



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
TRANSFORMANTE BETA (TGF- β) Y DE
MIOFIBROBLASTOS EN NEUMONITIS POR
HIPERSENSIBILIDAD”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

CAROLINA CERVANTES GRANADOS

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. MOISÉS SELMAN LAMA

MÉXICO D. F.

ABRIL, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| PREFACIO | 4 |
| RESUMEN | 5 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 7 |
| MARCO TEORICO | 8 |
| OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS | 17 |
| HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y ALCANCE | 18 |
| MATERIAL Y METODOS (DISEÑO EXPERIMENTAL) | 19 |
| RESULTADOS | 25 |
| DISCUSIÓN | 35 |
| CONCLUSIÓN | 40 |
| GLOSARIO | 41 |
| BIBLIOGRAFÍA | 46 |

INTRODUCCIÓN

La Neumonitis por Hipersensibilidad es una enfermedad inflamatoria difusa del pulmón causada por la exposición a diversas partículas orgánicas comprometiendo a bronquiólos, alvéolos y espacio intersticial.

Esas partículas antigénicas tienen un diámetro de 3-5 μ por lo que se depositan en partes terminales de las vías aéreas pequeñas y en espacios alveolares, las más frecuentes son los hongos, los actinomicetos termofílicos, proteínas heterólogas y compuestos químicos de bajo peso molecular.

La inflamación difusa esta mediada por una respuesta inmunológica exagerada que ocurre en un huésped genéticamente susceptible. La secuencia de eventos inmunopatológicos que permiten el desarrollo de este padecimiento no se conoce con precisión, aunque la mayoría de las investigaciones apoyan el concepto de que se trata de una hiperreactividad inmune mediada por linfocitos T, así mismo los factores que determinan la susceptibilidad genética son desconocidos, aunque existen evidencias de que la enfermedad puede estar asociada a algunos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad.

En México la causa más común de NH es la exposición a proteínas de aves principalmente pichones, palomas y pericos. La presentación clínica y evolución de la NH puede ser aguda o subaguda/crónica, esta última se refiere a la inflamación pulmonar prolongada y persistente, las manifestaciones clínicas son la disnea de esfuerzo progresiva, taquipnea, fatiga fácil, tos con expectoración mucosa, hiporexia y baja de peso. Es importante señalar que en relación al pronóstico los

pacientes con la forma clínica subaguda/crónica pueden mejorar o curar, aunque en un tercio de los casos aproximadamente puede progresar hacia la fibrosis pulmonar difusa. En este último caso la insuficiencia respiratoria progresa irreversiblemente y se acompañan de hipertensión arterial pulmonar e insuficiencia cardiaca derecha.

Los mecanismos fisiopatológicos que operan en la progresión o regresión de la forma subaguda/crónica no se conocen, por lo que puede existir una relación con el factor de crecimiento transformante beta y la presencia de miofibroblastos.

EL TGF- β está constituido por una familia de péptidos relacionados estructuralmente de los cuales los mas estudiados son el TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las diferentes isoformas de este factor se han identificado en diferentes estirpes celulares como plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células tumorales, linfocitos T en respuesta a diversos antígenos y en macrófagos cuando son expuestos a lipopolisacaridos bacterianos.

Los miembros de esta superfamilia son proteínas multifuncionales que desempeñan un papel esencial tanto durante el desarrollo embrionario como en la homeostasis tisular. Entre otras funciones importantes son reguladores de la respuesta inflamatoria y de la respuesta fibrosante. En relación a la inflamación, el TGF- β parece desempeñar un papel dual, ya que a bajas concentraciones se considera como factor proinflamatorio y a altas concentraciones como factor antiinflamatorio, referente a la respuesta inmune diversos estudios han mostrado que el TGF- β es un potente agente inmunosupresor afectando la respuesta humoral y celular. Ejemplo de ello es que este factor parece contribuir a la supresión de la respuesta inmune en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida

afectando principalmente a células dendríticas en su función de presentadoras de antígenos.

Referente a la respuesta fibrosante el TGF- β favorece la acumulación de matriz extracelular. Para fines prácticos las isoformas de TGF- β tienen funciones muy similares, por ello el TGF- β 1 se considera como el prototipo de factor profibrosante porque favorece la formación de miofibroblastos incrementando la síntesis de colágenas fibrilares, disminuye la expresión de colagenasa y aumenta la del inhibidor tisular de metaloproteinasas. Por lo que este factor se cree puede desempeñar un papel en la patogénesis de esta enfermedad NH.

PREFACIO

El principal objetivo de esta investigación es dar a conocer a la comunidad científica nuestros hallazgos sobre la relación entre una proteína conocida como Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) y la presencia de fibrosis en la Neumonitis por Hipersensibilidad, una enfermedad pulmonar que se clasifica en la categoría de las Neumopatías Intersticiales Difusas. La Neumonitis por Hipersensibilidad también conocida como Alveolitis Alérgica Extrínseca es ocasionada por la inhalación de partículas orgánicas y se caracteriza por un cuadro clínico que puede ir desde una forma aguda o progresar a la forma subaguda/crónica la cual puede ocasionar fibrosis del parénquima pulmonar.

La fibrosis pulmonar es provocada por la interacción de una variedad de citocinas y factores de crecimiento, en especial por una expresión exagerada del TGF- β . Este mediador favorece la presencia de miofibroblastos y el depósito exagerado de diversas proteínas de matriz extracelular, en especial colágenas intersticiales. En el pulmón, el desarrollo de fibrosis provoca la destrucción de las unidades alveolo-capilares ocasionando insuficiencia respiratoria progresiva que generalmente es irreversible y mortal. Actualmente no existe ningún tratamiento que permita revertir a la fibrosis y sólo el incremento en nuestro conocimiento acerca de los mecanismos patogénicos involucrados en la fibrogenesis permitirá abrir nuevas ventanas terapéuticas.

RESUMEN

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar, ocasionada por la inhalación repetida de partículas orgánicas que comprometen bronquiolo, alvéolo y espacio intersticial. La secuencia de los eventos inmunopatológicos no se conoce con precisión aunque la mayoría de las evidencias apoyan el concepto de que se trata de una hiperreactividad mediada por linocitos T. Por otro lado, alrededor de un tercio de los pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad desarrolla fibrosis intersticial difusa, pero los mecanismos responsables de la respuesta fibrosante en esta enfermedad se desconocen. Dada la importancia que el factor de crecimiento transformante beta tiene en la fibrogénesis tisular se considero de interés analizar su participación en esta enfermedad.

Se estudiaron treinta pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad y como casos control se utilizaron seis personas sanas y veintinueve pacientes portadores de Fibrosis Pulmonar Idiopática. Nuestros resultados mostraron un incremento significativo del factor de crecimiento transformante beta en el lavado bronquioalveolar de los pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad en comparación con los controles sanos. El factor se localizó por inmunohistoquímica en células epiteliales y macrófagos intraalveolares. El factor de crecimiento transformante beta se encontró más elevado en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad crónicos con fibrosis, al igual que en los pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática. Estos hallazgos sugieren que el factor de crecimiento transformante beta puede participar en los mecanismos de fibrogénesis en la NH.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Neumonitis por Hipersensibilidad es una enfermedad inflamatoria difusa del pulmón y una de sus complicaciones es la posible evolución hacia la fibrosis con destrucción de la arquitectura normal del parénquima. Los mecanismos responsables de la respuesta fibrosante en esta enfermedad se desconocen. Dada la importancia que el TGF- β 1 en la fibrogénesis tisular se considera de interés analizar su participación en esta enfermedad.

MARCO TEORICO

Neumonitis por Hipersensibilidad

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar, ocasionada por la inhalación repetida de partículas orgánicas, las cuales provocan una respuesta inmune exagerada que afecta bronquiolo, alvéolo y espacio intersticial (1, 2).

Una variedad de partículas orgánicas con un tamaño menor a 3-5 μm de diámetro aerodinámico pueden alcanzar y depositarse en bronquiólos terminales y alvéolos, y provocar la enfermedad. Ejemplo de ello son los hongos, bacterias termofílicas, proteínas heterólogas y algunos compuestos químicos de bajo peso molecular como el di-isocianato de tolueno. Existen además algunos factores que parecen influir en la patogenicidad de las partículas inhaladas, como son: 1) la dificultad para ser fagocitadas y procesadas por macrófagos alveolares, 2) su potencial capacidad de activar de la vía alterna del complemento, 3) su acción como adyuvantes y 4) su capacidad enzimática (2, 3).

La secuencia de los eventos inmunopatológicos no se conoce con precisión aunque la mayoría de las evidencias apoyan el concepto de que se trata de una hiperreactividad mediada por linfocitos T; sin embargo la formación y depósito pulmonar de complejos inmunes puede participar en los cuadros agudos (4).

La NH es menos frecuente en fumadores y la razón de ello se desconoce, se ha postulado que el humo del tabaco puede proteger del desarrollo de esta enfermedad porque induce una disminución de la capacidad de respuesta inmune

local mediada por linfocitos T y B (5). En general, los fumadores expuestos a diferentes antígenos presentan también títulos bajos de anticuerpos específicos anti-antígenos aviarios, en comparación con expuestos no fumadores lo que se ha constatado en pacientes con diferentes formas de NH (2, 6-8).

La enfermedad se puede presentar en 3 formas clínicas: aguda, subaguda y crónica. La forma aguda ocurre 6-8 horas después de la exposición a cantidades elevadas del antígeno. Las formas subagudas y crónicas se caracterizan porque la enfermedad se desarrolla lentamente, en semanas (subaguda) o meses/años (crónica) después de la exposición constante a bajas concentraciones de antígenos (1-3).

