



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

SUSCEPTIBILIDAD ASOCIADA A
MICROQUIMERISMO EN
PACIENTES CON NEUMONITIS POR
HIPERSENSIBILIDAD Y FIBROSIS
PULMONAR IDIOPÁTICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARTHA LIVIER BUSTOS ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS
DR. MOISÉS SELMAN LAMA

MÉXICO, D. F.

JULIO 2007



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.



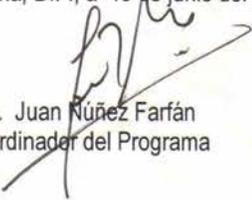
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de mayo del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **MARTHA LIVIER BUSTOS ESPINOZA** con número de cuenta **94243442**, con la tesis titulada: "**Susceptibilidad asociada a microquimerismo en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y fibrosis pulmonar idiopática**", bajo la dirección del **Dr. Moisés Selman Lama**.

Presidente:	Dr. Julio Granados Arreola
Vocal:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Vocal:	Dra. María Lourdes Segura Valdez
Secretario:	Dr. Moisés Selman Lama
Suplente:	Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Suplente:	Dra. Sara Frías Vázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de junio del 2007.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

∨ **A la Universidad Nacional Autónoma de México:**

Por su apoyo económico SDI.PTID.05.6.

Por la beca complementaria DGEP.

∨ **A CONACYT por la beca de doctorado.**

∨ **Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.**

∨ **A los miembros de mi Comité Tutorial:**

Dr. Julio Granados Arreola

Dr. Moisés Selman Lama

Dra. Sara Frias Vázquez

ÍNDICE

	Pag.
Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	
• Neumonitis por Hipersensibilidad	7
• Fibrosis Pulmonar Idiopática	10
• Microquimerismo y enfermedades humanas	13
2. Hipótesis	18
3. Objetivos	
• Objetivo General	18
• Objetivos Específicos	18
4. Diseño experimental	19
5. Material y métodos	
• Población en estudio	20
• Lavado bronquioloalveolar (LBA)	21
• Amplificación de la secuencia específica del cromosoma Y	21
• Preparación de la sonda TSPY	22
• Hibridación por Dot-Blot	23
• Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) en células de LBA	24
• Fenotipificación de las células microquiméricas del LBA	24
• Detección por FISH de células positivas para el cromosoma Y en tejido pulmonar	24
• Análisis de la FISH	25
• Análisis estadístico	25
6. Resultados	
• Características de las pacientes con NH y FPI	25
• Las pacientes con NH muestran un incremento en la frecuencia de microquimerismo masculino en sangre periférica	26
• Las pacientes con NH y microquimerismo presentan una disminución en la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO)	27
• Microquimerismo en células obtenidas en el LBA	28
• Fenotipificación de las células microquiméricas obtenidas de LBA	28
• Presencia de células masculinas en tejido pulmonar de pacientes con NH	29
7. Discusión	31
8. Conclusiones	36
9. Referencias	37
10. Artículo	44

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

		Pag.
1	Características histológicas de la NH	8
2	Características histológicas de la FPI	12
3	El embarazo como principal fuente de microquimerismo	13
4	Amplificación de la secuencia TSPY por PCR anidada	23
5	Detección por Dot-Blot de células positivas para el cromosoma Y en muestras de sangre periférica.	26
6	Detección por FISH de microquimerismo masculino en células de LBA de dos pacientes femeninos con NH.	28
7	Fenotipificación de las células microquiméricas	29
8	FISH en tejido pulmonar de tres pacientes con NH.	30
9	FISH con sondas específicas para los cromosomas X y Y en tejido pulmonar de dos pacientes femeninos con FPI.	31

TABLAS

1	Experimentos realizados para determinar la frecuencia y fenotipo de las células microquiméricas.	20
2	Características demográficas, clínicas, fisiológicas y de LBA en pacientes con NH	27

RESUMEN

Justificación: La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) es una inflamación linfocítica del parénquima pulmonar provocada por la exposición a una gran variedad de antígenos. La enfermedad ocurre solo en pocos individuos expuestos, lo que sugiere que algunos factores promotores son importantes para el desarrollo de la enfermedad. La NH inducida por antígeno aviario ocurre principalmente en mujeres, con una proporción de 9:1 mujeres por cada hombre y su frecuencia se incrementa después de los 40 años de edad. Por otro lado, algunas evidencias indican que el microquimerismo (bajos niveles circulantes de células derivadas de otro individuo) puede estar involucrado en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes, especialmente en aquellas que muestran un incremento en su incidencia en mujeres después de la edad reproductiva.

Objetivos: Evaluar la presencia de microquimerismo circulante y microquimerismo local en pacientes con NH versus controles.

Métodos: La presencia de microquimerismo masculino fue evaluada en 103 pacientes femeninos con NH, 30 pacientes femeninos con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y 43 mujeres sanas. Todas estas mujeres habían tenido previamente por lo menos un hijo varón, y no presentaban el antecedente de otras causas de microquimerismo como hermanos dicigóticos, transfusiones sanguíneas ni transplantes. La presencia de microquimerismo masculino se evaluó en sangre periférica por Dot-Blot utilizando una sonda específica para el cromosoma Y marcada con digoxigenina. En células de lavado bronquioloalveolar (LBA) se analizó por Dot-Blot e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) utilizando sondas específicas para los cromosomas Y y X y en tejido pulmonar el microquimerismo se evaluó por FISH.

Resultados: Se observó un incremento significativo de microquimerismo circulante en las pacientes con NH. Así, se encontraron células microquiméricas en la sangre del 33% de las pacientes con NH, 10% de las pacientes con FPI ($p=0.019$) y 16% de las mujeres sanas ($p=0.045$). Las pacientes con NH positivas para microquimerismo mostraron una reducción significativa de la DL_{CO} ($53.5 \pm 11.9\%$ versus $65.2 \pm 19.7\%$; $p=0.02$) así como una tendencia a presentar mayor porcentaje de linfocitos en el LBA ($64.3 \pm 16.7\%$ vs. $54.8 \pm 16.3\%$; $p=0.07$) en comparación con las pacientes con NH sin microquimerismo. En las células de LBA se encontró microquimerismo masculino por Dot-Blot y por FISH en 9 de los 14 casos de NH estudiados comparados con 2 de 10 casos de FPI ($p=0.047$). La separación por citometría de flujo de los diferentes tipos celulares del LBA reveló que las células microquiméricas estaban presentes en la población de macrófagos alveolares ($CD3^+CD14^+$), así como

en la de linfocitos T facilitadores (CD3⁺CD4⁺) y supresores/citotóxicos (CD3⁺CD8⁺). Las células microquiméricas masculinas también se encontraron por FISH en el tejido pulmonar afectado de 5 pacientes con NH.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran que las pacientes con neumonitis por hipersensibilidad presentan un incremento en la frecuencia de microquimerismo masculino y confirman la capacidad multilínea de las células microquiméricas lo que sugiere una asociación de éstas células con la enfermedad.

ABSTRACT

Rationale: Hypersensitivity Pneumonitis (HP) is a lymphocytic alveolitis provoked by exposure to a variety of antigens. However, the disease occurs in only a subset of exposed individuals, suggesting that additional factors may be involved. Microchimerism has been implicated in the pathogenesis of autoimmune diseases, especially in those showing increased incidence after childbearing age.

