresión neoplásica acompañada del aumento sostenido de vascularización tisular. Este crecimiento endotelial vascular se ve favorecido por altos niveles de factores solubles tales como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) que promueve la proliferación vascular, mientras que VEGFC, VEGFD y VEGFR-3 promueven la proliferación de CE linfático^{11,12}. Como las células endoteliales cumplen una función esencial para el mantenimiento y soporte del tejido, las células endoteliales tumorales representan la principal barrera a las células inmunoestimuladoras que se encargan de promover la inmunidad-anti-cáncer. Además, se demostró que los TEC promueven la acumulación de células T reguladoras (Treg) a través de regulación al alza del receptor endotelial linfático y vascular 1 (CLEVER-1); una gran cantidad de macrófagos positivos para CLEVER-1 apoyan la inmunosupresión⁹.

Las células madre multipotentes que se encargan del mantenimiento del tejido sano y la cicatrización de heridas a través de la intervención de varios tipos de células son conocidas como células madre mesenquimales (CMM); estas permiten la liberación de factores de crecimiento epidérmico (EGF), citocinas tales como IL-8, IL-6 y quimiocinas tales como CXCL1/2/12¹² que actúan directamente sobre células cancerosas, aumentan su proliferación generando modificaciones fenotípicas de estas mismas. En otro mecanismo inmunosupresor se demostró que las CMM suprimen tanto la inmunidad adaptativa como la innata al inhibir directamente la proliferación de células T CD4+ y CD8+¹². Cuando las células cancerosas sobreexpresan el factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (PDGF-β) tanto en tejidos sanos como neoplásicos por igual, los pericitos derivados de precursores mesenquimales diferenciados forman parte de la población heterogénea que interactúan en el proceso de carcinogénesis. Se ha demostrado que los pericitos inducen la supresión inmune a través de la secreción de varios factores solubles, incluyendo la prostaglandina E2 (PG-E2), el TGF-β y el óxido nítrico. Los pericitos son capaces de regular el tráfico y la modulación de las células T (11). Los pericitos producen factores de crecimiento, quimiocinas, citoquinas y

moléculas de adhesión que regulan el microambiente para evadir la vigilancia inmune. La exposición a citocinas, quimiocinas, enzimas y otros factores solubles induce a que la función específica para el mantenimiento del tejido normal se sobreexpresen tales como la rápida revascularización^{11,12}. Además de sus propiedades antigénicas, los pericitos expresan marcadores de diferenciación, lo cual contribuye a los procesos de metástasis¹¹. Los investigadores han concluido que, tanto la aberrante interacción pericito-célula endotelial como las anomalías en la estructura de los pericitos contribuyen a la angiogénesis del tumor¹³.

Uno de los componentes estromales más abundantes en los tumores sólidos que ayudan a la metástasis y condicionan el microambiente tumoral son los fibroblastos asociados al cáncer (FAC)^{12,13}; estos están dotados por propiedades migratorias y contráctiles de los miofibroblastos, secretan colágeno, citocinas y quimiocinas en el estroma tumoral. Los FAC son activados por células cancerosas por tres pasos los cuales implican reclutamiento, transformación a CAF y mantenimiento en la MTC. Tras su activación, los FAC liberan moléculas de señalización para favorecer la supervivencia de las células cancerosas y promover el reclutamiento y la transformación de otros tipos celulares dentro de la matriz extracelular tumoral¹⁵. Una de sus funciones esenciales es la remodelación de la matriz extracelular gracias a la liberación de colágeno y fibronectina; esto implica el aumento de los niveles de VEGF, lo que favorece una reorganización de la matriz permitiendo la autonomía de células cancerígenas de migrar junto a los FAC¹⁵. Estudios corroboran que varios subconjuntos de los FAC tales como FAC-s1 interactúan con el sistema inmune suprimiéndolo, atrayendo y promoviendo la supervivencia, diferenciación y activación de T CD4+, CD5+¹⁵.

6. CÉLULAS INMUNES Y SU RELACIÓN FRENTE CPT

Otra respuesta a la evasión inmunológica se da actuando sobre la función de las células NK, que destruye los clones neoplásicos al unirse a las moléculas de clase uno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Para inactivar el poder citolítico de las células NK, las células cancerosas regulan negativamente las quimiocinas que favorecen la migración de los linfocitos NK, y reducen a niveles mínimos la exposición de moléculas MHC de clase I en su superficie^{9,10}.

Las células NK expresan una variedad de receptores que reconocen diferentes ligandos para regular la citotoxicidad. Algunas de las moléculas involucradas en este proceso son la SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*), molécula de la familia 2B4 (CD244), también se encuentra la molécula de adhesión ADN1, y los receptores de citotoxicidad natural (NCR) NKp30, NKp44,

NKp46, y NKp80¹¹. Algunos de los receptores inhibidores son receptores similares a inmunoglobulina de células asesinas (KIR), CD94 / NKG2A, receptor tipo inmunoglobulina leucocitaria 1 (CD85) y la familia Ly49^{10,11}.

Es importante remarcar que uno de los receptores más efectivos en su accionar citolítico es la unión del NKG2D con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase IA y B (MICA / MICB) expresadas en las células tumorales. El receptor de citotoxicidad natural tipo NKp44 reconoce el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-DD liberado por las células tumorales, lo cual permite la liberación de interferones por parte de la misma célula (NK-C) y TNF- α cumpliendo con el propósito de inhibir el crecimiento tumoral. Aunque la evasión del sistema inmune es difícil, aun así, el carcinoma tiene formas de hacerlo al evadir la acción de las NK, debido que las células del carcinoma liberan TGF- β , prostaglandinas E2 (PGE2), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) e IL-10 para inhibir la citotoxicidad de las células NK [2]. También liberan proteínas MICA y MICB al suero a través de la proteólisis para evadir el reconocimiento NKG2D de las células NK^{10,11}.

La actuación del sistema inmune adaptativo es fundamental para inducir una respuesta inmune antitumoral efectiva. Sin embargo, linfocitos como los Treg FoxP3+ contribuyen a la tolerancia de las células T específicas del tumor¹⁸. Los Tregs tienen como función impedir la respuesta inmune al expresar diferentes citoquinas contra las células tumorales, frente a estas últimas hay una competencia con las células T por supervivencia ocasionando la producción de metabolitos inmunosupresores por las células cancerosas, que disminuyen las funciones efectoras de las células T específicamente en tumores (19). Por lo tanto, las células T antígeno específicas antitumoral no logran restringir el crecimiento tumoral debido a la secreción de citocinas inmunosupresoras^{18,19}. Las Treg suprimen la activación de las células T, pueden promover la homeostasis tisular y la reparación en los tejidos periféricos, sin embargo, esta homeostasis puede verse afectada por una serie de factores tales como los MAT y el TME. Esto dado que las Treg suprimen la actividad de las células presentadoras de antígenos, incluidas las CD y los macrófagos, a través de varios mecanismos¹⁹ ya sea por medio de la destrucción de las células T efectoras dentro de los tumores a través de la vía de señalización FasL-Fas, así como la citotoxicidad mediada por granzima B y perforina por contacto célula-célula¹⁹.