La forma más frecuente de NH en México es aquella provocada por la exposición a proteínas de diferentes aves, incluyendo palomas, pichones, canarios, periquitos, etc (1, 2). En términos generales, la enfermedad de los cuidadores de aves que se observa en México se caracteriza por una forma clínica subaguda/crónica provocada por la exposición prolongada al antígeno aviario, que afecta predominantemente a mujeres entre la 3° y 5° décadas de la vida. Es importante destacar que cuando esta forma de presentación progresa, se producen lesiones fibrosantes difusas que destruyen el parénquima pulmonar y en este contexto, aproximadamente el 30% de los pacientes desarrollan una enfermedad progresiva, incapacitante e irreversible, lo cual provoca la muerte de la mitad de estos casos en un lapso de 5 a 7 años (9, 10). A la fecha se ignoran los mecanismos responsables del inicio de esta respuesta fibrosante. En otras

palabras, el porqué unos enfermos curan y otros progresan a la fibrosis se desconoce.

Perfil celular y hallazgos histopatológicos

Las modificaciones de las poblaciones celulares en esta enfermedad han sido evaluadas fundamentalmente en el lavado bronquioalveolar. El hallazgo más consistente es un notable incremento de los linfocitos T. En los casos agudos y subagudos se observa un predominio de la subpoblación CD8+ (citotóxica/supresora) con disminución en la relación CD4+/CD8+. En contraste, los pacientes con la forma crónica muestran un aumento de los linfocitos CD4+ lo que parece asociarse con la progresión hacia la fibrosis (11-14).

Pocas horas o días después de la exposición se aprecia también un incremento de neutrófilos, células plasmáticas y células cebadas. También se encuentran incrementadas las células asesinas naturales y los linfocitos citotóxicos no restringidos al sistema HLA (15-19).

Histológicamente la fase inflamatoria (subaguda) se caracteriza por afectar predominantemente al bronquiolo terminal y respiratorio con neumonitis circunvecina (lesiones bronquiolocéntricas). Las paredes bronquiolares y alveolares muestran un infiltrado intersticial difuso de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Las lesiones inflamatorias tienden a desarrollar granulomas no necrotizantes pobremente formados que se distribuyen alrededor de los bronquiólos y en el espacio intersticial (2, 20-22).

La fase crónica se caracteriza por fibrosis intersticial, inflamación linfocítica y granulomas (9, 10, 23, 24). El desarrollo del proceso fibrótico se ha relacionado con

la liberación de mediadores específicos por macrófagos activados incluyendo entre otros a la fibronectina que participa en la proliferación, reclutamiento y adhesión de diferentes tipos celulares y la vitronectina glucoproteína que forma parte de la matriz extracelular. La vitronectina media la adhesión celular y participa en los procesos de reparación que siguen a la inflamación tisular (25).

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El TGF- β representa una superfamilia de ligandos que desempeñan un papel fundamental en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos. El TGF- β es un mediador biológico multifuncional involucrado en el control de la diferenciación y proliferación celular, desarrollo embrionario, respuesta inmune, apoptosis y reparación tisular (26-28). En los mamíferos existen tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), cada una codificada por genes distintos y aunque comparten del 71 al 76% de identidad, los fenotipos que resultan de los ratones deficientes en cada una de las isoformas son muy distintos, lo que sugiere que estos ligandos tienen actividades específicas que no pueden ser compensadas por otro miembro de la familia (29). Todas las isoformas del TGF- β se sintetizan como precursores diméricos, que se secretan al medio extracelular en su forma inactiva y de la cual se origina la forma madura activa (30).

El TGF- β ejerce su acción a través de tres receptores de alta afinidad, el T β R-I, T β R-II y T β R-III los cuales se encuentran virtualmente en todas las células. Los receptores tipo I y II, son cinasas transmembranales de serina-treonina que interactúan con el receptor tipo III (betaglicano), el cual carece del dominio cinasa

(28, 31, 32). El receptor tipo III es un proteoglicano anclado a membrana que no tiene estructura de señalización pero que funciona como presentador del TGF- β a los otros receptores. El complejo receptor consiste de dos cinasas serina/treonina transmembranales de tipo II y dos de tipo I. La asociación con el betaglicano le permite al T β R-II fosforilar residuos de serina del dominio GS en el T β R-I, causando la activación del dominio cinasa en éste último. La cinasa activa del T β R-I fosforila entonces a miembros de la familia de proteínas Smad nombre compuesto de Sma (*Caenorhabditis elegans*) y Mad (*Drosophila melanogaster*) (31-35).

Los efectos en la síntesis y depósito de matriz extracelular son mediados por el receptor tipo I, mientras que los efectos sobre proliferación celular son mediados por el receptor tipo II. La regulación de la secreción del TGF- β 1 y su acción involucra eventos post-transcripcionales, incluyendo la estabilización del RNAm, el ensamblado y activación del complejo latente y modulación de la expresión de receptores.

Las proteínas Smad son hasta la fecha los únicos substratos directos descritos para el receptor T β R-I y son cruciales en la propagación intracelular de la señal del TGF- β . En base a su estructura y función, las proteínas Smad se clasifican en: R-Smads (Smad-2 y -3), las cuales son fosforiladas por el T β R-I y son fundamentales para el inicio de la señalización intracelular y Co-Smad (Smad-4), la cual se asocia con las R-Smads y forma un complejo transcripcional que se transloca al núcleo. Existe también una Smad inhibitoria (I-Smad o Smad-7), la cual antagoniza la función de las R-Smads previniendo su fosforilación. La fosforilación de Smad-2 y/o Smad-3

por el T β R-I, induce su asociación con Smad-4 y su translocación al núcleo celular; este complejo interactúa con co-represores y/o co-activadores que regulan negativa o positivamente la expresión de genes blanco del TGF- β (34-36).

Sin embargo, aunque las proteínas Smad son los únicos substratos de los receptores T β R-I y T β R-II conocidos hasta ahora, existen evidencias recientes que demuestran que el TGF- β puede ejercer también acciones a través de la vía de las MAPKs (*Mitogen activated protein-kinases*), la PI3-K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) y GTPasas (37-39). La activación de múltiples vías de señalización, río abajo del TGF- β 1 y su entrecruzamiento depende del tipo celular, el microambiente extracelular y la presencia de otros factores de crecimiento.

El TGF- β es secretado en forma inactiva ó latente y requiere su activación antes de poder ejercer su efecto biológico. La forma latente del TGF- β 1 es un complejo de alto peso molecular en el cual el TGF- β 1 se encuentra enlazado de forma no covalente a otro péptido dimérico, denominado péptido asociado a latencia (LAP); esta forma latente es almacenada en la superficie de la célula y en la matriz extracelular, convirtiéndose así en la forma activa en esos mismos sitios por medio de diferentes mecanismos. Por ejemplo, al menos dos miembros de la familia de las Integrinas ubicados en la superficie de las células epiteliales, α v β 6 y α v β 8 son capaces de activar al TGF β (40). Por otro lado, el complejo latente del TGF- β contiene, además de la forma dimérica madura del factor y el LAP, un tercer producto conocido como proteína de unión al TGF- β latente (LTBP). Este último es el que permite el alojamiento del factor en sitios específicos de la matriz

extracelular. En estos casos, es esencial para la activación el reconocimiento del LTBP asociado a matriz extracelular y posteriormente el reconocimiento del TGF- β latente. En estos pasos de activación, diferentes eventos proteolíticos que involucran la activación del plasminógeno y de algunas metaloproteinasas de matriz son fundamentales (41, 42). La vida media del TGF- β activo es en promedio de 2 minutos, mientras que la forma latente es de 90 minutos.

TGF- β y la respuesta inflamatoria

El TGF- β es un mediador multifuncional con poderosos efectos sobre la respuesta inflamatoria y la respuesta fibrosante (42-46). Desde el punto de vista del proceso inflamatorio, el TGF- β es considerado como un potente agente inmunosupresor y afecta tanto la respuesta humoral como la celular. En este contexto, ha demostrado ser benéfico en modelos de enfermedades autoinmunes cuando se administra por vía sistémica (47).

Asimismo, su expresión se encuentra incrementada en linfocitos aislados de sangre de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, contribuyendo así a la inmunosupresión sistémica (48).

TGF- β y la respuesta fibrosante

El TGF- β 1 está asociado con fibrosis en diferentes órganos, donde entre otros efectos: favorece el incremento en la producción de proteínas de matriz extracelular e inhibe la síntesis de enzimas proteolíticas degradantes de matriz.

El TGF- β 1 es un potente quimiotáctico para macrófagos a los cuales activa para liberar otras citocinas tales como el factor de crecimiento derivado de

plaquetas, la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral y el propio TGF- β . Todas estas moléculas pueden amplificar la respuesta fibrótica. El TGF- β se incrementa en diversas enfermedades fibrosantes como glomerulonefritis, artritis reumatoide, cirrosis hepática y fibrosis pulmonar idiopática (45, 46). En este último padecimiento se ha demostrado su expresión en células del epitelio alveolar y bronquiolar, así como en macrófagos (49).

A la fecha existe un solo estudio experimental que sugiere que el TGF- β puede estar involucrado en la génesis de fibrosis subsecuente a la inhalación de partículas orgánicas (50). Sin embargo, no existen estudios en humanos con este padecimiento.

Lavado Bronquioalveolar

En los últimos 15 años, la técnica del LBA ha permitido un mejor análisis de las enfermedades pulmonares a través de la recuperación directa de moléculas y células del tracto respiratorio inferior. Este estudio ha sido posible gracias al advenimiento del fibrobroncoscopio, un instrumento de fibra óptica que permite visualizar hasta los bronquios subsegmentarios, introducir y aspirar líquidos así como realizar biopsias transbronquiales (51).

El análisis celular del LBA permite cuantificar el número total de células inflamatorias, así como su perfil diferencial y subpoblaciones específicas, lo que provee información muy útil acerca de la actividad inflamatoria de las enfermedades pulmonares e incluso su posible pronóstico (52, 53).

Las células bronquioalveolares de sujetos normales consisten de 80 a 85 % de macrófagos y 10 a 15 % de linfocitos. Durante el proceso inflamatorio del parénquima pulmonar, la producción total de tipos celulares y los porcentajes de linfocitos y leucocitos polimorfonucleares están generalmente incrementados, mientras que el porcentaje de macrófagos está proporcionalmente reducido.