Objective: To evaluate the presence of circulating and local microchimeric cells in female patients with HP.

Methods: Male microchimerism was examined in 103 patients with HP, 30 with idiopathic pulmonary fibrosis and 43 healthy women. All of them had given birth to at least one son, with no twin siblings, blood transfusions or transplants. Microchimerism was examined by Dot-Blot hybridization in peripheral blood using a specific probe for the Y chromosome, and by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in bronchoalveolar lavage (LBA) cells and lungs using X and Y specific probes.

Results: Blood microchimerism was found in 33% of the HP patients in comparison with 10% in IPF (p=0.019) and 16% in healthy women (p=0.045). HP patients with microchimerism showed a significant reduction of DL_{CO} (53.5±11.9% versus 65.2±19.7%; p=0.02) compared with HP patients without microchimerism. In BAL cells, microchimerism was detected in 9 of 14 HP patients compared with 2 of 10 from IPF (p=0.047). Cell sorting revealed that microchimeric cells were either macrophages (CD3⁻CD14⁺), T helper lymphocytes (CD3⁺CD4⁺) or T cytotoxic lymphocytes (CD3⁺CD8⁺). Male microchimeric cells were also found in the 5 HP lungs examined by FISH.

Conclusions: Our findings demonstrate that HP patients exhibit increased frequency of fetal microchimerism, confirm the multilineage capacity of microchimeric cells and suggest that they may increase the severity of the disease.

1. INTRODUCCIÓN

Neumonitis por Hipersensibilidad.

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH), también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por la inhalación repetida de partículas orgánicas y que afecta a bronquiolos, alvéolos y espacio intersticial¹⁻³. La respuesta inmunológica está mediada principalmente por una reacción inflamatoria exagerada que parece ocurrir en un huésped susceptible, aunque los mecanismos de susceptibilidad no se conocen con precisión^{1,3,4}.

Agentes etiológicos de la NH

Se han descrito una gran variedad de partículas orgánicas menores a 3 µm de diámetro capaces de provocar NH y en general se trata de esporas de hongos como *Aspergillus fumigatus*, bacterias termofílicas como *Thermoactinomyces faeni* y proteínas de origen animal como el antígeno aviario. Dentro de las propiedades que pueden influir en la patogenicidad de estas partículas se encuentra la dificultad para ser digeridas por los macrófagos alveolares, su capacidad para activar la vía alternativa del complemento, su acción como adyuvantes y su actividad enzimática^{1,3,5,6}.

En México, la causa más frecuente de NH se relaciona con la exposición a antígenos aviarios, en especial provenientes de palomas, pichones, canarios y pericos australianos^{1,3,5,7,8}. Se ha sugerido que las inmunoglobulinas aviarias, en especial la IgA, así como la mucina intestinal podrían ser las principales proteínas sensibilizadoras^{9,10}.

Prevalencia de la NH provocada por la exposición a aves

Aunque no existen datos precisos acerca de la prevalencia de la NH inducida por antígeno aviario, esta enfermedad parece ser una de las causas más frecuentes de enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID). En un estudio colaborativo internacional se encontró que alrededor del 30% de 661 enfermos con EPID tenían NH y la mayoría de ellos era por exposición a aves¹¹. En México, la NH afecta predominantemente a mujeres con una proporción de 9:1 con respecto al sexo masculino. La mayoría de estas pacientes desarrollan la enfermedad después de la etapa reproductiva^{7,12} y aproximadamente en el 17% de ellas la enfermedad aparece entre 5 días y 6 meses después del puerperio¹³.

Características histopatológicas de la NH

La inflamación intersticial e intraalveolar es de predominio bronquiocéntrica y está compuesta fundamentalmente de linfocitos, células plasmáticas, monocitos y macrófagos, así como células gigantes multinucleadas y granulomas pobremente formados^{14,15}. En el intersticio la célula dominante es el linfocito, mientras que en los espacios alveolares la célula más abundante es el macrófago espumoso. La presencia de granulomas pequeños, poco compactos y pobremente diferenciados se considera un rasgo característico de la NH (**Figura 1**). En las formas crónicas se pueden observar diferentes grados de fibrosis, siendo este último el rasgo dominante en los casos muy avanzados de la enfermedad^{2,7,16,17}. Al respecto se ha reportado una correlación positiva entre el porcentaje de neutrófilos en el tejido afectado y el porcentaje de fibrosis pulmonar^{3,18}.

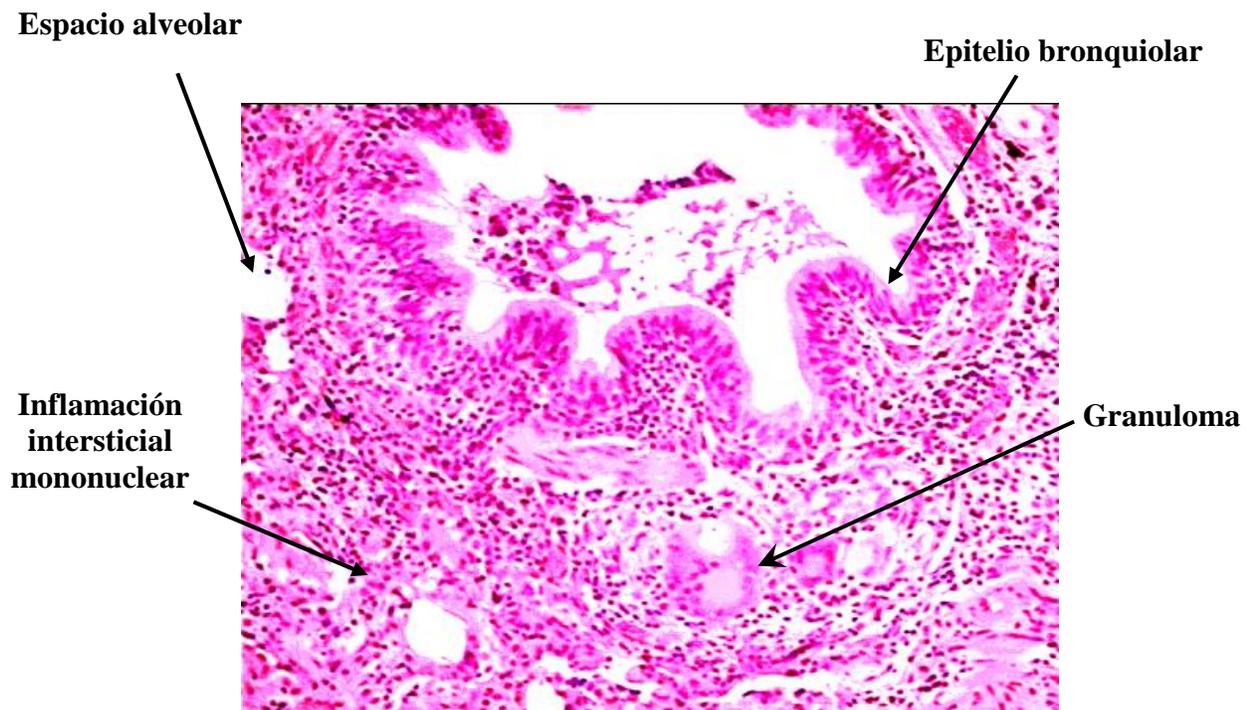


FIGURA 1. Características histológicas de la NH. Se muestra un corte de tejido teñido con hematoxilina-eosina, analizado por microscopía de luz a una magnificación original de 40X.