La respuesta inmune celular contra las células tumorales depende en gran medida de los TCR y del complejo péptido-MHC (pMHC)¹⁶, que previenen el crecimiento tumoral a través de la acción lítica y la producción de IFN- γ , lo que inhibe el ciclo celular⁹. Así, se induce la lisis, y la posterior fagocitosis de los componentes celulares

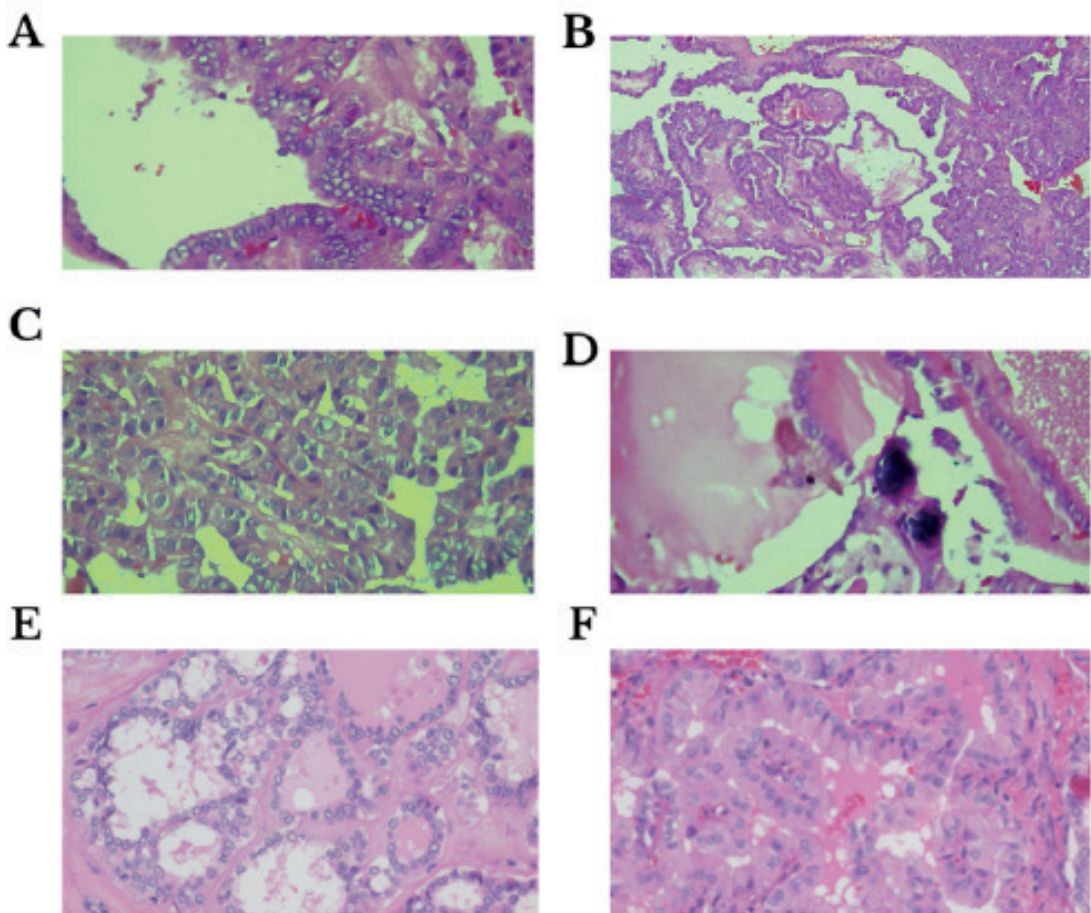


Figura 1. A. Carcinoma papilar de tiroides: se observan las papilas rodeadas de células con núcleos de aspecto vacío característicos denominado en ocasiones “núcleos en Anita la huerfanita”. B. Se aprecian las papilas junto a los tallos fibrovasculares los cuales están revestidos por una sola capa de células altas. C. Células con núcleos claros; encontramos visiblemente las invasiones capsulares. (Fotos donadas por la Unidad de Patología Clínica Dr. Alex Tejada):

tumorales, logrando su presentación antigénica, y la maduración de los linfocitos, dando lugar a la supresión tumoral. Las células T dentro del carcinoma papilar de tiroides cumplen una función esencial la cual junto a los linfocitos TCD8⁺ matan las células tumorales a través de la citotoxicidad y se relacionan negativamente con el tamaño del tumor y la metástasis de los ganglios linfáticos¹⁷. Algunos estudios sugieren que los pacientes que presentan CPT con un infiltrado de células T CD8⁺ se correlacionan con un mejor pronóstico de esta patología¹⁸. De las células B se considera que tienen un papel pobre en la defensa tumoral, aunque hay estudios que indican la presencia de células B en la matriz extracelular, las cuales, interactúan con los tumores provocando tanto respuestas efectoras antitumorales como respuestas antiinflamatorias protumorales²⁰.

7. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Un diagnóstico definitivo confiable de CPT se realiza en aspirados con aguja fina de PTC convencional el cual permite a los patólogos obtener la arquitectura característica papilar y/o plana en forma de panal de abeja y las características nucleares típicas de palidez de cromatina, o bien conocido como “ojos de Anita la huerfanita”, agrandamiento nuclear, apiñamiento, surcos y pseudoinclusiones²¹. Son características particulares del CPT clásico, aunque debido al aumento de este tipo de carcinoma al igual sus variantes aumenta exponencialmente como es la variante folicular no invasiva de PTC, un tumor indoloro que recientemente ha sido reclasificado como “neoplasia folicular tiroidea no invasiva con características nucleares

de tipo papilar” (NIFTP). Esta posee características similares al CPT clásico, sin embargo, se caracterizan por diversas arquitecturas, tipos de células y formas, y características estromales, algunas de las cuales pueden reconocerse citológicamente. Conocer las características citológicas se hace fundamental para el diagnóstico de este tipo de CP junto a sus variantes y estos hallazgos de citología se clasifican en categorías diagnósticas asociadas con diferentes riesgos de neoplasia maligna²².

Los carcinomas papilares de tiroides convencionales o clásicos tienen características histológicas que pueden presentarse dependiendo la variable del CPT. Estas características pueden manifestarse como lesiones tanto solitarias como múltiples que pueden poseer zonas de fibrosis y calcificaciones, las cuales son visibles durante la ecografía y con frecuencia suelen ser quísticas²³.

En el CPT, un hallazgo particular son las papilas ramificadas las cuales están conformadas por un tallo fibrovascular que está cubierto por una capa de células cúbicas ordenadas las cuales se presentan en mayor medida como característica del CPT (**Figura 1**). Los tallos fibrovasculares pueden presentar ejes mucho más densos que se manifiestan sobre todo en cánceres con epitelios anaplásicos que presentan muchas variaciones tanto en morfología celular y nuclear^{22,23}.

Cuando se habla de CPT, la característica más nombrable es el núcleo de las células las cuales poseen una cromatina dispersa y le confieren un aspecto óptico claro o vacío denominado núcleo con “ojos de Anita la huerfanita” (**Figura 1**)^{22,23}. El CPT presenta pseudoinclusiones que son causa de las invaginaciones del citoplasma. Las lesiones poseen características únicas que a menudo suelen encontrarse y sirven como diagnóstico diferencial respecto al resto de carcinomas tales como el tipo folicular y medular; estas estructuras son las denominadas Cuerpos De Psamoma y se pueden apreciar en los ejes de las papilas^{22,23}. Gracias a múltiples estudios se han detectado múltiples variantes histológicas del CPT expondremos las más frecuentes y las que más suelen confundir el diagnóstico incluidas las variantes foliculares, de células altas, oncócica, de células columnares, esclerosante difusa, sólida, variante de células altas y cribiforme-morular²⁴. La variante folicular (VFCPT) es la segunda variante más común, después de la CTP convencional. En comparación con la variante convencional, macroscópicamente se observan tumores más grandes además de presentarse en una edad más temprana.