Como se mencionó previamente, en la NH aguda (dentro de las primeras 24 horas de la exposición al antígeno) hay un incremento en el número de neutrófilos y células cebadas, y posteriormente de linfocitos predominantemente células T. Este incremento de linfocitos T se compone predominantemente de células CD8+ (supresores o citotóxicos). Además se observa un incremento de las células T $\delta\gamma$.

Posteriormente el número de linfocitos se incrementa y el de neutrófilos disminuye y en las etapas crónicas aumenta la población de linfocitos T CD4+ (facilitadores). El fluido de LBA de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad también contiene altos niveles de inmunoglobulinas como la IgG, IgM e IgA (2).

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión y localización del TGF- β 1 en biopsias de pulmón humano con Neumonitis por Hipersensibilidad, así como determinar la concentración del mismo en lavados bronquioalveolares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Detectar la expresión y localización de la isoforma TGF- β 1 por inmunohistoquímica, en pulmón humano con NH.

2.- Determinar y cuantificar la presencia del TGF- β 1 en el lavado bronquioalveolar de pacientes con NH por la técnica de ELISA.

HIPÓTESIS

En la Neumonitis por Hipersensibilidad que evoluciona a la fibrosis pulmonar existe un incremento en la expresión y síntesis del TGF- β 1, así como un aumento en el número de miofibroblastos.

JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos fisiopatológicos que tienen que ver con la progresión o regresión de la forma subaguda o crónica de la Neumonitis por Hipersensibilidad se desconocen. En este estudio se plantea la relación entre la expresión del TGF- β y la presencia de miofibroblastos y desarrollo de fibrosis.

Este mediador no ha sido estudiado en la NH humana, pero los resultados obtenidos en modelos experimentales en ratón sugieren que puede desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad.

ALCANCE

Se pretende aportar una nueva pieza en el conocimiento de esta enfermedad, con el fin de ir dilucidando los mecanismos fisiopatológicos que conllevan al proceso de fibrosis.

MATERIALY METODOS (DISEÑO EXPERIMENTAL)

I.- Población en estudio.

Se estudiaron 30 pacientes con diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad y como grupos control se evaluaron 29 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y 6 sujetos sanos no fumadores, que voluntariamente quisieron participar en el estudio. En este grupo, las pruebas funcionales respiratorias, la radiografía de tórax y los estudios de laboratorio fueron normales.

Los criterios de inclusión para los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad han sido previamente publicados (54) e incluyeron:

- 1) Historia de exposición a aves con relación causa-efecto.
- 2) Presencia de anticuerpos séricos específicos contra antígeno aviario.
- 3) Cuadro clínico, radiológico y funcional respiratorio compatible con una neumopatía intersticial difusa.
- 4) Lavado bronquioalveolar con más de 40% de linfocitos.
- 5) Tomografía axial computada de alta resolución que mostraba imágenes micronodulares bronquiocéntricas bilaterales, imágenes en vidrio despulido y en mosaico.
- 6) Biopsia pulmonar a cielo abierto con alteraciones morfológicas pulmonares compatibles NH.

El diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática se estableció de acuerdo a los criterios aceptados internacionalmente (55, 56).

Pacientes y controles fueron informados del estudio para su consentimiento y el protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Secretaria de Salud.

II.- Lavado Bronquioalveolar.

La fibrobroncoscopia se realizó al inicio del estudio y en ausencia de tratamiento previo. Los pacientes se anestesiaron localmente con xilocaína al 2 % y se les administró 0.5 mg. de atropina por vía I.M. 15 minutos antes del LBA. El procedimiento se supervisó continuamente con un monitor cardiaco y el oxímetro de pulso para evaluar la función cardiaca y la saturación arterial del oxígeno.

Se introdujo el fibrobroncoscopio y se acuñó en el lóbulo medio y/o llingula. Una vez colocado en el bronquio segmentario, se procedió a realizar el LBA con 300 ml de solución salina al 0.9% a temperatura ambiente. Para ello, se instilaron 5 alícuotas de 60 ml seguida de aspiración suave del líquido. Con esta operación se recuperó un volumen promedio del 250 ml (57).

El fluido fue colectado en tubos cónicos estériles y se transportaron inmediatamente en frío al laboratorio para su procesamiento en el cuarto de cultivo. El LBA se filtró a través de una gasa estéril para eliminar el moco y todas las alícuotas se juntaron en un matraz Erlenmeyer estéril. Para obtener la fracción celular, el fluido se separó en alícuotas de 20 ml y posteriormente se centrifugaron a 450 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y se guardó a -70° C. Previo a su utilización, las alícuotas con el sobrenadante se concentraron 10 X por ultrafiltración.

El botón celular de cada alícuota se depositó en un tubo estéril y se resuspendió en 10 ml de solución salina estéril. Para contar el número total de células obtenidas y evaluar su viabilidad, se tomaron 10 μ l de la suspensión celular y se diluyeron 1:10 azul de tripano. Las células se contaron en un hematocitómetro.

Por otro lado se tomó una alícuota de 250 μ l de la suspensión celular y se fijaron con una mezcla de alcohol etílico al 50% y carbowax al 2 % (polietilen-glicol 50%). Posteriormente se hicieron frotis para teñir con colorantes de Wright-Giemsa y/o Hematoxilina y eosina, con lo cual se determinó la población celular diferencial de cada LBA. El conteo diferencial se realizó con un microscopio de luz convencional (CH30 OLYMPUS) usando el objetivo de 40 X. En términos generales se contaron de 300 a 500 células en diferentes campos seleccionados al azar.

III.- Inmunohistoquímica.

La localización celular del TGF- β 1 se analizó por inmunohistoquímica siguiendo el método reportado previamente para otras proteínas (58, 59). Se examinaron 6 biopsias de pulmón con NH así como de pulmón normal. Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4 % amortiguado en buffer de fosfatos 0.015 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4 (PBS) y se procesaron para obtener cortes de 5 μ m de espesor que fueron depositados en laminillas recubiertas con silano. Posteriormente, los tejidos se desparafinaron durante 25 minutos en xilol a temperatura ambiente, y se rehidrataron con etanol absoluto y después con etanol al 96% y 70% por 5 minutos en cada uno de ellos y finalmente en agua. Para

eliminar la peroxidasa endógena, los tejidos se incubaron por 30 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% preparado en metanol. Después de lavar dos veces durante 10 minutos con PBS se procedió a desenmascarar el antígeno incubando las muestras en buffer de citratos 10 mM pH 6, calentando en un horno de microondas por 5 min. Después de enfriar, las laminillas se lavaron con PBS y se incubaron en cámaras húmedas con suero normal de borrego a una dilución de 1:100 en PBS por 30 minutos. Después de bloquear con el suero, las muestras se incubaron durante toda la noche y a 4° C con un anticuerpo policlonal contra TGF- β 1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA.) a una concentración de 2 μ g/ml. Como controles negativos se utilizaron muestras en donde el anticuerpo primario fue remplazado con suero no inmune.

Posteriormente las preparaciones se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado y después con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Dako, Carpintería, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se revelaron con 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Biogenex, San Ramón CA.) en buffer de acetatos con 0.05% de H₂O₂ vigilándose la reacción y parándola con agua desionizada. Finalmente las preparaciones fueron contrateñidas con hematoxilina acuosa para revelar los núcleos y se montaron en un medio acuoso (Dako) dejando secar a 60° C.

IV.- Inmunoensayo.

El TGF- β 1 se cuantificó en el sobrenadante de los lavados bronquioalveolares por medio de la prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (60, 61). Para este ensayo 10 ml del sobrenadante de los LBA se concentraron 10X utilizando columnas de filtración con membrana de 10,000 MW (Centriprep, Millipore, Bedford, MA) que fueron centrifugadas a 4000 g durante aproximadamente 35 minutos y a 4° C.

La concentración de proteína total en las muestras concentradas se determinó mediante el método descrito por Bradford utilizando el ensayo para proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Lab. Inc, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La prueba de ELISA se realizó con un estuche comercial para TGF- β 1 (Quantikine R&D, Minneapolis, MN) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para activar el TGF- β 1 que se encontraba en forma latente, a las muestras (0.1 ml concentrado 10x) se les adiciono 0.1 ml de una solución de ácido acético 2.5 N y urea 10 M y se dejaron incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se neutralizaron con una solución de NaOH 2.7 N amortiguado con buffer HEPES 1M.

Para realizar el ELISA las muestras se diluyeron 4 veces con el calibrador contenido en el Kit. En cada uno de los pozos de placa se utilizaron 200 μ l de las muestras activadas y sus correspondientes muestras sin activar y se dejaron incubando en la placa toda la noche a 4° C. Posteriormente, las muestras se aspiraron y los pozos se lavaron con el buffer de lavado contenido en el kit y

entonces se adiciono el conjugado contra el TGF- β 1 y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de volver a lavar 3 veces, a cada pozo se le añadieron 200 μ l de la solución sustrato y se dejo incubando 40 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 μ l de ácido sulfúrico 1M y entonces se determino la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro fijado a una longitud de onda de 450 nm. Los valores de TGF- β 1 en cada una de las muestras fueron calculados interpolando los valores bajo una curva estándar generada con diluciones seriales de un TGF- β 1 recombinante incluido en el estuche. Estos ensayos fueron hechos por triplicado.