Lavado bronquioloalveolar (LBA)

El perfil celular del lavado bronquioloalveolar para los pacientes con NH se caracteriza por un aumento en el número absoluto y porcentual de los linfocitos T, con un predominio de la subpoblación CD8⁺ citotóxica/supresora y un desequilibrio en la relación CD4⁺/CD8⁺^{2,19}. Sin embargo, se ha

reportado que un aumento en la subpoblación CD4⁺ (facilitadora) se ha asociado a la progresión de la NH hacia fibrosis²⁰. También se ha descrito un aumento significativo en el porcentaje de células cebadas así como la presencia de células asesinas naturales NK^{2,3}. En números absolutos, los macrófagos alveolares se encuentran en niveles normales o elevados, aunque su porcentaje en relación a las otras células inflamatorias se aprecia muy disminuido dado el enorme incremento de los linfocitos^{3,6}. Se ha reportado que los macrófagos expresan altos niveles de HLA DQ y DP lo que sugiere que se encuentran muy activados en su función de células presentadoras de antígeno²¹.

Perfil de expresión génica de la NH

Recientemente se examinó el perfil de expresión génica en pulmones de pacientes con NH por microarreglos de oligonucleótidos. Se encontró que la NH, en comparación con la fibrosis pulmonar idiopática, se caracteriza por la sobreexpresión de genes asociados a inflamación (quimiocinas y sus receptores, interleucinas, etc), a la activación de los linfocitos T (*Src-like-adaptor 2*, factor de necrosis tumoral, receptores CD2, CD3-D, -E, y G y CD8) y en general de genes responsables de la activación de la respuesta inmune²².

Cuadro clínico de la NH

Las pacientes presentan un cuadro clínico caracterizado por disnea de esfuerzo progresiva, taquipnea, tos, hiporexia y baja de peso. La enfermedad puede progresar con la aparición de lesiones fibrosantes que destruyen el parénquima pulmonar y en este contexto, aproximadamente un tercio de los pacientes desarrollan una enfermedad progresiva, incapacitante, e irreversible, la cual provoca la muerte en el 29% de estos casos en un lapso de 5 años después del diagnóstico^{1,7,17,23}.

Patogénesis de la NH

La secuencia de los eventos que generan la NH no se conoce con precisión aunque la mayoría de las evidencias apoyan el concepto de que la forma aguda es provocada por una reacción de hipersensibilidad de tipo III caracterizada por la formación de complejos antígeno-anticuerpo, mientras que las formas subagudas y crónicas son inducidas por hipersensibilidad de tipo IV mediada por células, principalmente linfocitos T^{1,4,6}.

Sin embargo, al menos 2 preguntas no han podido ser contestadas: 1) ¿Por qué sólo un pequeño porcentaje de los individuos expuestos a la inhalación de estas partículas orgánicas desarrollan la

enfermedad? y 2) ¿Por qué algunos pacientes mejoran o curan mientras que otros progresan hacia la fibrosis, aún en ausencia del agente agresor?

Con el fin de contestar éstas y otras interrogantes, se ha propuesto una hipótesis que pretende crear una propuesta integral acerca de la patogénesis de la neumonitis por hipersensibilidad¹. De acuerdo a esta hipótesis, para que se desarrolle la inflamación pulmonar difusa secundaria a la exposición a partículas orgánicas, deben concurrir dos eventos de manera sincronizada: la inhalación del *factor inductor*, esto es, el antígeno causal y la presencia de uno o más *factores promotores*. La apropiada convergencia temporal de ambos factores provoca la alveolitis. De acuerdo a la hipótesis propuesta por Selman y colaboradores, aunque la inhalación del agente causal (*factor inductor*) es esencial, no es suficiente para generar por sí sola el proceso patológico en ausencia de *factor(es) promotor(es)*. Un posible factor promotor se relaciona con susceptibilidad genética y en este sentido, existen algunas evidencias de que en un subgrupo de pacientes la enfermedad puede estar asociada con algunos alelos de los antígenos leucocitarios humanos (HLA por sus siglas en inglés), como el HLA-DRB1*1305 y el HLA-DQB1*0501 en población mexicana²⁴. Otro factor que podría estar implicado es la infección viral provocada por ejemplo por el virus de la influenza A y el virus sincicial respiratorio^{25,26}. También se ha sugerido que el exponerse a insecticidas y desparasitantes o el vivir cerca de basureros en donde se forman tolveneras son factores de riesgo³. Por otra parte se ha propuesto al tabaquismo como un *factor protector* para el desarrollo de la NH puesto que se ha reportado que la enfermedad es significativamente menos frecuente en sujetos fumadores y aunque la razón de esta observación se desconoce se piensa que el humo del tabaco protege de la sensibilización al antígeno. Sin embargo también se ha reportado que en los pacientes con NH que fuman la enfermedad se vuelve crónica, lo que sugiere que fumar deteriora el desarrollo clínico del padecimiento^{2,3,27}.

Fibrosis Pulmonar Idiopática.

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una forma específica de neumonía intersticial fibrosante de causa desconocida, crónica, limitada a pulmón, progresiva y generalmente letal caracterizada por lesión y activación de células del epitelio alveolar, proliferación de fibroblastos y remodelación de la matriz extracelular, que resulta en una distorsión irreversible de la arquitectura pulmonar²⁸⁻³².

Prevalencia de la FPI

La enfermedad ocurre en 7 de cada 100 000 mujeres y 10 de cada 100 000 hombres, generalmente se presenta entre los 40 y 70 años de edad, con un pico máximo a los 60 años. Clínicamente se comporta de manera similar a la NH crónica con una sobrevida del 23% a los 5 años después del diagnóstico^{7,28,29,33}.

Agentes etiológicos

La FPI es de causa desconocida, sin embargo el reporte de casos familiares con fibrosis pulmonar y la asociación de la enfermedad con mutaciones en los genes de la transcriptasa reversa de la telomerasa y la telomerasa, entre otros, apuntan a que existen factores genéticos potenciales de riesgo³⁴⁻³⁶. De igual forma se han identificado factores ambientales que parecen incrementar el riesgo, principalmente el tabaquismo, aunque también hay reportes de exposición a polvos metálicos y de madera, agentes infecciosos como el virus Epstein–Barr, influenza y citomegalovirus³⁷.

Lavado bronquioloalveolar

En las células de LBA se ha descrito un incremento en el porcentaje de neutrófilos (5%) y eosinófilos (5%), siendo el dato más indicativo para FPI la neutrofilia²⁸.

Perfil de expresión genético

En cuanto al perfil de expresión genético que caracteriza a los pulmones de pacientes con FPI se ha reportado la sobreexpresión de genes específicos de células musculares que regulan la motilidad y contracción muscular y que desempeñan un papel en la remodelación y reorganización de tejido. También de genes que intervienen en la remodelación del tejido conjuntivo, en especial colágenas y metaloproteinasas de matriz, así como genes específicos de células epiteliales que controlan la adhesión, migración, diferenciación y proliferación de estas células²².