En examen histopatológico presenta características nucleares, agrandamiento, palidez, apiñamiento y surcos que son propios del CPT; aunque el patrón que este presenta es tipo folicular, la característica fundamental para su diferenciación son los folículos revestidos por células de

CPT²⁴. Ciertas otras características, como las pseudoinclusiones intranucleares, son raras en FVPTC, y las estructuras papilares compuestas de núcleos fibrovasculares, así como los cuerpos de psamoma, generalmente están ausentes²⁵. Con los años, esta variante ha aumentado considerablemente y se relaciona con múltiples aberraciones cromosómicas que se diferencian en ciertos puntos del CPT clásico²³, tales como:

1. se encuentra menor reordenamiento de RET/PTC,
2. manifiesta mayor medida de mutaciones tipo *RAS*,
3. posee mutaciones diferentes de tipo *BRAF* generando un grado más bajo de activación de cinasa BRAF.

A menudo suele encontrarse en el CPT clásico focos de invasión linfática por el tumor, aunque esta variante tiene con menos frecuencia metástasis linfáticas lo cual permite que este tipo de carcinoma sea de un buen pronóstico. La variante de células altas se caracteriza por poseer células cilíndricas altas con citoplasmas muy eosinófilo; estas pueden ser dos veces más grandes de lo normal, de ahí su nombre ya que las células son más altas que anchas, tapizan las estructuras papilares^{24,25}, su arquitectura histológica permite que este sea diagnosticado una vez que haya una progresión mayor de 50% de estas células con citoplasma eosinofílico y características nucleares propias de PTC²⁵.

Una característica particular es que en el momento del diagnóstico las células altas tienden a ser mayores y generar tumores más grandes con extensión extratiroidea frecuente más invasiva y metástasis cervical²⁵.

CONCLUSIÓN

El cáncer de tiroides en los últimos años ha aumentado su frecuencia, especialmente el del tipo papilar, y su variante más común es la variante folicular después de la variante papilar convencional. Los estudios del aspecto genético como la interacción del sistema inmunológico y tumoral e histopatológicos han sido esenciales para la comprensión del comportamiento tumoral, y son la base para futuros enfoques del tratamientos y posibles terapias inmunogénicas. Actualmente se sabe que la evasión inmunológica del carcinoma papilar es la correlación de los hallazgos histológicos y de las mutaciones puntuales siendo esta última la razón del desarrollo tumorigénico como resultado de la inestabilidad genómica, induciendo la creación del ambiente tumoral para la evasión de la respuesta inmune. A raíz de estos las estrategias para futuros tratamientos pueden estar dirigidos a la inhibición de citocinas, quimiocinas, enzimas y factores solubles o inducir la muerte de la población heterogénea de las células del microambiente tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, et al. Mortalidad e incidencia del cáncer de tiroides: una visión global: Mortalidad e incidencia del cáncer de tiroides. *Int J Cancer* 2015;136(9):2187-95.
2. Cell.com. [cited 2021 Oct 31]. Available from: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)01238-0](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)01238-0)
3. Menicali E, Guzzetti M, Morelli S, Moretti S, Puxeddu E. Immune landscape of thyroid cancers: New insights. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:637826.
4. Wang N, Wen J, Ren W, Wu Y, Deng C. Upregulation of TRIB2 by Wnt/ β -catenin activation in BRAFV600E papillary thyroid carcinoma cells confers resistance to BRAF inhibitor vemurafenib. *Cancer Chemother Pharmacol* 2021;88(1):155-64.
5. Xu H-X. The role of BRAF in the pathogenesis of thyroid carcinoma. *Front Biosci* 2015;20(7):1068-78.
6. Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, Jayapalan JJ, Karikalan B, Hashim OH. Papillary thyroid cancer: Genetic alterations and molecular biomarker investigations. *Int J Med Sci* 2019;16(3):450-60.
7. Taryn E, Gillies, Michael Pargett, Jillian M. Silva, Carolyn K. Teragawa, Frank McCormick, John G. Albeck. *Molecular Systems Biology Volumen:16, Edición:10, Año:2020.*
8. Menicali E, Guzzetti M, Morelli S, Moretti S, Puxeddu E. Paisaje inmunológico de los cánceres de tiroides: nuevos conocimientos. *Endocrinol Frontal (Lausana)* 2020;11:637826.
9. Khalaf K, Hana D, Chou JT-T, Singh, C., Mackiewicz A, Kaczmarek M. (2021). Aspectos del microambiente tumoral implicados en la inmunoresistencia y la farmacoresistencia. *Fronteras en Inmunología* 12,656364.
10. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 2015 Jan 15;160(1-2):48-61.
11. Ge Z., Wu, S., Zhang, Z. y Ding, S. (2020b). Mecanismo de las células tumorales que escapan de la vigilancia inmune de las células NK. *Inmunofarmacología e Inmunotoxicología* 42(3):187-98.
12. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2015;15(11):669-82.
13. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci* 2017 Jul;74(13):2345-60.
14. Fernandes C, Soares D, Yergeri MC. (2018). Nanoterapia dirigida al microambiente tumoral. *Fronteras en Farmacología* 9:1230.
15. Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T, Papageorgis P (2021). El papel del microambiente tumoral en la metástasis del cáncer: mecanismos moleculares y oportunidades terapéuticas. *Cánceres* 13(9).
16. Wang Y, Liu Y, Chen L, et al. (2021). T cell receptor beta-chain profiling of tumor tissue, peripheral blood and regional lymph nodes from patients with papillary thyroid carcinoma. *Frontiers in Immunology* 12,595355.
17. Xie Z, Li X, He Y, et al. (2020). Immune cell confrontation in the papillary thyroid carcinoma microenvironment. *Frontiers in Endocrinology* 11:570604.
18. Cunha LL, Morari EC, Guihen ACT, et al. (2012). Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology* 77(6):918-25.
19. Wang H, Franco F, Ho P-C. (2017). Metabolic regulation of tregs in cancer: Opportunities for immunotherapy. *Trends in Cancer* 3(8):583-92.
20. Sanz JM, Lahoz AMG, Silva A. (2021). El sistema inmune y el microambiente tumoral: componentes y función. *Medicina* 13(33):1932-41.
21. Puztaszeri M, Auger M. Actualización sobre las características citológicas de las variantes del carcinoma papilar de tiroides. *Diagn Cytopathol [Internet]* 2017;45(8):714-30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/dc.23703>.
22. Filetti S, Durante C, Hartl D, et al.; Comité de Directrices de ESMO. Dirección electrónica: clinicalguidelines@esmo.org. Cáncer de tiroides: Guías de práctica clínica de ESMO para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento. *Ana Oncol.* 2019 Dic 1;30(12):1856-1883. doi: 10.1093/annonc/mdz400. PMID: 31549998.
23. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. (2017). Robbins & Cotran Fundamentos de Patología (9a ed.). Elsevier Editora Ltda.
24. Lee JH, Shin JH, Lee H-W, Oh YL, Hahn SY, Ko EY. (2015). Sonographic and cytopathologic correlation of papillary thyroid carcinoma variants. *Journal of Ultrasound in Medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 34(1),1-15. <https://doi.org/10.7863/ultra.34.1.1>.
25. Zhao L, Dias-Santagata D, Sadow PM, Faquin WC. Cytological, molecular, and clinical features of noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features versus invasive forms of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer [Internet]*. 2017;125(5):323-31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.21839>.

MIS-C ASOCIADO A COVID-19: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA DEL MECANISMO INMUNOPATOLÓGICO

MIS-C associated with COVID-19: A systematic review of the immunopathological mechanism

Jesús Rodríguez-Alcocer¹, Miyeli Delgado¹, Fernando Portilla-Cusi¹, Nicole Soto¹, Jerome Carpio¹, Gustavo Obando-Pereda^{1,2}

RESUMEN

Introducción. El desarrollo de la pandemia por COVID-19 se asocia con enfermedades y condiciones como el síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C), resultando ser de intensidad leve en la mayoría de los pacientes; sin embargo, el MIS-C produce una respuesta inflamatoria severa post SARS-Cov-2 en niños (<12) que presentaron una infección asintomática, manifestándose como una respuesta inflamatoria descontrolada con afectación multiorgánica. Se maneja evidencia de una semejanza entre los signos y síntomas del MIS-C y kD (enfermedad de Kawasaki) de este modo, dentro de los aspectos de diferenciación se consideran el reconocimiento del fenotipo como la susceptibilidad de cada uno.