RESULTADOS

Población en estudio

Nuestro universo de estudio abarcó a 65 individuos que incluyeron a 30 pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad (grupo experimental) y 29 pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática y 6 sujetos sanos (grupo control). Los principales datos clínicos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

Características demográficas, clínicas, fisiológicas y de lavado bronquioalveolar de los grupos en estudio

| Variable | NH (n=30) | FPI (n=29) | Controles (n=6) |
|-------------------------|------------------|-------------------|------------------------|
| Edad | 41.2 \pm 12.0 | 64.5 \pm 7.4 | 36.0 \pm 7.8 |
| Género (M/F) | 2/28 | 24/5 | 4/1 |
| Hipocratismo digital | 8/30 | 22/29 | 0/5 |
| CVF % predicho | 56.3 \pm 22.3 | 64.2 \pm 15.3 | 106.4 \pm 17.5 |
| PaO ₂ mmHg** | 54.5 \pm 8.1 | 53.1 \pm 6.5 | |
| LBA Macrófagos % | 34.8 \pm 19.7 | 85.1 \pm 8.9 | 92.5 \pm 4.3 |
| LBA Linfocitos % | 63.8 \pm 19.6 | 10.5 \pm 7.6 | 7.3 \pm 4.4 |
| LBA Neutrófilos % | 0.6 \pm 1.2 | 3.2 \pm 3.1 | 0 |
| LBA Eosinófilos % | 0.5 \pm 0.9 | 1.4 \pm 1.9 | 0.2 \pm 0.4 |

** Presión arterial de oxígeno; valor normal a la altura de la ciudad de México: 67 \pm 3 mmHg.

CVF: capacidad vital forzada

LBA: lavado bronquioalveolar

Todos los pacientes mostraban un patrón funcional restrictivo con disminución de volúmenes, capacidades y datos de insuficiencia respiratoria con

hipoxemia de reposo que se exacerbaba con el ejercicio. Los pacientes con NH presentaban también alteraciones funcionales obstructivas que se reflejaron en una disminución del flujo espiratorio forzado en 1 segundo ($FEV_1 = 59 \pm 20.4\%$).

La mayor parte de los pacientes con NH fueron mujeres (28/30) con un rango de edad de 14 a 69 años (promedio de 41.1 años). En todos los casos se trató de pacientes con alveolitis inducida por antígeno aviario, el cual fue comprobado por la presencia de anticuerpos circulantes específicos.

El perfil celular de los lavados bronquioalveolares mostró en los pacientes con NH un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos con un rango que osciló de 32 a 94 % con un promedio 63.8 % (Tabla 1). Este incremento se relacionó con una disminución en el porcentaje de macrófagos (4 a 68 % con promedio de 34.8 %).

Veintidós de las 30 pacientes analizadas fueron biopsiadas para propósitos diagnósticos. En ellas se determinó el porcentaje de fibrosis e inflamación en cortes histológicos preparados de manera convencional y teñidos con hematoxilina y eosina, así como la tinción tricrómica de Masson para evaluar fibras de colágena. Los pacientes con NH mostraron diferentes grados de fibrosis con promedio de 25.2 ± 19.8 % de fibrosis.

El grupo control donde se incluyeron los casos normales y portadores de FPI se caracterizó por los siguientes hallazgos:

Se estudiaron 6 sujetos normales, 4 hombres y dos mujeres, con rango de edad de 21 a 42 años. A todos ellos se les realizó las pruebas de función respiratoria encontrándose en rangos normales. La celularidad en el lavado

bronquioalveolar demostró el predominio de macrófagos con un rango de 86 a 98 %. El porcentaje de linfocitos osciló entre 2 a 14 % con un promedio de 7.3 %, mientras que los leucocitos polimorfonucleares fueron prácticamente inexistentes.

El grupo de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática estuvo formado por 29 pacientes de los cuales 24 eran hombres y 5 mujeres con rango de edades desde los 44 a los 76 años y promedio de 64.5 años.

En el lavado bronquioalveolar se encontró un claro predominio de macrófagos con incremento de neutrófilos que es lo caracteriza a estos pacientes. Diecisiete pacientes fueron biopsiados y en ellos se corroboró un claro predominio de la fibrosis con un promedio de $65.3 \pm 16.6\%$.

Cuantificación de TGF- β 1 por ELISA.

La determinación del TGF- β 1 se realizó en lavados bronquioalveolares concentrados 10 veces por el método de ELISA (**Figura 1**). En los sujetos control, los niveles oscilaron entre 35 y 337 pg/ml con un promedio de 128.8 ± 126.8 pg/ml. Aunque los resultados en los dos grupos de pacientes fueron muy heterogéneos, en ambos grupos se observó un incremento significativo en las concentraciones de este mediador con promedios de 1458.5 ± 1177.0 en NH y de 1259.6 ± 1358.2 en FPI ($P < 0.05$ en comparación con controles).

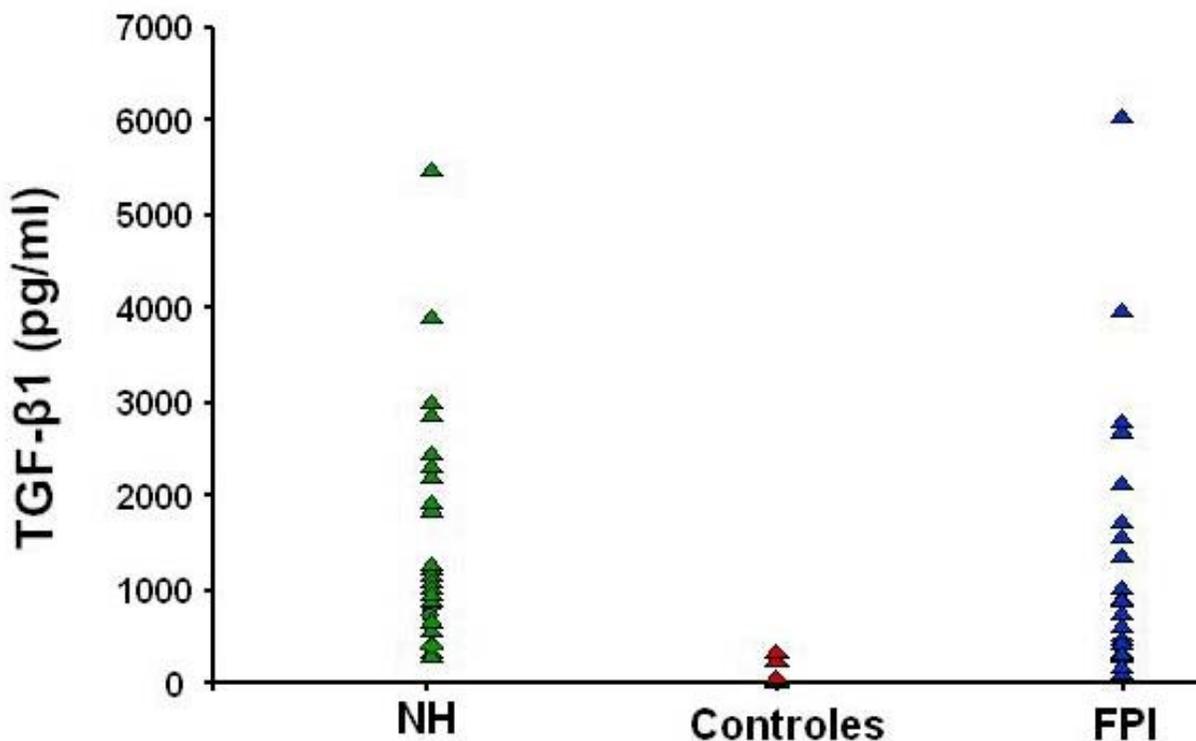


Figura 1: Detección del TGF- β 1 en líquido de lavado bronquioalveolar.

Los resultados ajustados por proteína se muestran en la **figura 2**. En los lavados bronquioalveolares de los sujetos normales se encontró el TGF- β 1 en promedio de 41.1 ± 37.5 , el cual se incrementó significativamente en ambos grupos de pacientes: 141.6 ± 85.6 en NH y 163.6 ± 105.1 en FPI ($P < 0.05$ con respecto a los controles).

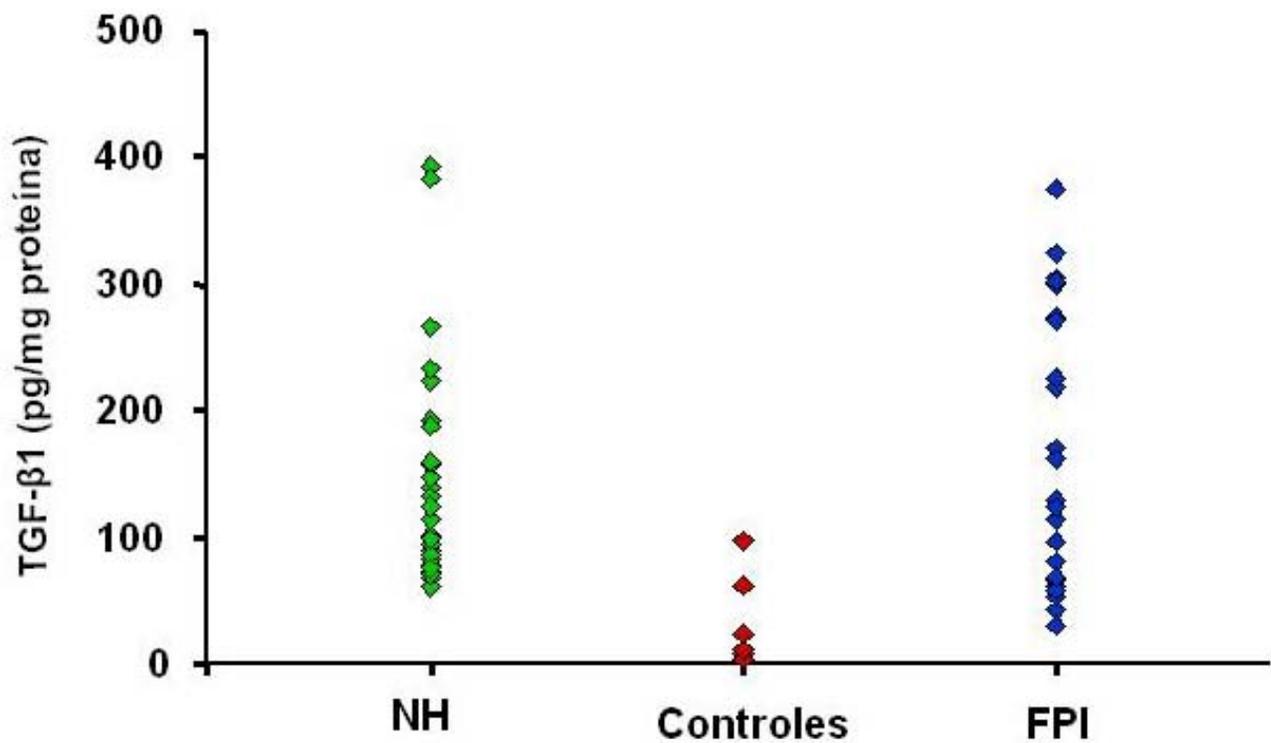


Figura 2: Detección del TGF- β 1 en líquido de lavado bronquioalveolar ajustada por concentración de proteínas

Immunolocalización del TGF- β 1 en pulmones de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad

La fuente celular del TGF- β 1 se exploró en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y pulmones control por inmunohistoquímica.