Características Histopatológicas

La fibrosis pulmonar idiopática se presenta en un patrón de parches caracterizado por zonas de arquitectura pulmonar normal, zonas de inflamación intersticial moderada, zonas de fibrosis intersticial caracterizadas por la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos y acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular, especialmente de las colágenas fibrilares y zonas con

cambios tipo panal de abeja que se describen como largos espacios aéreos delimitados por epitelio bronquiolar o neumocitos alveolares hiperplásicos que están separados por paredes engrosadas de colágena y cantidades variables de inflamación crónica, lo que da como resultado una distorsión irreversible de la arquitectura pulmonar^{28,29,38} (**Figura 2**).

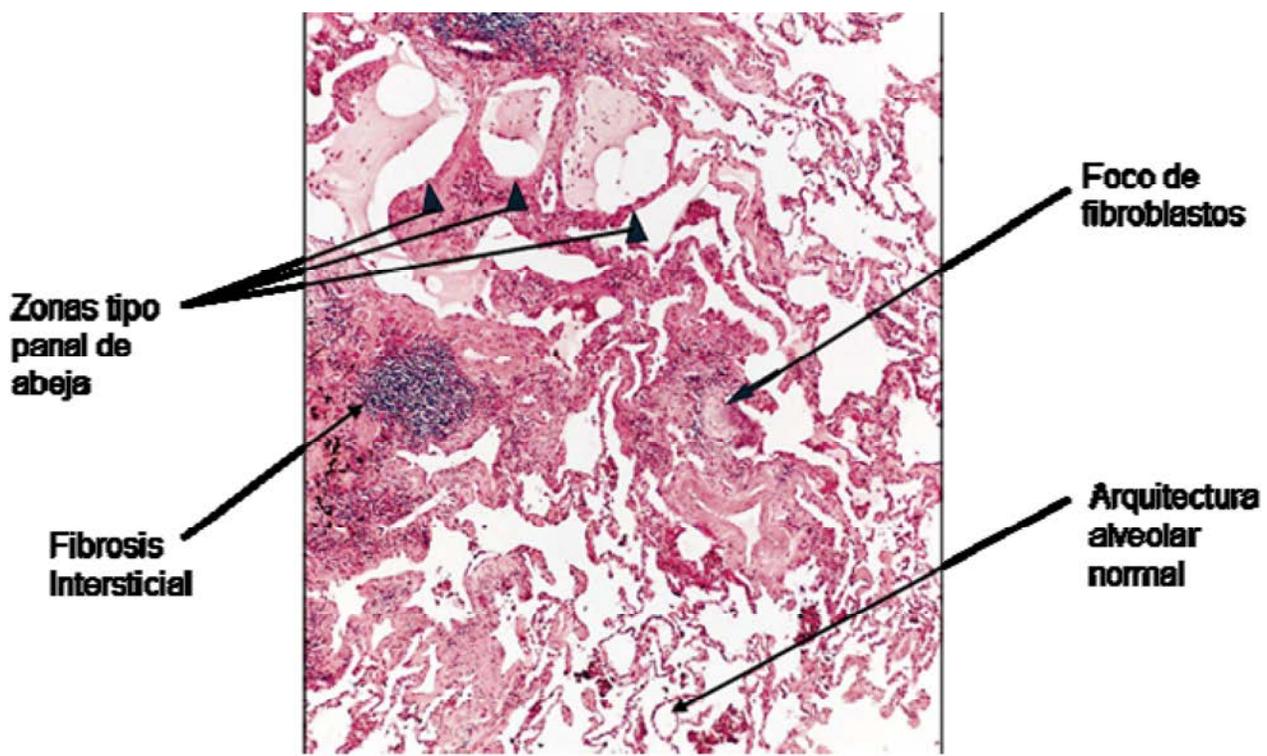


FIGURA 2. Características histológicas de la FPI. Se muestra un corte de tejido teñido con hematoxilina-eosina analizado por microscopia de luz a una magnificación original de 10X. Se observa el patrón en parche con zonas de arquitectura pulmonar normal, zonas de inflamación intersticial moderada, zonas de fibrosis intersticial y zonas con cambios tipo panal de abeja.

Patogénesis de la FPI

Durante mucho tiempo se consideró que la FPI se debía a un proceso inflamatorio crónico que no se resolvía y en consecuencia promovía la fibrogenesis. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que este padecimiento es provocado por múltiples microlesiones del epitelio alveolar el cual es seguido de una inadecuada reepitelización alveolar debida a una falla de los neumocitos tipo II para regenerar este epitelio. El epitelio alveolar dañado secreta numerosos mediadores profibrogénicos, en particular factores responsables de la migración y proliferación de células mesenquimatosas en los sitios de lesión, con la consecuente formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos que finalmente son los

responsables de la secreción exagerada de moléculas de matriz intersticial^{29,31}. Por otro lado, la FPI se acompaña con cierta frecuencia de algunos fenómenos autoinmunes como factor reumatoide o anticuerpos antinucleares circulantes, por lo que algunos autores han sugerido que podría tratarse de un padecimiento autoinmune³³.

Microquimerismo y enfermedades humanas

El termino microquimerismo se usa para indicar que un individuo presenta bajos niveles de células derivadas de otro individuo³⁹ y éste estado puede tener varias fuentes de origen siendo la principal el embarazo. En este contexto se ha observado que a partir de la sexta semana de gestación existe un tráfico bidireccional de células en la interfase materno-fetal, predominando del feto a la madre⁴⁰⁻⁴³ (**Figura 3**); cabe señalar que los embarazos no llevados a término también son una fuente importante de microquimerismo pues existen reportes que muestran que el número de células fetales antes y después del aborto aumentan de 19 a 1 500 células/ 16 mL de sangre materna^{44,45}. Otras fuentes de microquimerismo son la transferencia de células fetales entre gemelos dicigóticos⁴⁶ y la transfusión sanguínea⁴⁷.



FIGURA 3. El embarazo como principal fuente de microquimerismo. Se esquematiza el tráfico de células fetales (círculos azules) hacia la circulación sanguínea materna.

Fenotipo de las células microquiméricas

Las células fetales que entran en la circulación sanguínea de la madre son de origen predominantemente hematopoyético, incluyendo células troncales hematopoyéticas CD34⁺CD38⁻ o bien células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺CD38⁺ con capacidad para diferenciarse hacia varios linajes. En este sentido, se han encontrado en la madre células microquiméricas con fenotipo de linfocitos T, linfocitos B, NK y monocitos en porcentajes variables⁴⁸⁻⁵². Incluso se ha reportado, aunque en menor número, la presencia de trofoblastos, células troncales mesenquimatosas, células epiteliales y hepatocitos⁵³⁻⁵⁶.