Materiales y métodos. Se realizó una revisión sistemática en base a las directrices de PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), siguiendo criterios de elegibilidad según diagnósticos de MIS-C leve o grave basados en la OMS y la CDC; estudios en los que se hayan analizado marcadores de inflamación; estudios en los que se haya realizado el perfilado de citocinas proinflamatorias y autoanticuerpos reactivos. Se incluyó de este modo artículos seleccionados de bases de datos publicados desde el año 2020 hasta la actualidad (2022).

Resultados. Se incluyeron 8 estudios base para el desarrollo de la revisión, teniendo como síntesis de información las referencias a los anticuerpos, marcadores de inflamación y relación de similitud entre MIS-C y KD, que fueron parámetros que engloban la etiología del MIS-C con el COVID-19.

Conclusiones. Se evidencia correlación de marcadores inflamatorios como WBC, ALC, ANC, PLT, CRP, ferritina, niveles de dímero D, LDH, fibrinógeno y VSG con el MIS-C. Dentro de la comparación del MIS-C y la enfermedad de Kawasaki, los pacientes con MIS-C tenían niveles más altos de glóbulos blancos, PCR (mg/L), dímero D (μg/ml) y ferritina (ng/ml) y niveles más bajos de ALC; siendo el diagnóstico diferencial determinado por problemas cardiovasculares y gastrointestinales. En relación con el COVID-19, la aparición de anticuerpos IgG no descarta posibilidades de enfermedades autoinmunes.

Palabras clave: síndrome inflamatorio multisistémico, enfermedad de Kawasaki, COVID-19, autoinmunidad, anticuerpos, marcadores de inflamación.

ABSTRACT

Introduction. The development of the COVID-19 pandemic is associated with diseases and conditions such as multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C), which is mild in most patients; however, MIS-C produces a severe post-SARS-Cov-2 inflammatory response in children (<12) who presented an asymptomatic infection, manifesting as an uncontrolled inflammatory response with multi-organ involvement. There is evidence of a resemblance between the signs and symptoms of MIS-C and kD (Kawasaki disease); in this way, within the differentiation aspects, the recognition of the phenotype is considered as the susceptibility of each one.

Materials and methods. A systematic review was carried out based on the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines, following eligibility criteria according to diagnoses of MIS-C according to the WHO and the CDC; studies in which markers of inflammation have been analyzed; studies in which proinflammatory cytokines and reactive autoantibodies have been profiled. In this way, selected articles from databases published from 2020 to the present (2022) were included.

Results. Eight basic studies were included for the development of the review, having as a synthesis of information the references to antibodies, markers of inflammation and similarity relationship between MIS-C and KD, which were parameters that encompass the etiology of MIS-C with the COVID-19.

Conclusions. There is evidence of correlation of inflammatory markers such as WBC, ALC, ANC, PLT, CRP, ferritin, D-dimer levels, LDH, fibrinogen and ESR with MIS-C. Within the comparison of MIS-C and Kawasaki disease, patients with MIS-C had higher levels of white blood cells, CRP (mg/L), D-dimer (μg/ml), and ferritin (ng/ml) and lower levels of LAC; in this way, the differential diagnosis has been determined by cardiovascular and gastrointestinal problems. In relation to COVID-19, the appearance of IgG antibodies does not rule out the possibility of autoimmune diseases.

Keywords: multisystem inflammatory syndrome, Kawasaki disease, COVID-19, autoimmunity, antibodies, markers of inflammation.

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2022;53(4):164-169

INTRODUCCIÓN

El síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C) es una condición asociada con la enfermedad

coronavirus 2019 (COVID-19). La mayoría de los niños infectados con el virus COVID-19 solo tienen una enfermedad leve. Pero para los niños que desarrollan MIS-C, ciertos órganos y tejidos, como el corazón, los pulmones, los vasos sanguíneos, los riñones, el aparato digestivo, el cerebro, la piel o los ojos, se inflaman gravemente. Los signos y síntomas dependen de las partes del cuerpo afectadas¹.

Generalmente los pacientes pediátricos se salvan de patologías respiratorias graves asociadas a una infección por SARS-CoV-2, se ha demostrado que los resultados de morbilidad y mortalidad en pacientes pediátricos son raros en comparación con los adultos; sin embargo, el “Síndrome inflamatorio multisistémico pediátri-

1. Facultad de Medicina, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.

2. Laboratorio de Proteómica, Dolor e Inflamación, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.

Correspondencia: secretaria@aaaic.org.ar

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: XXX | Aceptado: XXX

TABLA I. Características de los artículos incluidos.

Fecha	Primer autor	Revista	Institución	País	Citaciones	Conclusión
Feb 26	Ming-Reng Chen	Frontiers in Immunology	Monash University	Australia		Existe una similitud y diferencias en fenotipos, susceptibilidad y patogenia de KD, KDSS, MIS-C y la IVIG más corticoesteroides es el tratamiento estándar
May 11	Anjali Ramaswamy	CELL PRESS	Departments of Medicine	USA		Las firmas de alarma, citotoxicidad, repertorio de TCR y plasma blasts que definimos tienen potencial para aplicación en la clínica para diagnosticar mejor y potencialmente predecir la gravedad de la enfermedad al principio del curso de MIS-C.
August 9	Pauline-McDonagh Hull		Department of Community School of Medicine	USA		Un alto cociente de inteligencia (CI) puede poner a los niños en mayor riesgo de secuelas graves de COVID-19; especialmente aquellos cuya carga viral es alta y/o que desarrollan síndrome inflamatorio multisistémico en niños (MIS-C). MIS-C
January 26	Katja Lakota	Frontiers in Immunology	University Medical Centre Ljubljana,	Eslovenia		Existe la aparición de autoanticuerpos y el posible desarrollo de enfermedades autoinmunes después de la infección por SARS-CoV-2
August 11	Consiglio CR	CELL	Karolinska Institute	Suecia		El MIS-C asociado con COVID-19 se presenta de 4 a 6 semanas después de la infección como fiebre alta, disfunción orgánica y marcadores de inflamación muy elevados.
November 12	Conor N.	CELL	Precision Institute	USA		Los pacientes con MIS-C tienen evidencia de exposición previa al SARS-CoV-2, montando una respuesta de anticuerpos con intacta capacidad de neutralización.
October 15	Porrit RA.	Journal of Clinical Investigation	Departments of Pediatrics	USA		Los marcadores de inflamación, las respuestas inmunitarias de los neutrófilos, y las vías del complemento y la coagulación están muy enriquecidos en el suero de los pacientes con MIS-C

co” (MIS-C) produce una respuesta inflamatoria severa post SARS-CoV-2 en niños que presentaron una infección asintomática, leve, 4 o 5 semanas antes, manifestándose como una respuesta inflamatoria descontrolada con afectación multiorgánica.

El MIS-C post SARS-CoV-2 tiene como disposición preferente un grupo etario < 12 años y en su gran mayoría son sanos sin comorbilidades. En cuanto a los signos y síntomas, el cuadro clínico en diversos estudios demostró la prevalencia de fiebre, vómitos, rinorrea, dolor abdominal y diarrea.

Existe una semejanza entre los signos y síntomas del MIS-C y KD (enfermedad de Kawasaki), sin embargo, los problemas cardiovasculares y gastrointestinales se presentan de forma severa e inexorable en el MIS-C.