En los pulmones de pacientes con NH, una inmunoreacción positiva se observó en diferentes estirpes celulares incluyendo, células gigantes multinucleadas aisladas en los espacios alveolares o en el interior de los granulomas pobremente formados característicos de este padecimiento (**Figura 3**).

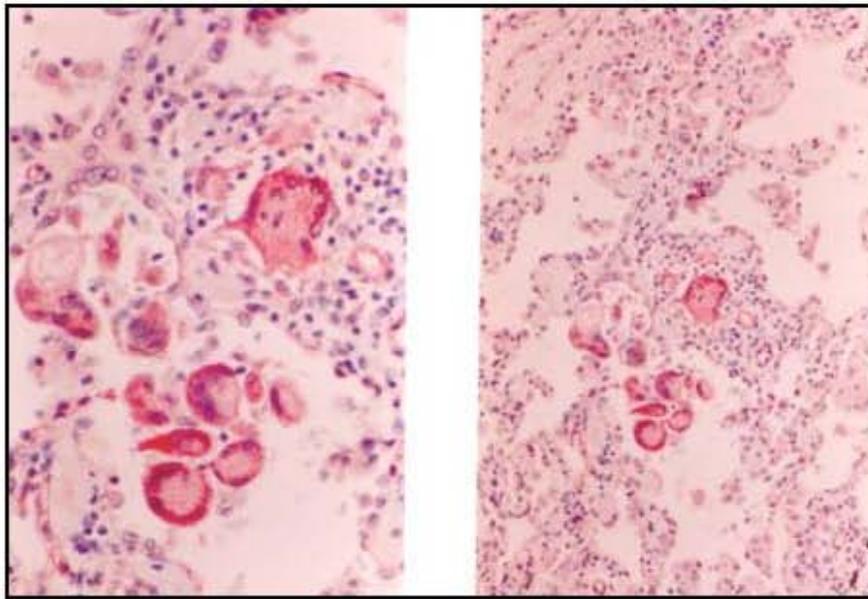


Figura 3: Inmunohistoquímica en pulmón con NH para detección del TGF- β 1. Se observa intensa positividad adyacente a la membrana citoplasmática en células gigantes multinucleadas localizadas en un granuloma intersticial y en espacio alveolar

Una intensa tinción intracitoplásmica se observó también en células del epitelio bronquiolar y en células reactivas del epitelio alveolar (**Figura 4**).

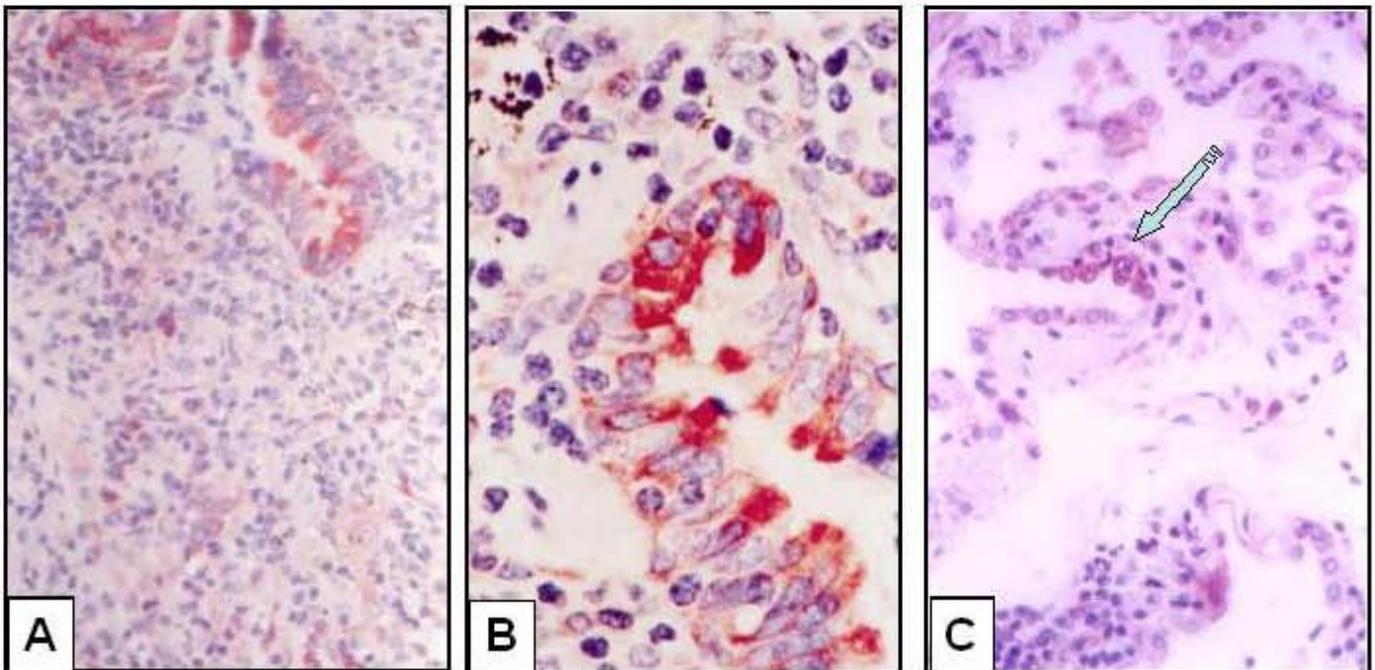


Figura 4: Inmunolocalización del TGF- β 1 en cortes de pulmón con NH. Se observa el factor en células epiteliales bronquiales (A y B) y en algunos neumocitos tipo 2 que se encuentran cuboidalizando el epitelio alveolar (C).

En el intersticio pulmonar que contenía vasos de pequeño calibre se detectó el anticuerpo en células de apariencia fusiforme que los revestían y que corresponden a células endoteliales (**Figura 5**).

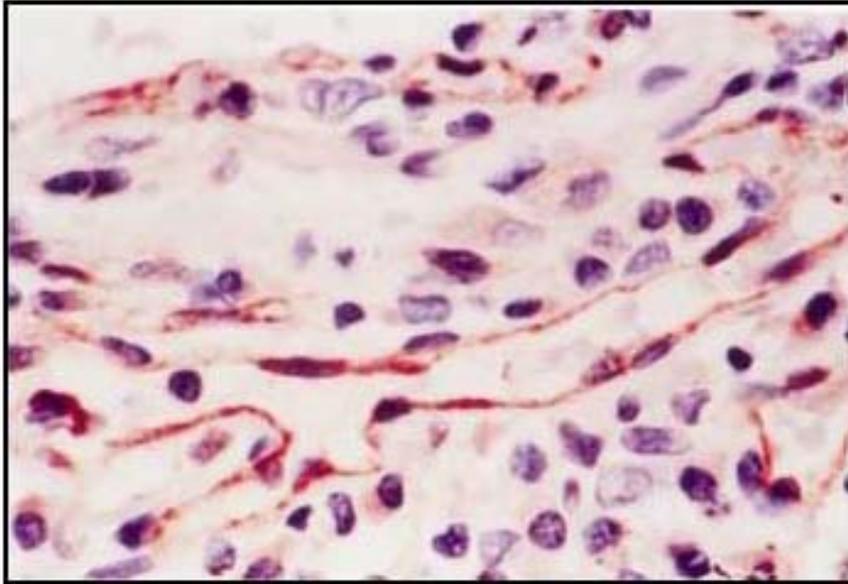


Figura 5: El TGF- β 1 se observó también en células endoteliales

Los pulmones normales fueron en general negativos, aunque ocasionalmente se observó una tenue tinción positiva en células del epitelio alveolar (**Figura 6**).

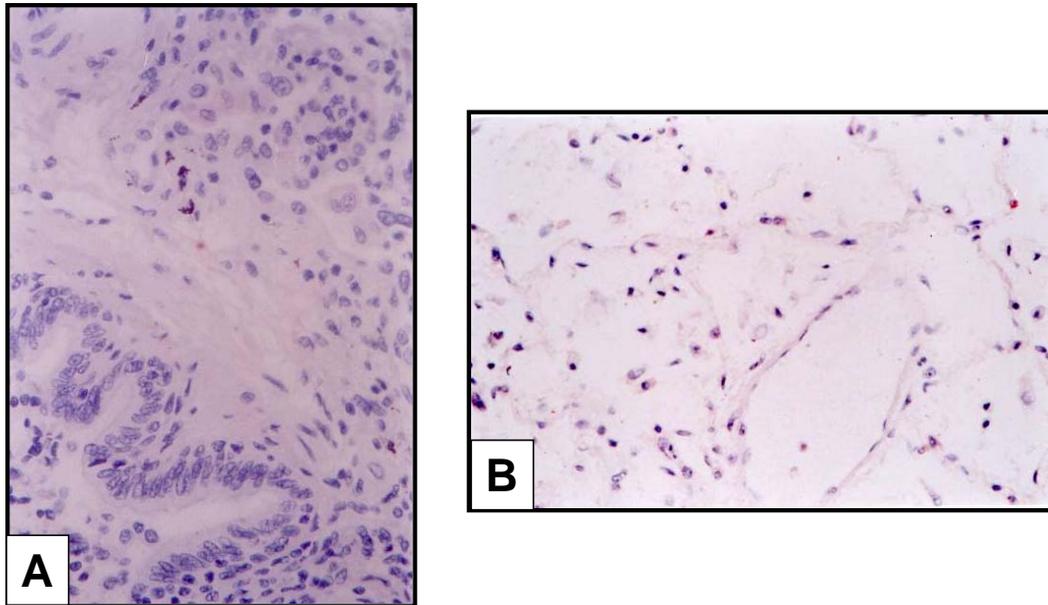


Figura 6. A: Control negativo, en el que se omitió el anticuerpo específico.
B: Tinción con TGF- β 1 en pulmón normal.