Estudios funcionales de las células microquiméricas de origen fetal

A la fecha existen pocas investigaciones en torno a la función de las células microquiméricas. El estudio más importante al respecto describe el perfil de citocinas de los linfocitos T CD4⁺ microquiméricos aislados tanto de sangre como de piel de mujeres con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP) en el que se demuestra que éstas células eran capaces de activarse en presencia del HLA materno y producir niveles significativos de interleucina (IL)-4 en comparación con los niveles detectados en células microquiméricas de mujeres sanas. Debido a su producción de IL-4 estos linfocitos se caracterizaron como CD4⁺ Th2, cuyo fenotipo de manera interesante es uno de los principales involucrados en la patogénesis de la enfermedad injerto versus huésped^{57,58}.

Estudios funcionales de los linfocitos maternos T CD8⁺ HY específicos

La posibilidad de que los linfocitos T maternos reaccionen en contra de los antígenos expresados por las células masculinas fetales como el antígeno HY se ha explorado recientemente al encontrar linfocitos T maternos CD8⁺ HY específicos. Estos linfocitos fueron capaces de producir interferón gama después de ser estimulados con el antígeno HY y se encontraron entre el 37-50% de las mujeres que tenían un hijo varón o más de un hijo varón aumentando el porcentaje de linfocitos aloreactivos en ese orden, lo que sugiere que durante el embarazo la madre puede generar una respuesta inmune en contra de las células del hijo y que los linfocitos aloreactivos persisten por años después del parto conservando su actividad al menos *in vitro*. Estos hallazgos sugieren que la coexistencia de linfocitos T CD8⁺ aloreactivos y células fetales masculinas presenten un riesgo potencial inmunopatológico, aunque también es posible que *in vivo* se encuentre suprimida la reacción aloreactiva de los linfocitos maternos⁵⁹.

Microquimerismo como un posible factor de riesgo para desarrollar enfermedades autoinmunes

El paso de células fetales a la circulación sanguínea de la madre se puede considerar un fenómeno común^{60,61}, sin embargo la persistencia de éstas células durante muchos años después del parto ocurre entre el 4-50% de las mujeres sanas⁶²⁻⁶⁶ aunque el número de células microquiméricas en estas mujeres se encuentra por debajo del que presentan las mujeres con enfermedades autoinmunes^{63,64,67,68}. Estos hallazgos han sugerido una asociación del microquimerismo con el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes incluyendo el síndrome de Sjögren^{69,70}, lupus eritematoso sistémico⁷¹⁻⁷³ y principalmente la esclerosis sistémica progresiva (ESP)^{63,64,67}.

La hipótesis que propone que las células microquiméricas podrían estar involucradas en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes causando un daño parecido al que se encuentra en la enfermedad injerto versus huésped⁷⁴ está fundamentada en tres observaciones:

I) Se trata de enfermedades con predominio en el sexo femenino y que generalmente se desarrollan después de la etapa reproductiva de la mujer, lo que sugiere que algunos eventos relacionados con el embarazo podrían desempeñar un papel en el desarrollo de dichas enfermedades⁷⁵.

II) La similitud en el desarrollo de fibrosis en pulmón, esófago y piel que se presentan en algunas enfermedades autoinmunes, en especial la ESP, y la enfermedad injerto versus huésped que es causada por diferencias en el HLA entre las células del donador y del huésped⁷⁶.

III) La presencia de células microquiméricas fetales que por su origen portan genes del HLA paternos que difieren de los maternos^{65,67,77}.

A favor de esta hipótesis se han reportado varios estudios donde se evaluó la presencia de células microquiméricas masculinas en sangre circulante de mujeres con ESP y Lupus Eritematoso Sistémico, mediante la amplificación de secuencias específicas del cromosoma Y, revelando un incremento significativo en el número de células microquiméricas masculinas en éstas pacientes en comparación con mujeres sanas^{64,67,68}. Estos hallazgos han sido respaldados por otras investigaciones que encontraron un aumento significativo en el porcentaje de muestras positivas para células microquiméricas en pacientes en comparación al porcentaje en mujeres sanas^{51,63,72}.

Otra forma de evaluar la presencia de células microquiméricas es mediante la tipificación del HLA, este método tiene como ventaja que permite identificar células microquiméricas tanto femeninas como masculinas, además de que al tipificar el HLA de los hijos se puede establecer el origen de las células microquiméricas. En este contexto un estudio que tipificó el HLA-Cw reveló que el microquimerismo

de origen fetal estaba presente en un porcentaje significativamente mayor en las mujeres con ESP con respecto a los controles. De manera muy importante también se pudo analizar la presencia de microquimerismo de origen materno en muestras de pacientes masculinos con ESP encontrando que entre el 50-100% lo presentaban^{65,78}.

También mediante la tipificación del HLA se encontró que las mujeres que tenían hijos que portaban el HLA-DQA1*0501 tenían 13.5 veces más posibilidades de presentar células microquiméricas fetales⁷⁰, aunque este hallazgo no pudo ser corroborado por una investigación subsiguiente⁷⁹ por lo que el papel de este alelo continúa siendo controversial. En otro estudio que consistió en la tipificación del HLA-DR y HLA-DQ se encontró que las pacientes con ESP tenían un hijo homocigoto para el HLA-DRB1 con una frecuencia significativamente mayor a las mujeres control⁶⁷. Estas investigaciones sugieren que si las células microquiméricas procedentes de un hijo son homocigotas para algunos alelos del HLA, el sistema inmunológico de la madre no podría reconocer como extraño el HLA del hijo, sin embargo las células del hijo si podrían reconocer como extraño al HLA de madre si ésta es heterocigota para dicho alelo, lo que podría desencadenar una reacción autoinmune en contra de las células de la madre.

En cuanto a la localización de las células microquiméricas masculinas en los tejidos afectados de las pacientes con ESP, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjögren y Lupus Eritematoso Sistémico se han reportado varios estudios utilizando hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH por sus siglas en inglés) para la detección de secuencias específicas de los cromosomas X y Y. En estas investigaciones se han detectado células masculinas en las zonas de infiltración inflamatoria de éstas pacientes, no así en los tejidos controles o bien el tejido sano de las mismas pacientes^{63,69-71,80,81}.

Las células microquiméricas podrían participar en la regeneración tisular materna

Si bien hay estudios que parecen apoyar un posible papel de las células microquiméricas en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes, también existen estudios que muestran que el porcentaje de pacientes y mujeres sanas con microquimerismo no difiere significativamente^{66,73,82-86}.

Otro hallazgo importante que no parece apoyar el papel de las células microquiméricas en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes es la presencia de estas células en tejidos de mujeres afectados con enfermedades no relacionadas con autoinmunidad⁵⁶.

En este contexto, y dado que la posible implicación de las células microquiméricas en la patogénesis de algunas enfermedades es aún controversial, se ha desarrollado una hipótesis alternativa que propone

que las células fetales están asociadas más bien con una respuesta benéfica al daño tisular, que consistiría en la capacidad de estas células de generar células maduras de diferentes linajes en los órganos maternos afectados. Esta hipótesis sugiere que durante el embarazo la madre adquiere células fetales con capacidades de célula troncal que pueden influenciar la salud materna post-parto pero no promoviendo el desarrollo de enfermedades sino participando en la regeneración tisular^{56,87}.