Dentro de los aspectos base que llegan a cumplir un rol en la diferenciación de este síndrome de inflamación multisistémico pediátrico que se asocia a la enfermedad

por el COVID-19; y la enfermedad de Kawasaki, se consideran imperativos tanto el reconocimiento del fenotipo como la susceptibilidad de cada uno, así como también cumplen un rol importante los mecanismos de autoinmunidad y, no de forma exclusiva, podría incluirse la inmunoterapia aplicada en cada afección. Es muy importante mencionar que los síntomas que se reconocen en el MIS se derivan a lo que sería la KD debido a la similitud de los patrones, por ello se da inicio con el tratamiento establecido para la segunda afección mencionada¹.

Varios estudios han reportado las características laboratoriales del MIS-C en los cuales se estudian los marcadores de inflamación, el inmunofenotipo de subpoblaciones celulares, el perfilado de citoquinas y la reactividad a autoantígenos.

Por eso, el objetivo de esta revisión sistemática es sintetizar la evidencia científica existente acerca de los mecanismos inmunopatológicos del MIS-C.

TABLA 2. Resultados de la revisión sistemática.

Primer autor	Relación con Kawasaki	Autoanticuerpos	Marcadores de inflamación
Anjali et al. ²	Sintomatología similar	Anticuerpos IgG unidos a tejido endotelial	Ferritina, BNP, troponina, PCR, sCD25, IL-6 e IL-10
Conor et al. ³	Manifestaciones inflamatorias	Anticuerpos IgG e IgA, se encontraron ab Anti-La y Anti-Jo-1	PCR, VSG, IL-6, IL-8, IL-1-beta, factor de necrosis tumoral [TNF]-alfa, Ferritina
Rebecca et al. ⁴	Similar perfilado de proteínas Sintomatología similar Similar perfilado de citocinas	Anticuerpos contra tejido endotelial, cardíaco y gastrointestinal	PCR, ferritina y dímeros D, y niveles elevados de citoquinas proinflamatorias
Lakota et al. ⁵	Predisposición genética Manifestación clínica similar Afección de los vasos de mediano calibre	Anticuerpos antifosfolípidos (aPL) Anticuerpos antinucleares	IL-6, citoquina pleiotrópica clave en la tormenta inflamatoria
Consiglio et al. ⁶	Probable similar etiología autoinmune Estados hiperinflamatorios superpuestos Componente de vasculitis Inmunopatología y respuesta postinfecciosa Manifestación clínica y síntomas similares	Carencia de anticuerpos contra cualquier coronavirus común Producción de IL-6 Endoglina, glicoproteína expresada por células endoteliales Anticuerpos contra MAP2K2 Anticuerpos contra tres miembros de la familia de la caseína quinasa	VSG; Proteína C-reactiva; procalcitonina
McDonagh et al. ⁷	-	Interleucina-6 (IL-6)	IL-6 y citoquinas proinflamatorias
Chen et al. ⁸	Similar tormenta de citoquinas en la sangre (hipercitoquinemia aumentada en IL-6, IL-10, IL-17) Diagnóstico y tratamiento de KD aplicado en MIS-C (niños y adultos)	Anticuerpos anti-S (IgG, IgM e IgA, IL-6; IL-10; IFN γ ; TNF- α) pero no anticuerpos anti-N	

MATERIALES Y MÉTODOS

Dirigimos nuestra revisión sistemática en base a las directrices de PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*).

CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

Los estudios que cumplieron los siguientes criterios fueron elegidos e incluidos:

1. Pacientes diagnosticados con MIS-C leve o grave según los criterios de la OMS y de la CDC.
2. Estudios en los que se haya analizado marcadores de inflamación.
3. Estudios en los que se haya realizado el perfilado de citoquinas proinflamatorias y autoanticuerpos reactivos.

Los criterios de exclusión fueron:

1. Carta al editor, investigación básica u otros temas no relacionados con esta revisión
2. Estudios descriptivos, estudios sin experiencia/control grupal y por último que no sea estudio analítico o estudio experimental.

ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA

Se realizó una búsqueda en 2 bases de datos las cuales fueron Web of Science y Scopus.

La búsqueda de artículos se basó en las agrupaciones establecidas por las fuentes de información en cada base de datos; que estén publicados en inglés desde el año 2020 hasta la actualidad, el grupo de estudio que incluye pacientes pediátricos y la relación del MIS-C con el COVID-19. Se utilizaron palabras clave como: *síndrome inflamatorio multisistémico*, *COVID-19*, *MIS-C*, *síndrome hiperinflamatorio*, *MIS-C en COVID-19*, *síndrome multisistémico pediátrico*. Se incluyeron los términos en los campos correspondientes al objeto de estudio.

SELECCIÓN DE ESTUDIOS

El proceso de selección se dio mediante la inclusión, exclusión y diferenciación, teniendo en cuenta el metaanálisis de cada artículo seleccionado para su revisión, además de su enfoque de redacción; de esta manera se realizó un cribado de los resúmenes de cada documento, estando estos ordenados por la herramienta Excel. El idioma base de cada artículo fue un aspecto a evaluar, siendo escogidos solo los artículos escritos en inglés. La información distribuida se exportó directamente de las bases de datos utilizadas y mediante la identificación de estudios se logró la correcta selección y apartado del material que no se vinculaba directamente con el tema de investigación

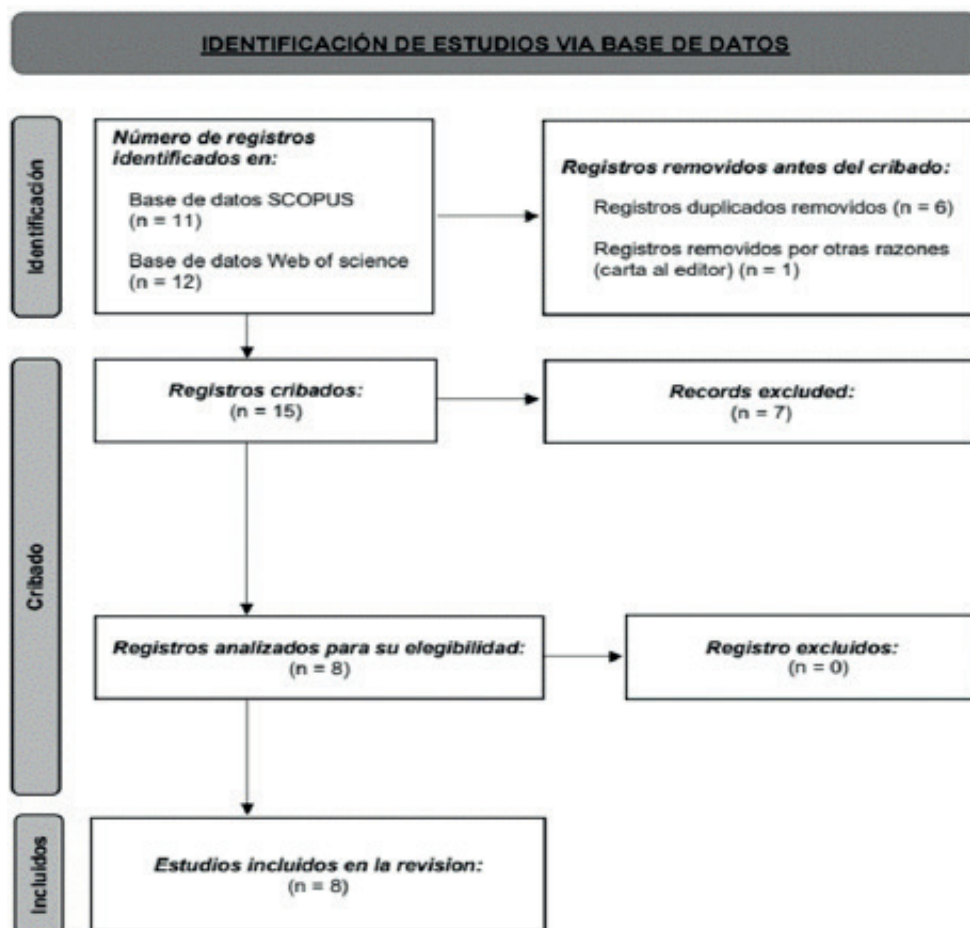


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS

La búsqueda en las bases de datos y otras fuentes incluyó 23 registros; luego de eliminar 6 duplicados y 1 por ser carta al editor, nos quedamos con 15 publicaciones; después pasamos a leer los resúmenes, de los cuales se eliminaron 7 por no tener relación con el tema de búsqueda, y finalmente nos quedamos con 8 registros (Figura 1).