Los controles negativos (pulmones con NH en los que se omitió el anticuerpo específico) no mostraron ninguna reacción (**Figura 6**).

También se realizó inmunohistoquímica para localizar la presencia de miofibroblastos utilizando un anticuerpo que detecta alfa actina de músculo liso en cortes seriados de pulmón con NH (**Figura 7**).

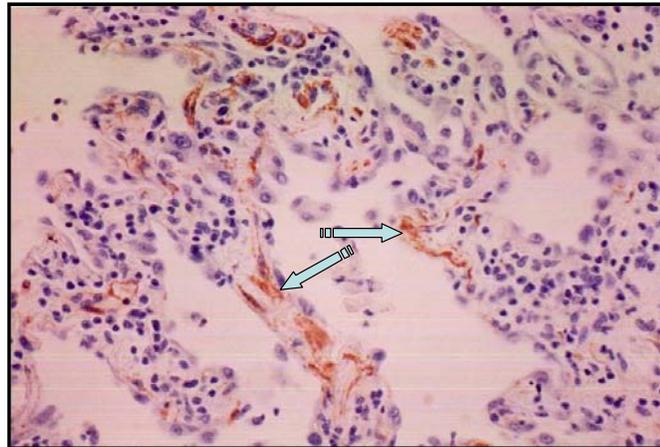


Figura 7: Cortes de pulmón con NH teñidos con anticuerpo alfa actina de músculo liso, muestra la presencia de miofibroblastos intersticiales en pacientes con NH crónica.

Además de la tinción esperada en músculo liso de vasos y vías aéreas, se apreciaron pequeños focos de células alargadas, fusiformes, que corresponden a miofibroblastos subepiteliales.

DISCUSIÓN

La neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad intersticial difusa que ocurre con frecuencia en México, en especial aquella provocada por la exposición a proteínas aviarias.

Los eventos patogénicos iniciales en el desarrollo de esta enfermedad involucran la activación de células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) relacionadas con la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (2, 62). Esto resulta en la unión específica de dichas moléculas con el receptor antigénico de células T CD4+, lo cual provoca la activación, proliferación y diferenciación de diversas clonas en subtipos de células T que en primera instancia contribuyen a la formación de anticuerpos por células B. En esta primera fase, si la concentración de antígenos es muy elevada, las reacciones que inician el daño pulmonar agudo se relacionan con la formación de complejos inmunes *in situ*, resultado de la interacción del antígeno inhalado con anticuerpos del tipo IgG presentes en el tejido pulmonar (63-65). Esta interacción desencadena dos eventos críticos: la activación de la cascada del complemento y la estimulación de macrófagos pulmonares intersticiales e intra-alveolares los que participan principalmente en la patogénesis de la forma aguda de la enfermedad.

Por el contrario, las formas subagudas y crónicas de la NH son mediadas por células T las cuales son las responsables de la inflamación intersticial linfocitaria y granulomatosa que caracteriza a estas fases (1-3).

Diversas quimiocinas y la expresión de moléculas de adhesión facilitan la llegada y migración transendotelial de linfocitos T en el tejido pulmonar inflamado.

En el intersticio y espacios alveolares la interacción del antígeno, células presentadoras y los linfocitos T CD4+ de memoria inician la activación, proliferación clonal y diferenciación de las células T CD4+ en múltiples subpoblaciones (66). Las citocinas proinflamatorias producidas por dichas poblaciones promueven la activación y reclutamiento de linfocitos adicionales lo que prolonga la respuesta inflamatoria. Si la exposición al antígeno continúa, estas reacciones inducen la formación de granulomas y posteriormente, si la alveolitis no se resuelve, los linfocitos T promueven que las células inflamatorias elaboren factores de crecimiento que estimulan la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena produciendo fibrosis intersticial (67). Los mecanismos involucrados en enlazar el proceso inflamatorio con la respuesta fibrosante no se conocen con precisión. Sin embargo, se ha sugerido que un cambio de respuesta inmune tipo Th1 (*T helper-1*) a Th2 puede desempeñar un papel (2, 68).

Sin embargo, la posible participación del TGF- β en la patogénesis de la NH humana no ha sido estudiada. Es importante señalar que este mediador multifuncional puede tener una función dual en la NH ya que por un lado es un factor inhibidor de la inflamación mientras que por el otro es un potente agente profibrótico.

En este estudio se examinaron los niveles pulmonares de TGF- β así como su localización celular en el parénquima respiratorio. Nuestros resultados mostraron que existe un incremento significativo de este mediador en el lavado bronquioalveolar de los pacientes con NH, a niveles comparables con la fibrosis

pulmonar idiopática, un padecimiento donde el TGF- β desempeña un papel fundamental (49, 69, 70). En consideración a que los pacientes con NH tienen niveles aumentados de proteínas totales en el líquido de revestimiento epitelial, este hallazgo fue confirmado tanto por volumen de líquido bronquioalveolar obtenido como ajustado por proteínas.

El análisis inmunohistoquímico corroboró el incremento en la expresión de la proteína en comparación con pulmones normales. De manera interesante, el TGF- β se encontró principalmente en células epiteliales bronquiolares, el principal sitio de impacto de los antígenos inhalados, donde se observó una intensa tinción intracitoplásmica. En términos generales se considera que las lesiones de la NH inician en los bronquiólos terminales y respiratorios, por esto y de manera característica la alveolitis en este padecimiento es fuertemente bronquiolocéntrica (71).

El TGF- β 1 también se expresó en células epiteliales alveolares tipo 2, que se encontraban cuboidalizando los espacios alveolares. Este hallazgo es muy interesante porque la activación de estas células desempeña un papel crítico en el desarrollo de fibrosis en otras enfermedades del parénquima pulmonar (49). De hecho, este mediador se expresa intensamente en las células epiteliales alveolares de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (72). En este padecimiento, uno de los principales efectos del TGF- β 1 es provocar la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (73, 74). Los miofibroblastos, que de manera característica expresan la alfa actina de músculo liso (α AML), son los principales responsables de

la secreción de moléculas de matriz extracelular que caracterizan a la fibrosis tisular (75, 76).

En este contexto, se analizó la expresión de α AML en los pulmones de pacientes con NH y de controles. En los pulmones normales, esta molécula se encontró solamente en células de músculo liso que forman parte de vasos y vías aéreas. En contraste, en los pulmones con NH también se observó en miofibroblastos intersticiales subepiteliales. Este resultado sugiere que la expresión de TGF- β 1 por células epiteliales del parénquima pulmonar podría contribuir al desarrollo de fibrosis en los casos de NH crónica estimulando la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Sin embargo, sería necesario hacer estudios de colocalización para determinar si existe correlación anatómica entre las células epiteliales que están produciendo TGF- β 1 y la presencia de miofibroblastos subepiteliales.

Finalmente, un hallazgo muy interesante de este trabajo fue la detección del TGF- β 1 en células gigantes multinucleadas que forman parte de las lesiones granulomatosas. Estas lesiones se observan fundamentalmente en pacientes con la forma subaguda, la cual es inflamatoria y habitualmente reversible. Aquí, la expresión de este mediador podría postularse como anti-inflamatoria.

La formación de las lesiones granulomatosas comienza con la activación de linfocitos tipo Th1 quienes sintetizan interleucina-2 e interferón-gamma los que estimulan a los macrófagos a transcribir y secretar grandes cantidades de factor de necrosis tumoral alfa e interleucina-1. Los macrófagos activados producen además

una amplia variedad de mediadores biológicos, entre otros el factor quimiotáctico y el factor activador de macrófagos los cuales atraen monocitos/macrófagos a las lesiones y los activan. Esto resulta en la formación de los granulomas de hipersensibilidad que consisten fundamentalmente de células epitelioides y células gigantes multinucleadas (77). Se podría postular que la síntesis de TGF- β 1 por estas últimas células podría ser un mecanismo que intenta controlar la respuesta inflamatoria, como se ha reportado en algunas enfermedades autoinmunes (43, 44). Así por ejemplo, se ha demostrado que cuando macrófagos peritoneales se cultivan con un antígeno y TGF- β , se induce la activación de células T reguladoras que median la tolerancia antígeno específica de largo tiempo y reducen la inflamación (43).

Sin embargo, la expresión de TGF- β 1 se ha descrito también en granulomas tuberculosos precediendo a la reacción fibrótica que acompaña a las lesiones cavitarias (78). En base a estos hallazgos se podría sugerir que la producción de TGF- β por células gigantes multinucleadas podría, en lugar de ejercer un efecto anti-inflamatorio, inducir una reacción fibrosante.

La respuesta a estas interrogantes podría contestarse en el futuro en modelos animales de NH a los que podría manipularse la respuesta del TGF- β a diferentes tiempos de la evolución del padecimiento.