A favor de esta hipótesis se han reportado estudios donde se analizaron por FISH biopsias de mujeres con cáncer, hepatitis no autoinmune, lupus eritematoso sistémico, ESP y bocio, encontrándose la presencia de células microquiméricas masculinas que expresaban citoqueratina en tejido epitelial normal en tiroides, cervix, intestino y vesícula; asimismo, se han observado células microquiméricas que expresaban el marcador CD45 propio de leucocitos en nódulos linfáticos y bazo⁵⁶, y células que expresaban hepar-1, un marcador específico para hepatocitos, en muestras de hígado con hepatitis no autoinmune⁵⁶, o bien en muestras de hepatitis C^{88,89}. Existen otras investigaciones que también sugieren una asociación de microquimerismo con enfermedades no autoinmunes como adenoma benigno de tiroides⁹⁰, las erupciones polimórficas del embarazo⁹¹ y la pitiriasis liquenoide⁹².

En resumen, la presencia de células microquiméricas tanto en circulación como en órganos de individuos afectados, deja dos posibilidades a explorar:

1. Estas células desempeñan un papel patogénico en el desarrollo de la enfermedad generando una reacción parecida a la que se desarrolla en la enfermedad injerto versus huésped.
2. Estas células llegan al órgano como resultado secundario de la enfermedad, migrando como células diferenciadas o/y células progenitoras a las áreas de daño tisular y participan en la regeneración del tejido.

2. HIPÓTESIS

El microquimerismo está asociado al desarrollo de Neumonitis por Hipersensibilidad.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la frecuencia de microquimerismo masculino en sangre circulante, lavado bronquioloalveolar y pulmón de pacientes femeninos con Neumonitis por Hipersensibilidad y compararla con la frecuencia encontrada en pacientes femeninos con Fibrosis Pulmonar Idiopática y mujeres sanas.

Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de células microquiméricas masculinas mediante la amplificación por PCR seguida de Dot-Blot de una secuencia específica del cromosoma Y, en células de sangre circulante de mujeres con NH y FPI, así como en controles sanos.
- Evaluar la presencia de células microquiméricas masculinas mediante la amplificación por PCR seguida de Dot-Blot de una secuencia específica del cromosoma Y, en células de lavado bronquioloalveolar de pacientes con NH y FPI.
- Evaluar la presencia de células con cromosoma Y por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en células de lavado bronquioloalveolar de pacientes con NH y FPI.
- Evaluar la presencia de células con cromosoma Y por FISH en biopsias pulmonares de pacientes con NH y FPI.
- Realizar la inmunofenotipificación de las células microquiméricas, separando las células de lavado bronquioloalveolar por citometría de flujo (FACSsort) en subpoblaciones de linfocitos T $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ y macrófagos alveolares $CD3^-CD14^+$ y someter cada subpoblación a FISH.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Puesto que las mujeres portan dos cromosomas sexuales X y los hombres portan un cromosoma sexual X y otro Y, la presencia del cromosoma Y en muestras de mujeres que han tenido por lo menos un hijo varón, que no tenían hermanos gemelos dicigóticos, ni habían recibido transfusiones sanguíneas, ni transplantes, nos permitió detectar células microquiméricas masculinas de origen presuntamente fetal.

Para determinar la frecuencia de células microquiméricas masculinas tanto en el ADN extraído de la sangre circulante como de las células de lavado bronquioloalveolar (LBA) fue necesario primero amplificar una región específica del cromosoma Y (TSPY) mediante una PCR anidada y luego detectar el amplificado con una sonda marcada con digoxigenina específica para dicha secuencia. Otra alternativa para identificar células positivas para el cromosoma Y fue haciendo una hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas específicas para los cromosomas X y Y (DXZ1 y DYZ1) ya sea en células en suspensión como las de LBA o bien en cortes de tejido de biopsias pulmonares incluidos en parafina, estos últimos fueron posteriormente contrateñidos con HE para evaluar el sitio de localización de las células microquiméricas dentro de la arquitectura pulmonar.

Finalmente para identificar el fenotipo de las células microquiméricas fue necesario separar las células de LBA en poblaciones de linfocitos T $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ o macrófagos $CD3^-CD14^+$ mediante *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACSort) utilizando un citómetro de flujo para posteriormente hibridar por FISH cada una de estas poblaciones con el fin de determinar en cual de ellas se detectaban células positivas para el cromosoma Y.

A continuación se muestra la **Tabla 1** donde se resumen los experimentos realizados para determinar la frecuencia de células microquiméricas y su fenotipo en las muestras de mujeres con NH, FPI y mujeres sanas.

TABLA 1. Experimentos realizados para determinar la frecuencia y fenotipo de las células microquímicas.

Tipo de muestra	Análisis	Concentración	Experimentos independientes	NH	FPI	Sanas
ADN obtenido de sangre circulante	Dot-Blot con sonda TSPY	1 µg	4	103	30	43
ADN obtenido de células de LBA	Dot-Blot con sonda TSPY	1 µg	4	14	10	0
Células de LBA	FISH (DXZ1,DYZ1)	15 000 núcleos	1	6	0	0
Células de LBA	FACSort FISH (DXZ1, DYZ1)	15 000 núcleos	1	7	0	0
<i>Biopsias de pulmón</i>	FISH (DXZ1, DYZ1) Tinción HE	Cortes de 5 µm de diámetro	1	5	3	0

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Población en estudio

Se estudiaron 176 mujeres que habían tenido previamente por lo menos un hijo varón, y que no tenían hermanos gemelos dicigóticos, ni habían recibido transfusiones sanguíneas ni transplantes; de este grupo, 43 fueron mujeres sanas [45.7 ± 9.1 años y 1.4 ± 0.7 hijos (promedio \pm DE)], 30 pacientes con FPI (60.7 ± 12 años y 3.1 ± 1.9 hijos) y 103 pacientes con NH subaguda o crónica (48.8 ± 12.8 años y 2.3 ± 1.1 hijos). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y cada participante otorgó su consentimiento informado.

El diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad se obtuvo como se ha descrito previamente^{7,18} con base en los siguientes criterios: a) exposición a aves antes del desarrollo de la enfermedad y presencia de anticuerpos positivos contra antígeno aviario en suero medido por ELISA; b) disnea de esfuerzo, con mejoría parcial después de evitar la exposición al antígeno aviario; c) hallazgos indicativos de enfermedad pulmonar intersticial como alteraciones clínicas, radiológicas y pruebas funcionales con valores disminuidos en la capacidad vital forzada (FVC), capacidad de difusión de monóxido de

carbono(DL_{CO}), saturación de oxígeno (StO₂), etc. y d) porcentaje de linfocitos mayor al 40% en el LBA.

Al 46% de las pacientes se les realizó biopsia pulmonar como parte del proceso diagnóstico y el análisis histológico mostró alteraciones características de NH, incluyendo inflamación intersticial difusa de predominio mononuclear, principalmente linfocitos, y presencia de células gigantes multinucleadas en los bronquiolos terminales y respiratorios, al igual que en las paredes alveolares. En el intersticio se observaron lesiones granulomatosas. El cultivo de la biopsia fue negativo para bacterias, micobacterias y hongos.

El diagnóstico de FPI se basó en estudios clínicos, funcionales, de lavado bronquioloalveolar y por tomografía computada de alta resolución; el diagnóstico fue corroborado por biopsia de pulmón en el 36% de las pacientes y se basó en hallazgos microscópicos típicos de neumonía intersticial usual^{28,93}.