ETIOLOGÍA MIS-C CON EL COVID-19

El MIS-C grave se reconoció como los casos con shock que requirieron soporte inotrópico o reanimación con líquidos >20 ml/kg, o que requirieron invasivamente soporte ventilatorio, o con ingreso en UCI, o desenlace fatal. Si es severo los pacientes con MIS-C tenían niveles más altos de glóbulos blancos, PCR (mg/l), dímero D (µg/ml) y ferritina (ng/ml) y niveles más bajos de ALC en comparación con un no grave.

DISCUSIÓN

La reciente pandemia por COVID-19 supuso un reto a nivel global para los sistemas de salud. La infección en niños supuso una amenaza para su vida por la aparición del nuevo MIS-C, que tenía características similares a la enfermedad de Kawasaki.

Se condujo una revisión sistemática para identificar el mecanismo inmunopatológico por el cual cursaba el síndrome inflamatorio multisistémico en niños.

Encontramos que los niveles de marcadores de inflamación como la PCR, IL-6, IL-10, ferritina se encontraron elevados, asimismo la presencia de autoanticuerpos.

Dentro del análisis y comparación detallada en los resultados obtenidos y ordenados de diferentes estudios previos, se da enfoque en entorno de coincidencia de datos y temas; los cuales manejan, en su forma estructural inicial, la identificación genotípica y fenotípica del síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (conocido también en inglés por sus

siglas MIS-C)⁸. De forma aditiva, se involucra el desarrollo simultáneo de la sintomatología que encaja en el perfil de la enfermedad de Kawasaki, con evidencia de estudios enfocados en el shock hiperinflamatorio⁹. Teniendo en base el enfoque de artículos que determinan similitudes entre estas dos afecciones, se hace notable su relación en el diagnóstico diferencial y en el desarrollo del tratamiento^{8,10,11}.

Sin embargo, también se encontraron resultados que plantean las diferencias implicadas en la presencia de ambas afecciones, desde la edad de incidencia, predisposición genética y geográfica, hasta el perfil de citoquinas y anticuerpos que se registran frente a los procesos inflamatorios^{5,6,12}. Asimismo, los mecanismos influenciados por el COVID-19 mantienen un registro con vínculos con perfil inmunológico e inflamatorio en ambas afecciones^{6,7,11}. La fisiopatología del MIS-C aún no está bien definida, pero los estudios revisados insinúan que este síndrome es resultado de una respuesta anormal del sistema inmune ante el virus con afectación multiorgánica¹³. La relación que se establece con el MIS-C y el COVID-19 plantea la existencia de un mecanismo llamado mimetismo molecular que podría estar involucrado, donde un antígeno comparte secuencia o cierta semejanza estructural con autoantígenos. La autoinmunidad se relaciona con tal mimetismo molecular ya sea a nivel celular, humoral después de la infección o de la vacunación¹³.

Los estudios que examinan la participación de moléculas entre los antígenos del SARS-CoV-2 y los autoantígenos relacionados con MIS-C aún no han sido concluidos o ejecutados, pero las investigaciones *in vitro* confirman la correspondencia entre las proteínas de punta y proteínas nucleares del SARS-CoV-2 y antígenos tisulares humanos^{5,13}.

Los complejos antígeno-autoanticuerpo pueden precipitar en el interior de los tejidos especialmente en los va-

sos sanguíneos, e inducir una reacción inflamatoria a través de la activación del sistema del complemento, en el que las anafilatoxinas del complemento (C3a y C5a) incorporan neutrófilos provocando una inflamación en el órgano afectado con evidente vasculitis^{5,13}.

Además, se estaría provocando una tormenta de citocinas por liberación de los linfocitos T helper 1 y 17 que estimulan la liberación de citocinas proinflamatorias provocando un progresivo daño tisular^{2,13}.

El presente estudio debe ser considerado a la luz de varias limitaciones. Primero, algunos de los resultados pueden tener heterogeneidad residual, aunque se realizaron análisis de subgrupos. Por lo tanto, los resultados deben interpretarse con cautela. En segundo lugar, los estudios seleccionados fueron principalmente estudios controlados no aleatorios.

Tercero, la mayoría de los estudios estaban limitados por una muestra más pequeña. Algunos estudios inscribieron relativamente menos sujetos, y más pequeños los tamaños pueden reducir el poder estadístico e influir en la heterogeneidad.

CONCLUSIÓN

El estudio demostró que los marcadores inflamatorios, a saber, WBC, ALC, ANC, PLT, CRP, ferritina, niveles de dímero D, LDH, fibrinógeno y VSG se correlacionaron con MIS-C. Además, se recomiendan estudios con tamaños de muestra más grandes, seguimiento más prolongado y naturaleza aleatoria en función de la importancia de este estudio. Por otro lado, este metaanálisis podría ayudar a los pediatras a evaluar y manejar de manera efectiva a niños y adolescentes con MIS-C, especialmente una prioridad durante la pandemia de COVID-19

BIBLIOGRAFÍA

1. Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico y COVID-19 [Internet]. MayoClinic.org. 2021 [citado el 28 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/mis-c-in-kids-covid-19/symptoms-causes/syc-20502550>
2. Ramaswamy A, et al. Immune dysregulation and autoreactivity correlate with disease severity in SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children. *Immunity* 2021 May 11;54(5):1083-1095.e7.
3. Gruber C, et al. Mapping Systemic Inflammation and Antibody Responses in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):982-995.e14
4. Porritt RA, Biniek A, Paschold L, et al. The autoimmune signature of hyperinflammatory multisystem inflammatory syndrome in children. *J Clin Invest*. 2021 Oct 15;131(20):e151520.
5. Lakota K, Perdan-Pirkmajer K, Hočevcar A, et al. (2021) COVID-19 in Association With Development, Course, and Treatment of Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front. Immunol.* 11:611318.
6. Consiglio CR, Cotugno N, Sardh F, et al. The Immunology of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children with COVID-19. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):968-981.e7. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.016.
7. McDonagh Hull P, Lashewicz BM, Fritzler MJ. High intelligence may exacerbate paediatric inflammatory response to SARS-CoV-2 infection. *Med Hypotheses*. 2021 Oct;155:110677. doi: 10.1016/j.mehy.2021.110677.
8. Chen M-R, Kuo H-C, Lee Y-J, et al. (2021) Phenotype, Susceptibility, Autoimmunity, and Immunotherapy Between Kawasaki Disease and Coronavirus Disease-19 Associated Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *Front. Immunol.* 12:632890. doi: 10.3389/fimmu.2021.632890.