CONCLUSIONES

1. El factor de crecimiento transformante beta se encuentra incrementado en el pulmón de los pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad.
2. Este mediador se expresa principalmente por las células epiteliales alveolares y bronquiolares, células endoteliales, macrófagos y células gigantes multinucleadas.
3. El factor de crecimiento transformante beta puede ser parcialmente responsable del desarrollo de fibrosis pulmonar en los pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad.

GLOSARIO

Alelos: formas alternas del mismo gen.

Anticuerpo monoclonal: anticuerpos producidos por una sola clona de células B.

Anticuerpo: proteína soluble sintetizada por las células B del sistema inmune que interactúa con los antígenos.

Antígeno: cualquier sustancia reconocida por un sistema inmunológico como extraña al organismo.

Citocina: proteínas secretadas por un tipo de célula inmunológica que induce una respuesta biológica en otro tipo de célula inmunológica. Actúan activando receptores tipo tirosinasa.

Colágenas: familia de glucoproteínas que forman parte de la matriz extracelular.

Colagenasas: enzimas de la familia de las metaloproteinasas de matriz que degradan a las moléculas de colágena.

Complejo mayor de Histocompatibilidad: región del cromosoma 6 que incluye genes que codifican un grupo de glucoproteínas de membrana denominada moléculas MHC.

Complemento: grupo de proteínas plasmáticas que actúan de manera conjunta para atacar formas extracelulares de patógenos. Se activa mediante tres distintas vías, generando productos con diversas actividades biológicas.

Dominio: regiones individuales de las inmunoglobulinas. Algunas se unen entre sí mediante una porción flexible de la cadena de polipéptidos que sirve como bisagra.

ELISA: prueba inmunoenzimática de adsorción ligada a una enzima

Espectrofotómetro: instrumento empleado para medir la cantidad de luz de una

longitud de onda específica absorbida por una solución la cual es proporcional a la concentración.

Estroma: tejido conectivo que sirve para sostener entre sus mallas los elementos celulares en un órgano ó glándula.

Factor de Crecimiento Transformante Beta: molécula de 391 aminoácidos secretada en forma latente por diversas células. Su fragmentación proteolítica genera en un péptido activo de 112 aminoácidos que se asocia formando homodímeros, el cual induce la proliferación de los fibroblastos.

Factor de crecimiento Derivado de Plaquetas: dímeros de 30 kd formado por cadenas A y β . Existe en 3 isoformas, se localiza en gránulos alfa de plaquetas, y es producido por macrófagos y células epiteliales entre otras.

Factor de Necrosis Tumoral: citocina producida por leucocitos en respuesta a agentes infecciosos. Dependiendo de su concentración sérica favorece la reacción inmunológica o bien induce efectos negativos como toxicidad a través de la apoptosis.

Fibronectina: proteína que participa en la adhesión celular a una serie de matrices. Glucoproteína de 450 kD formada por dos cadenas unidas por puentes disulfuro y que es elaborada por fibroblastos, monocitos, células endoteliales. Se une a la colágena, fibrina y los proteoglicanos.

Fibrosis Pulmonar Idiopática: enfermedad pulmonar de causa desconocida no asociada con factores predisponentes. Daño alveolar difuso organizado causado por la exacerbación de la respuesta inflamatoria.

Fosfatidil inositol 3 hidroxicinasasa PI (3)K: la molécula con dominio SH2 mejor estudiada. Los productos de la enzima participan como precursores para numerosos mensajeros celulares que contienen inositol e inducen diversas funciones en las células.

Fosforilación: adición de grupos fosfatos trivalentes por un compuesto orgánico.

Glucosaminglicanos: polímeros de disacáridos repetidos que contienen un residuo de sulfato.

Integrinas: familia de proteínas de la membrana compuestas por dos cadenas de polipéptidos, una cadena alfa y una cadena beta. Median la adhesión con componentes de la matriz extracelular o con otras células.

Interleucina 1: citocina liberada por macrófagos con actividad proinflamatoria, junto con el TNF- α favorecen la expresión de las moléculas de adhesión en diversas células. Favorece la activación de las células endoteliales lo que favorece la trans migración de los leucocitos.

Interleucina 2: citocina que estimula proliferación de células T por mecanismos autocrinos y paracrinos.

Interferón Gama: citocina con diversos efectos biológicos, potente activador de macrófagos que estimula la secreción de IL-12. Mediador extremadamente importante en la hipersensibilidad retardada.

Isoforma: formas alternas de una molécula.

Ligando: molécula que se enlaza a su receptor debido a que posee una estructura complementaria.

Linfocitos B: se originan de la bolsa de Fabricio en aves. Reconocen la estructura terciaria de los antígenos y requieren de los efectos ayudantes de las células T para madurar a células que sintetizan anticuerpos.

Linfocitos T: linfocitos dependientes del timo, responsables de la inmunidad mediada por células. Operan por contacto directo con otras células sintetizando y liberando mediadores denominados linfocinas. Son los responsables de la vigilancia contra tumores e infecciones, participan en el rechazo de injertos.

Macrófagos: células que están estrechamente relacionados con linfocitos T y B, procesan y presentan antígenos a los linfocitos T. Los macrófagos tienen una función de depuración de complejos inmunitarios, tienen además actividad bactericida y citotóxica. La liberación a los tejidos de sus enzimas hidrolíticas causa daño tisular.

Matriz extracelular: red organizada con materiales extracelulares presentes en la vecindad inmediata de la membrana plasmática. Puede tener participación integral en la determinación de la forma y las actividades de la célula.

Membrana basal: capa engrosada de la matriz extracelular de 50 a 200 nm aproximadamente, que da apoyo a las células.

Metaloproteinasa: enzima que degrada la matriz extracelular.

Neumonitis por Hipersensibilidad: enfermedad inflamatoria difusa que afecta el parénquima pulmonar como resultado de la activación permanente de la reacción inflamatoria.

Núcleo: organelo que contiene su material genético.

Patógeno: cualquier agente capaz de causar infección o enfermedad a una célula u organismo.

Proteoglicano: complejo de proteína y polisacárido que consiste en una molécula proteínica central a la cual se fijan cadenas de glucosaminglicanos. Debido a la naturaleza ácida de estos, los proteoglicanos son capaces de enlazar numerosos cationes que a su vez arrastran un gran número de moléculas de agua; como resultado, los proteoglicanos forman un gel poroso hidratado que actúa como material de empaque para resistir la compresión.

Receptor: molécula de superficie celular que al interactuar con su ligando genera señales intracelulares.

HLA: antígenos de los leucocitos humanos.

Smad: Proteínas que participan en la señalización intracelular inducida por la interacción del TGF- β con su receptor tipo I.

Vitronectina: glucoproteína integrante de matriz extracelular que media la adhesión a células, participa en reparación después de la inflamación.

BIBLIOGRAFIA

1. Selman M., Chapela R., et. al. **Hypersensitivity pneumonitis: Clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies.** *Seminars Resp Med* 14: 353-364, 1993.
2. Selman M. **Hypersensitivity Pneumonitis: A multifaceted deceiving disorder.** *Clin Chest Med* 25:531-547, 2004.
3. Fink JN. **Hypersensitivity Pneumonitis.** *Clin Chest Med.* 13:303-313, 1992.
4. Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, Cormier YF, Fan LL, Franks TJ, Kreiss K, Kunkel S, Lynch D, Quirce S, Rose C, Schleimer R, Schuyler MR, Selman M, Trout D, Yoshizawa Y. **Needs and Opportunities for Research in Hypersensitivity Pneumonitis.** *Am J Respir Crit Care Med.* 171:792-798, 2005.
5. Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. **Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro.** *Am J Respir Crit Care Med* 169:903-909, 2004.
6. Dangman KH, Storey E, Schenck P, Hodgson MJ. **Effects of cigarette smoking on diagnostic tests for work-related hypersensitivity pneumonitis: data from an outbreak of lung disease in metalworkers.** *Am J Ind Med* 45:455-467, 2004.
7. Patel AM, Ryu JH, Reed CE. **Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions.** *J Allergy Clin Immunol* 108:661-670, 2001.
8. Baldwin CI, Todd A, Bourke S, Allen A, Calvert JE. **Pigeon fancier's lung: effects of smoking on serum and salivary antibody responses to pigeon antigens.** *Clin Exp Immunol* 113:166-172, 1998.
9. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Sánchez M, Carrillo G, Pérez R, Sansores R, Gaxiola M, Selman M. **Mortality in Mexican patients with chronic pigeon**

breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia. Am Rev Respir Dis 148:49-53, 1993.

10. Vourlekis JS, Schwarz MI, Cherniack RM, Curran-Everett D, Cool CD, Tuder RM, King TE Jr. Brown KK. **The effect of pulmonary fibrosis on survival in patients with hypersensitivity pneumonitis.** Am J Med 116:662-668, 2004.

11. Welker L, Jorres RA, Costabel U, Magnussen H. **Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases.** Eur Respir J 24:1000-1006, 2004.

12. Ratjen F, Costabel U, Griese M, Paul K. **Bronchoalveolar lavage fluid findings in children with hypersensitivity pneumonitis.** Eur Respir J 21:144-148, 2003.

13. Murayama J, Yoshizawa Y, Ohtsuka M, Hasegawa S. **Lung fibrosis in hypersensitivity pneumonitis. Association with CD4+ but not CD8+ cell dominant alveolitis and insidious onset.** Chest 104:38-43, 1993.

14. Grubek-Jaworska H, Hoser G, Droszcz P, Chazan R. **CD4/CD8 lymphocytes in BALF during the efferent phase of lung delayed-type hypersensitivity reaction induced by single antigen inhalation.** Med Sci Monit 7:878-883, 2001.

15. Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, Wagenaar SS, Donckerwolck-Bogaert M, van den Bosch JM. **Differential diagnostic value of plasma cells in bronchoalveolar lavage fluid.** Chest 103:1720-1724, 1993.

16. Semenzato G, Trentin L, Zambello R, Agostini C, Cipriani A, Marcer G. **Different types of cytotoxic lymphocytes recovered from the lungs of patients with hypersensitivity pneumonitis.** Am Rev Resp Dis 137:70-74, 1988.