Lavado bronquioloalveolar (LBA)

El LBA se obtuvo como se ha descrito previamente^{18,93-94}. El líquido recuperado se filtró a través de gasa estéril, se cuantificó, y se centrifugó a 1 500 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón celular fue resuspendido en suero fetal bovino con dimetil sulfoxido y congelado en nitrógeno líquido hasta su uso. Una alícuota fue usada para evaluar el número total de células, y otras fueron teñidas con hematoxilina-eosina o Giemsa y azul de toluidina para realizar el conteo diferencial de células.

Amplificación de la secuencia específica del cromosoma Y en células de sangre periférica y células de LBA

La extracción del ADN genómico se hizo a partir de 10 mL de sangre periférica y 2 x 10⁶ células de LBA utilizando el estuche BDtract™ Genomic ADN isolation kit (Maxim Biotech, San Francisco, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El microquimerismo masculino se evaluó realizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) anidada para amplificar una secuencia del cromosoma Y de 198 pares de bases (pb) que corresponde a un fragmento del gen que codifica para una proteína específica de testículo (TSPY por sus siglas en inglés)^{95,96}. Las condiciones de la PCR anidada e iniciadores fueron descritas previamente por Lo y colaboradores⁹⁷ y son las que se utilizaron en este trabajo exceptuando las siguientes modificaciones: se utilizó 1 µg de ADN genómico para la primera amplificación y 2 µl de la primera amplificación como templado de ADN para la segunda reacción de PCR. La mezcla de

reacción contenía 50 pmol de cada iniciador (primer) (Invitrogen life technologies, USA), 200 μ M dNTPs (Invitrogen life technologies, USA), 0.75 Mmol/L $MgCl_2$ (Roche Molecular Systems. San Diego, CA), 1X PCR buffer II (Roche Molecular Systems. San Diego, CA,) y 2.5 U/25 μ l AmpliTaq Gold (Roche Molecular Systems. San Diego, CA).

Con el fin de evitar posibles contaminaciones en la PCR se utilizaron áreas separadas para la extracción del ADN y la preparación de la PCR; también se emplearon puntas de pipeta con filtro (Eppendorf, Westbury, NY) y todos los experimentos fueron desarrollados por mujeres. En cada experimento se incluyó un control positivo que consistía en ADN masculino y dos controles negativos: uno de ellos llevaba todos los componentes de la PCR excepto el ADN y el otro consistió en una muestra de ADN de una mujer nulípara, la cual fue obtenida de la sangre circulante de una niña de 8 años que no tenía antecedentes de transfusiones ni hermanos gemelos.

Preparación de la sonda TSPY

Se empleó una muestra de ADN masculino para amplificar el fragmento del gen TSPY utilizando las mismas condiciones de la PCR descritas arriba; el producto de la amplificación fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa junto con el marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder (GibcoBRL, Grand Island, N.Y.) (**Figura 4**). Posteriormente, la banda que se correspondía con el tamaño esperado se cortó bajo la luz UV, se recuperó el ADN utilizando el estuche de extracción de ADN en gel (Millipore Corporation, Bedford, MA) se marcó con digoxigenina-11-dUTP, se cuantificó y detectó mediante el estuche de marcado y detección de DIG ADN (Roche Molecular Biochemical, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para confirmar la identidad de la sonda, una alícuota fue secuenciada como se ha descrito previamente⁹⁸ y la secuencia resultante se analizó con el programa GeneBank Search, obteniéndose un 98% de identidad con el gen TSPY humano. Algunos productos de amplificación del TSPY de pacientes con NH fueron también elegidos al azar y secuenciados verificándose que se trataba también del gen TSPY.

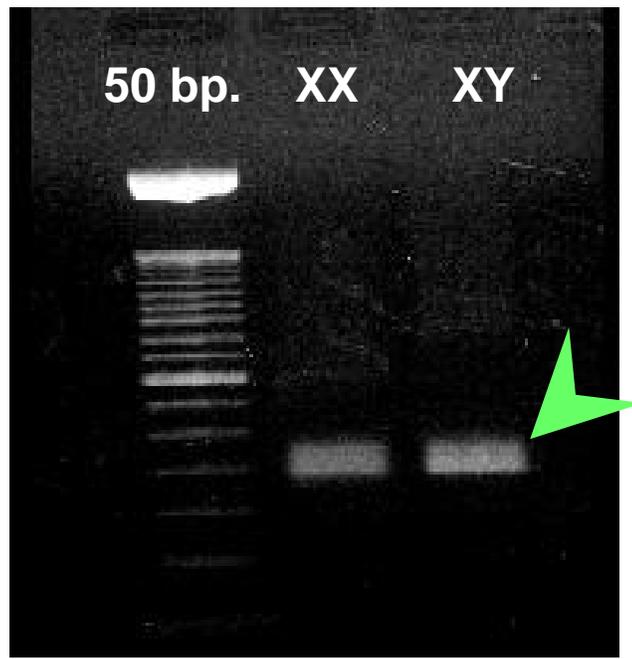


FIGURA 4. Amplificación de la secuencia TSPY por PCR anidada. Muestras de sangre periférica de un hombre (XY) y una mujer con NH (XX) que presentan el tamaño de banda esperado de 198 pb (punta de flecha) como lo indica el marcador de peso molecular de 50 pb.

Hibridación por Dot-Blot

Los productos de amplificación de la PCR anidada fueron desnaturalizados por calor y 2 μ l de cada muestra se fijaron en una membrana de nylon cargada positivamente (Amersham Pharmacia Biotech, UK) incubando la membrana a 120°C por 30 minutos. Posteriormente, la membrana fue hibridada a 54°C durante toda la noche con 30 ml de *DIG Easy Hyb* (Roche Molecular Biochemical, Alemania) que contenían 25 ng/mL de la sonda TSPY marcada con digoxigenina. La sonda fue revelada con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, contenido en el estuche de marcado y detección de DIG DNA (Roche Molecular Biochemical, Alemania).

Se realizaron cuatro experimentos independientes con cada una de las muestras de ADN y se consideraron positivos aquellos casos en los que la prueba dio positiva por lo menos dos veces, estableciéndose como negativas aquellas muestras cuya prueba fue negativa en los cuatro ensayos o positiva una sola vez y negativa en las otras tres pruebas. La sensibilidad de la prueba de Dot-Blot se determinó hibridando diluciones seriadas de ADN masculino en alícuotas de ADN femenino con la sonda para TSPY, pudiéndose detectar una célula masculina en 10 000 células femeninas.

Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en células de LBA

El microquimerismo masculino en las células de LBA fue evaluado por FISH utilizando la mezcla dual XY (Cytocell, Somerville Court, UK) que contenía una sonda específica del cromosoma X (DXZ1) marcada con fluoresceína (FITC) y una sonda específica para el cromosoma Y (DYZ1) marcada con rodamina. Las células de LBA se incubaron en una solución hipotónica de 0.05% de KCl, posteriormente se sometieron a una solución fijadora de ácido acético/metanol 1:3 y fueron fijadas en portaobjetos y desnaturalizadas en una solución de 70% formamida/2X SSC a 72°C por 2 minutos para luego ser hibridadas con las sondas XY siguiendo las condiciones de hibridación descritas por Frias y colaboradores⁹⁹. Posteriormente las muestras se contratiñeron con 0.125 µg/ml 4,6-diamino-2-phenyl-indole (DAPI) (Cytocell, Somerville Court, UK).