9. Riphagen S, Gomez X, Gonzalez-Martinez C, Wilkinson N, Theocharis P. Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2020 May 23;395(10237):1607-1608. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31094-1. Epub 2020 May 7. PMID: 32386565; PMCID: PMC7204765.
10. Ensick G, Gregorio G, et al. Consensus on treatment of multisystemic inflammatory syndrome associated with COVID-19. *Arch Argent Pediatr* 2021;119(4):S198-S211.
11. García-Salido A, Antón J, Martínez-Pajares JD, et al. Documento español de consenso sobre diagnóstico, estabilización y tratamiento del síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico vinculado a SARS-CoV-2 (SIM-PedS). *Anales de Pediatría* 1 de febrero de 2021; 94(2):116.e1-116.e11.
12. Bukulmez H. Current understanding of multisystem inflammatory syndrome (MIS-C) following COVID-19 and its distinction from Kawasaki disease. *Current Rheumatology Reports*. 2021;23(8):1-11.
13. Suratannon N, Dik WA, Chatchatee P, Hagen PM van. COVID-19 in children: Heterogeneity within the disease and hypothetical pathogenesis. *Asian Pac J Allergy Immunol*. septiembre de 2020;38(3):170-7

REGLAMENTO Y NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ARTÍCULOS

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica (AAIC) publica artículos sobre Alergología, Inmunología Clínica o relacionados con ellas en su más amplio sentido. El pedido de publicación deberá dirigirse a secretaria@aaaic.org.ar.

El Comité Editorial se reserva el derecho de rechazar los artículos, así como de proponer modificaciones cuando lo estime necesario. El artículo enviado a AAIC para su publicación será sometido a la evaluación por la Secretaría de Redacción y de dos o más jueces que serán designados por el Editor, juntamente con el Consejo Editorial, que serán idóneos en el tema del artículo. Los árbitros se expedirán en un plazo menor de 45 días y la Secretaría de Redacción informará su dictamen de forma anónima a los autores del artículo, así como de su aceptación o rechazo.

La publicación de un artículo no implica que la Revista comparta las expresiones vertidas en él.

AAIC considerará los manuscritos basándose en los "Requisitos Uniformes para Preparar los Manuscritos Enviados a Revistas Biomédicas" Rev Panam Salud Pública 1998; 3:188-196.

A. NORMATIVA COMÚN A TODOS LOS TIPOS DE MANUSCRITOS

Formato. El único formato aceptado será electrónico en archivos tipo Word 6.0 o posterior con páginas diseñadas en tamaño carta o A4, con márgenes superior e inferior a 25 mm, e izquierdo y derecho a 30 mm. Preferentemente a doble espacio. Cada página debe estar numerada en forma consecutiva. Cada nueva sección del manuscrito deberá comenzar en una nueva página. El cuerpo del texto debe estar escrito enteramente en idioma español, a excepción de los campos especiales. Se debe cuidar la ortografía y el estilo del idioma. Se recomienda aprovechar las herramientas de los procesadores de texto para la revisión del manuscrito.

El archivo correspondiente debe ser remitido al mail: secretaria@aaaic.org.ar.

El autor deberá contar con copia de todo lo que remita para su evaluación. Su inclusión en el sistema implica que los autores declaran la originalidad del manuscrito, que no infringe ningún derecho de propiedad intelectual u otros derechos de terceros, que no se encuentra bajo consideración de otra publicación, y que no ha sido previamente publicado.

Referencias. Se numeran consecutivamente según su orden de aparición en el texto. En el texto deben figurar como números arábigos entre paréntesis. El formato debe respetarse según la National Library of Medicine de Washington. Las

abreviaturas de las publicaciones deberán realizarse según las utilizadas por el Index Medicus. La lista puede hallarse en <http://www.nlm.nih.gov/>

No se aceptará como referencia las comunicaciones personales (pueden aclararse en el texto), ni citas a resúmenes que no figuren en actas de la respectiva actividad científica.

Ejemplos. Los autores deben expresarse con su apellido seguido por las iniciales de los nombres. Para la lista de autores que superen el número de seis, se debe listar los primeros tres y agregar et al. *Obsérvense los signos de puntuación.*

- *Formato para artículos:* Parkin DM, Clayton D, Black RJ, et al. Título completo del artículo. Revista año; volumen: página de inicio-página de fin.
- *Formato para libros:* Ringsven MD, Bond D. Título del libro, edición, ciudad de edición; editorial; año.
- *Formato para capítulos:* Phillips SJ, Wishnant JP. Título del capítulo. En: Título del Libro subrayado, editores del libro en formato similar a los autores, edición, ciudad de edición: editorial; año: página de inicio-página de fin.
- *Formato para páginas Web:* Autores si los hubiere. Título o nombre de la página. Dirección completa de acceso al navegador precedida por <http://...>, mes y año de revisión.

Tablas. Formato permitido: tablas tipo Word. Las tablas deben completarse y no duplicar el texto. Deben estar presentadas en páginas separadas, una tabla por página. Deben entenderse fácilmente. Se numerarán en números arábigos según el orden de mención. Se le colocará un epígrafe breve a cada tabla y se aclararán todas las abreviaturas en forma de pie de página, al final de la tabla. No serán aceptadas fotografías de tablas ni reducciones. Tendrán que estar en idioma español.

Gráficos. Los gráficos (barras o tortas) en blanco y negro deben ser legibles y claros, deberán estar realizados en formato Excel, independientemente de que se agreguen al texto del manuscrito. Las etiquetas de valores y las leyendas deben ser fácilmente legibles. Preferentemente se deben utilizar fuentes tipo Times New Roman o Arial (12 pts o más). Se prefieren etiquetas directamente en la gráfica más que en la leyenda. La primera letra debe ir en mayúsculas y el resto en minúsculas, no se aceptará todo en mayúsculas. El relleno de los gráficos de barra o de torta debe ser distintivo, evitando los sombreados. Los gráficos en tres dimensiones solo estarán reservados para cuando el gráfico presente tres coordenadas (x, y, z). Si

se utilizan más de dos barras en un mismo gráfico, utilizar rellenos con líneas para un contraste adecuado. Si no se cuenta con originales generados por computadora, se puede enviar un juego de fotografías digitales.

Figuras. Un número razonable de figuras en blanco y negro serán publicadas libre de costo para el autor. Se deberán hacer arreglos especiales con el editor para figuras en color o tablas elaboradas. Las fotografías se deberán enviar en formato digital de 5 megapíxeles mínimo con nombre de archivo “figura” seguido del número correlativo de aparición en el texto, con extensión JPG (p. ej.: figura1.jpg) Se prefiere formato TIFF, independientemente que se agreguen al texto del manuscrito. Las figuras escaneadas deben ser realizadas con una definición de 300 dpi. Las figuras deben citarse en el texto y se numerarán en números arábigos según el orden de mención. El epígrafe deberá figurar en el cuerpo del texto al final del texto o de las tablas.

Las tablas, gráficos y figuras que se envíen en archivo aparte deberán tener como nombre de archivo la palabra “tabla”, “gráfico” o “figura” según corresponda.

B. ARTÍCULOS ORIGINALES

Deben describir totalmente, pero lo más concisamente posible los resultados de una investigación clínica o de laboratorio que sea original. Todos los autores deben haber contribuido en grado suficiente para responsabilizarse públicamente del artículo. El artículo deberá estar organizado de la siguiente manera:

Página del Título. El título debe ser conciso pero informativo. A continuación debe figurar el título en idioma inglés. Debe figurar el nombre y apellido de cada autor como así también el nombre de departamento e institución y los grados académicos. Debe constar la declaración de descargo de responsabilidad si las hubiere. Se debe explicitar el nombre, dirección, teléfono, fax y e-mail del autor que se encargará de la correspondencia y las separatas. Procedencia del apoyo recibido (becas, equipos, medicamentos, etc.). En la última línea de la página debe figurar un titulillo que no debe superar los 40 caracteres.