17. Pardo A, Smith KM, Abrams J, Coffman R, Bustos M, McClanahan TK, Grein J, Murphy EE, Zlotnik A, Selman M. **CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis.** J Leukoc Biol 70:610-616, 2001.
18. Suga M, Yamasaki H, Nakagawa K, Kohrogi H, Ando M. **Mechanisms accounting for granulomatous responses in hypersensitivity pneumonitis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis** 14:131-138, 1997.
19. Wahlstrom J, Berlin M, Lundgren R, Olerup O, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J. **Lung and blood T-cell receptor repertoire in extrinsic allergic alveolitis.** Eur Respir J 10:772-779, 1997.
20. Coleman A, Colby TV. **Histologic diagnosis of extrinsic allergic alveolitis.** Am J Surg Pathol 12:514-518, 1988.
21. Szakacs JG. **Pathologist's approach to diffuse lung disease.** Semin Ultrasound CT MR 23:275-287, 2002.
22. Cheung OY, Muhm JR, Helmers RA, Aubry MC, Tazelaar HD, Khor A, Leslie KO, Colby TV. **Surgical pathology of granulomatous interstitial pneumonia.** Ann Diagn Pathol 7:127-138, 2003.
23. Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, Usui Y, Inase N, Costabel U, Yoshizawa Y. **Chronic bird fancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias.** Thorax 60:665-671, 2005.
24. Barrios R, Selman M, Franco R, Chapela R, López JS, Fortoul TI. **Subpopulations of T cells in lung biopsies from patients with pigeon breeder's disease.** Lung 165:181-187, 1987.

25. Teschler H, Pohl WR, Thompson AB, Konietzko N, Mosher DF, Costabel U, Rennard SI. **Elevated levels of bronchoalveolar lavage vitronectin in hypersensitivity pneumonitis.** *Am Rev Respir Dis* 147: 332-337, 1993.
26. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. **Transforming growth factor-beta regulation of immune responses.** *Annu Rev Immunol.* 2005 Nov 8; [Epub ahead of print].
27. Lee KY, Bae SC. **TGF-beta-dependent cell growth arrest and apoptosis.** *J Biochem Mol Biol* 35:47-53, 2002.
28. Huang SS, Huang JS. **TGF-beta control of cell proliferation.** *J Cell Biochem* 2005 96:447-462, 2005.
29. Bartram U, Speer CP. **The role of transforming growth factor beta in lung development and disease.** *Chest* 125:754-765, 2004.
30. Govinden R, Bhoola KD. **Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta.** *Pharmacol Ther* 98:257-265, 2003.
31. Feng XH, Derynck R. **Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659-693, 2005.
32. Ten Dijke P, Hill CS. **New insights into TGF-beta-Smad signalling.** *Trends Biochem Sci* 29:265-273, 2004.
33. Javelaud D, Mauviel A. **Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis.** *Oncogene* 24:5742-5750, 2005.
34. Moustakas A, Heldin CH. **Non-Smad TGF-beta signals.** *J Cell Sci* 118(Pt 16):3573-3584, 2005.

- 35. Park SH. Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads.** J Biochem Mol Biol 38:9-16, 2005.
- 36. Jayaraman L, Massague J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway.** J Biol Chem 275:40710-40717, 2000.
- 37. Khalil N, Xu YD, O'connor R, Duronio V. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by TGF-beta 1 induced release of extracellular FGF-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK.** J Biol Chem. 2005 Oct 24; [Epub ahead of print].
- 38. Deaton RA, Su C, Valencia TG, Grant SR. Transforming growth factor-beta1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 MAPK.** J Biol Chem 280:31172-31181, 2005.
- 39. Docherty NG, O'sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'neill AJ, Fitzpatrick JM, Watson RW. TGF- β 1 induced EMT can occur independently of its pro-apoptotic effects and is aided by EGF receptor activation.** Am J Physiol Renal Physiol. 2005 Dec 20; [Epub ahead of print].
- 40. Sheppard D. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta.** Cancer Metastasis Rev 24:395-402, 2005.
- 41. Hytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latent. TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation.** Crit Rev Clin Lab Sci 41:233-264, 2004.
- 42. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliensky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue**

fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). J Exp Med 194:809-821, 2001.

43. Kosiewicz MM, Alard P. Tolerogenic antigen-presenting cells: regulation of the immune response by TGF-beta-treated antigen-presenting cells. Immunol Res 30:155-170, 2004.

44. Wahl SM, Swisher J, McCartney-Francis N, Chen W. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. J Leukoc Biol 76:15-24, 2004.

45. Mauviel A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. Methods Mol Med 117:69-80, 2005.

46. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 115:209-218, 2005.

47. Huang X, Zhu J, Yang Y. Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4+ CD25+ regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-beta. J Immunol 175:4283-4291, 2005.

48. Kornfeld C, Ploquin MJ, Pandrea I, Faye A, Onanga R, Apetrei C, Poaty-Mavoungou V, Rouquet P, Estaquier J, Mortara L, Desoutter JF, Butor C, Le Grand R, Roques P, Simon F, Barre-Sinoussi F, Diop OM, Muller-Trutwin MC. Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. J Clin Invest 115:1082-1091, 2005.

49. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med 134:136-151, 2001.

- 50.** Denis Michel, **Transforming growth factor β is generated in the course of hypersensitivity pneumonitis: contribution to collagen synthesis.** Am J Respir Cell Mol Biol 7:156-60, 1992.
- 51.** Kilinc G, Kolsuk EA. **The role of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung diseases.** Curr Opin Pulm Med 11:417-421, 2005.
- 52.** King TE Jr. **Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases.** Am J Respir Crit Care Med 172:268-279, 2005.
- 53.** Meyer KC. **The role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease.** Clin Chest Med 25:637-649, 2004.
- 54.** Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y; HP Study Group. **Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis.** Am J Respir Crit Care Med 168:952-958, 2003.
- 55.** Katzenstein ALA, Myers JL. **Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification.** Am J Respir Crit Care Med 157:1301-1315, 1998.
- 56.** American Thoracic Society. **Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement.** American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). Am J Respir Crit Care Med 161:646-664, 2000.
- 57.** Falfan-Valencia R, Camarena A, Juarez A, Becerril K, Montaña M, Cisneros J, Mendoza F, Granados J, Pardo A, Selman M. **Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis.** Hum Genet 118:235-244, 2005.

58. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. **Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis.** Am J Respir Crit Care Med. 2005 Sep 15; [Epub ahead of print].
59. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril K, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. **Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis.** PLoS Med. 2005 Sep;2(9):e251.
60. Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, Huning M, Stange R, Haas NP, Raschke M. **Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor-stimulated fracture healing.** Calcif Tissue Int 74:388-397, 2004.
61. Goumenos DS, Kalliakmani P, Tsakas S, Sotsiou F, Vlachojannis JG. **Urinary Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-b1) as a marker of response to immunosuppressive treatment in patients with crescentic nephritis.** BMC Nephrol. 2005 Dec 20;6(1):16 [Epub ahead of print].
62. Jacobs RL, Andrews CP, Coalson JJ. **Hypersensitivity pneumonitis: beyond classic occupational disease-changing concepts of diagnosis and management.** Ann Allergy Asthma Immunol 95:115-128, 2005.
63. Sandoval J, Bañales JL, Cortés J, Mendoza F, Selman M. **Detection of antibodies against avian antigens in bronchoalveolar lavage from patients with Pigeon Breeder's Disease: usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme immunotransfer blotting.** J. Clin. Lab. Anal. 4:81-85, 1990.

64. Mohr LC. **Hypersensitivity pneumonitis.** *Curr Opin Pulm Med* 10:401-411, 2004.
65. Ando M, Suga M, Kohrogi H. **A new look at hypersensitivity pneumonitis.** *Curr Opin Pulm Med* 5:299-304, 1999.
66. Chinen J, Shearer WT. **Basic and clinical immunology.** *J Allergy Clin Immunol* 116:411-418, 2005.
67. Selman M, Gonzalez G, Bravo M, Sullivan-Lopez J, Ramos C, Montañó M, Barquin N, Vadillo F. **Effect of lung T lymphocytes on fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis and extrinsic allergic alveolitis.** *Thorax* 45:451-455, 1990.
68. Wynn TA. **Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm.** *Nat Rev Immunol* 4:583-594, 2004.
69. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, Ortiz LA, Schoeb T, Siegal GP, Alexander CB, Pardo A, Selman M. **Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis.** *Am J Pathol* 167:365-379, 2005.
70. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. **TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis.** *J Immunol* 175:5390-5395, 2005.
71. Yousem SA, Dacic S. **Idiopathic bronchiolocentric interstitial pneumonia.** *Mod Pathol* 15:1148-1153, 2002.
72. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. **TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:131-138, 1996.

- 73.** Tomasek JJ, McRae J, Owens GK, Haaksma CJ. **Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CArG element and the transforming growth factor-beta1 control element.** Am J Pathol 166:1343-1351, 2005.
- 74.** Gabbiani G. **The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases.** J Pathol 200:500-503, 2003.
- 75.** Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A. **Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved.** Int J Biochem Cell Biol 38:135-151, 2006.
- 76.** Eddy AA. **Progression in chronic kidney disease.** Adv Chronic Kidney Dis 12:353-365, 2005.
- 77.** Suga M, Yamasaki H, Nakagawa K, Kohrogi H, Ando M. **Mechanisms accounting for granulomatous responses in hypersensitivity pneumonitis.** Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 14:131-138, 1997.
- 78.** Fujita J, Ohtsuki Y, Suemitsu I, Yamadori I, Shigeto E, Shiode M, Nishimura K, Hirayama T, Matsushima T, Ishida T. **Immunohistochemical distribution of epithelioid cell, myofibroblast, and transforming growth factor-beta1 in the granuloma caused by Mycobacterium avium intracellulare complex pulmonary infection.** Microbiol Immunol 46:67-74, 2002.