Página de Resumen (Abstract) y Palabras clave (Keywords). Tendrá una extensión máxima de 250 palabras. Se evitarán las abreviaturas a menos que sean de uso extendido en la especialidad (p. ej.: ICAM-1, IgE). Dada la importancia que tienen los resúmenes de los trabajos para su difusión nacional e internacional, los mismos se presentarán de manera estructurada que contendrá:

Los fundamentos o antecedentes (en inglés, background), son una puesta al día del estado actual del problema o sea, cuál es el problema que lleva al estudio. El objetivo (en inglés, objective), define cuál es el propósito del estudio. El lugar de aplicación o marco de referencia (en inglés, setting), delimita el entorno de realización. El diseño (en inglés, design), es el tipo de estudio realizado. La población (pacientes o partici-

pantes) (en inglés, population), conforma el material. El método (en inglés, methods), es la forma en que se realizó el estudio. Los resultados (en inglés, results), deben incluir los hallazgos más importantes. Las conclusiones (en inglés, conclusion), deben estar avaladas por los resultados. Se debe hacer hincapié en aspectos u observaciones nuevas.

En atención a la brevedad del resumen, se escribirá en forma puntual más que narrada.

A continuación deben figurar de 3 a 10 palabras clave o frases cortas clave con el fin de facilitar la inclusión del artículo en el repertorio nacional o internacional de bibliografía médica. Se pueden utilizar los términos de la lista MeSH (Medical Subject Headings) disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh>. En hoja aparte se deberá adjuntar un resumen en idioma inglés (abstract) siguiendo los mismos lineamientos que para el realizado en español. Se sugiere un apoyo especial para aquellos que no dominen adecuadamente este idioma para no incurrir en errores gramaticales.

Abreviaturas y símbolos. Serán aclaradas la primera vez que se expresen en el texto. Los símbolos se anotarán, preferentemente, según las recomendaciones del Sistema Internacional. Cuando se escriban números enteros no se debe utilizar puntuación para indicar los millares, sino un espacio entre ellos. La puntuación se utilizará exclusivamente para la expresión de decimales.

Texto.

Introducción. Se debe expresar el propósito del estudio (objetivos) y el resumen del fundamento lógico. No se deben incluir datos ni conclusiones.

Métodos. Se debe describir claramente la selección de los sujetos y sus características epidemiológicas. Identificar los métodos, aparatos (nombre y dirección del fabricante) y procedimientos que permitan reproducir los resultados. Proporcionar referencias de métodos acreditados incluidos los estadísticos. Describir brevemente los métodos no bien conocidos o aquellos que han sido modificados.

Se debe nombrar la autorización del comité de ética institucional que aplique y la concordancia con la Declaración de Helsinki en su última adaptación.

En el caso de ensayos con medicamentos, se debe aclarar la aplicación del ICH (International Conference in Harmony) y de la resolución ANMAT vigente a la fecha de realizado el estudio. Si se trata de animales, nombrar si se cumplieron normas institucionales, de consejos nacionales o de leyes nacionales que regulen el cuidado y uso de animales de laboratorio. Describir los métodos estadísticos para verificar los datos presentados. Describir todos los procedimientos: aleatorización, abandono de protocolos, software (ej.: epi info).

Resultados. Se cuantificarán y presentarán con indicadores apropiados de error (ej.: intervalos de confianza). No depender sólo de p. Se debe seguir una secuencia lógica de los resultados obtenidos. No repetir en el texto los datos de cuadros ni ilustraciones. Limitar su número a las estrictamente

necesarias Solo destacar o resumir las observaciones importantes. Evitar el uso no técnico de términos estadísticos (ej: muestra, azar, normal, significativo, etc.).

Discusión. Hacer hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos o pertinentes para la investigación futura. No repetir lo expresado en otras secciones. Establecer nexos entre objetivos y resultados. Relacionar con los resultados de otros trabajos si se considera necesario. Explicitar las debilidades del trabajo.

Agradecimientos. Se incluirán aquellas instituciones o personas que han sido esenciales por su ayuda técnica, por apoyo financiero o por conflicto de intereses.

C. COMUNICACIONES RÁPIDAS

El Consejo Editor considerará artículos de no más de 5 hojas y dos tablas o figuras resumiendo resultados experimentales de excepcional importancia o urgencia, que requieran una rápida publicación. Los autores deberán identificar y justificar estos artículos en la carta de pedido de evaluación. El formato y características serán idénticos a los artículos originales. Si son aceptados, serán publicados a la brevedad. Los editores pueden elegir (luego de notificarlo) considerar estos artículos para su publicación regular.

D. COMUNICACIONES BREVES Y REPORTES DE CASOS

Casos interesantes por su rareza o comunicaciones científicas breves serán considerados para esta sección. Estos artículos deben contar con un título corto en español e inglés, no exceder las tres páginas y una tabla o figura. No deberán contar con más de 10 referencias que sean relevantes. No requiere resumen o abstract.

E. CARTAS AL EDITOR

Cartas cortas referidas a artículos publicados recientemente en AAIC y otros aspectos de particular interés para la especialidad, serán evaluados por el Consejo Editorial. Tendrá un pequeño título en español e inglés. Será precedida por el encabezado "Sr. Editor:" y deben contar con menos de 500 palabras, incluyendo datos breves en formato de tabla. Contará con un máximo de 5 referencias bibliográficas.

Si la carta es aceptada, en todos los casos el Consejo Editorial enviará copia de la carta al autor del artículo referido, dando oportunidad en el mismo número de edición de la carta, de contestar o comentar la consulta y/u opinión del autor de la carta, con las mismas limitaciones de extensión.

F. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Se aceptarán los artículos de revisión de temas concernientes a Alergia e Inmunología o a cualquier tema relacionado con la especialidad. Estos serán solicitados por el Consejo Editorial a autores específicos. Se otorgará prioridad a las revisiones relacionadas con aspectos controvertidos o relacionados con pro-

gramas de Educación Médica Continua. Deben contar con menos de 20 carillas y con el número de referencias adecuadas para la importancia del tema. Se debe aclarar la metodología para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar los datos.

El formato será similar a la de los artículos originales, excepto que no contará con Material y Métodos ni Resultados. Se pueden utilizar subtítulos para lograr una mejor presentación didáctica.

G. ARTÍCULOS DE OPINIÓN

Los artículos de Opinión serán solicitados exclusivamente por el Consejo Editorial a autores específicos sobre temas de particular interés y/o debate.

H. CESIÓN DE DERECHOS

Modelo de Transferencia de derechos de autor

El/los autor/es transfieren la propiedad intelectual del artículo a *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* en el caso de que el manuscrito sea publicado. El/los abajo firmante/s declaran que el artículo es original, que no infringe ningún derecho de propiedad intelectual u otros derechos de terceros, que no se encuentra bajo consideración de otra publicación y que no ha sido previamente publicado. El/los autor/es confirman que han revisado y aprobado la versión final del artículo.

I. LISTA DE CONTROL

- Carta de solicitud de presentación con la transferencia de los derechos
- Carta en caso de existir Conflicto de Intereses
- Manuscrito en formato Word
- Números de página en extremo superior derecho
- Doble espacio
- Nombre completo de los autores y sus grados académicos
- Afiliaciones institucionales y recursos de fondos (sponsorización)
- Dirección del Autor encargado de la Correspondencia (incluyendo e-mail)
- Titulillo (frase de menos de 40 caracteres que resuma al título)
- Resumen y Abstract (no más de 250 palabras)
- Lista de palabras clave y de Keywords
- Lista de abreviaturas y acrónimos
- Secciones iniciadas en páginas separadas
- Referencias a doble espacio en página separada, respetando formato
- Epígrafes a doble espacio en páginas separadas
- Figuras y fotos en formato digital compatible
- Tablas a doble espacio
- Nota de copyright

J. DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y direcciones de correo introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.