Fenotipificación de las células microquiméricas del LBA

Las células de LBA fueron separadas en poblaciones de linfocitos T facilitadores (CD3⁺CD4⁺), supresores/citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) y macrófagos alveolares (CD3⁻CD14⁺) mediante *Fluorescence Activated Cell Sorter (FACSort)* utilizando un citómetro de flujo (FACS Aria, Becton Dickinson, San Jose, CA). Las células de LBA se resuspendieron en medio RPMI incompleto para posteriormente centrifugarse por 10 minutos a 1 300 rpm. Se tomaron 2x10⁶ células y se resuspendieron en 50 µl de buffer de tinción (BD Pharmigen, EUA) y 20 µl del anticuerpo monoclonal acoplado al fluorocromo FITC-anti-CD3, APC-Cy7-anti-CD4, PerCp-anti-CD8 y PE-anti-CD14 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Las células con el anticuerpo se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente y el anticuerpo no unido se eliminó lavando las células con PBS, se recuperó el botón celular por centrifugación y se resuspendió en 300 µl de PBS. Una vez separadas las poblaciones celulares, se procedió a realizar una FISH con cada población bajo las condiciones descritas previamente.

Detección por FISH de células positivas para el cromosoma Y en tejido pulmonar

Se utilizaron cortes de 5 µm de espesor provenientes de biopsias de pulmón incluidos en parafina de cinco pacientes con NH y tres pacientes con FPI. La hibridación del tejido se realizó siguiendo el protocolo descrito por Jonson y colaboradores¹⁰⁰ excepto por el uso de la mezcla XY dual marcada (Cytocell, Somerville Court, UK) que se desnaturalizó junto con el tejido a 80°C por 10 minutos, incubando las muestras durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, los tejidos se lavaron en 40%

formamida/2X SSC a 42°C y se contratiñeron con 0.125 µg/ml de DAPI (Cytocell, Somerville Court, UK).

Análisis de la FISH

Los tejidos hibridados fueron analizados en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40 utilizando el filtro triple DAPI, FITC y rojo Texas, así como cada uno de los tres filtros individuales.

El corte de tejido y las células de LBA de un paciente masculino se utilizaron como controles positivos de hibridación. Las células que se consideraron como positivas para el cromosoma Y fueron aquellas que portaban 2 señales fluorescentes distintas dentro del núcleo, representando al cromosoma X (verde) y al cromosoma Y (rojo).

Para evaluar la localización de las células microquiméricas dentro de la arquitectura pulmonar típica de la enfermedad, los tejidos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y evaluados por microscopía de luz con el objetivo 100x en el microscopio Olympus BX40.

Análisis estadístico

Las variables de intervalo fueron analizadas usando la prueba de T de Student, mientras que la prueba exacta de Fisher se utilizó para analizar las variables categóricas. La corrección de Bonferroni se aplicó cuando se hicieron comparaciones múltiples. Se consideró un valor de p a dos colas menor de 0.05 como estadísticamente significativo. El análisis de regresión logística multivariable con la presencia de microquimerismo como variable dependiente y el diagnóstico y la edad como variables independientes se analizaron usando el programa SPSS versión 10.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

6. RESULTADOS

Características de las pacientes con NH y FPI

Todas las pacientes mostraron evidencia clínica, radiológica y funcional de enfermedad intersticial pulmonar, con disminución de los volúmenes pulmonares, así como hipoxemia en reposo que empeoraba durante el ejercicio. En el grupo de NH el conteo diferencial de células del LBA se caracterizó por una marcada linfocitosis mientras que en las pacientes con FPI la mayoría de las

células inflamatorias fueron macrófagos con un ligero aumento en el porcentaje de neutrófilos y eosinófilos.

Las pacientes con NH muestran un incremento en la frecuencia de microquimerismo masculino en sangre periférica

La secuencia TSPY fue amplificada de muestras de ADN de sangre periférica y los productos de amplificación fueron hibridados con la sonda específica para TSPY por Dot-Blot (**Figura 5**). La frecuencia de microquimerismo masculino fue significativamente mayor en el grupo de NH (34 de 103 pacientes [33%]) comparado con la frecuencia en el grupo de FPI (3 de 30 pacientes [10%]; $p = 0.019$, prueba exacta de Fisher) o en mujeres sanas (7 de 43 [16%]; $p = 0.045$, prueba exacta de Fisher).

El análisis de regresión logística multivariada descartó la influencia de la edad de las pacientes en la presencia de microquimerismo y corroboró que las pacientes con NH tenían una mayor probabilidad de presentar microquimerismo en comparación a las pacientes con FPI y mujeres sanas (OR: 3.1, 95% intervalo de confianza, 1.4–6.8).

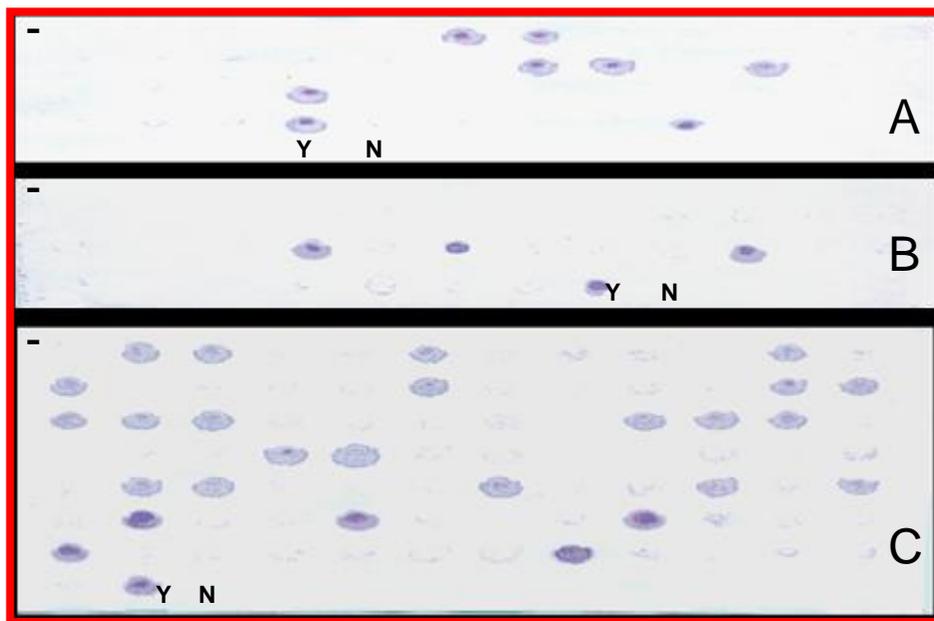


FIGURA 5. Detección por Dot-Blot de células positivas para el cromosoma Y en muestras de sangre periférica. Y: ADN de hombre. **N:** ADN de mujer nulípara. (-): control negativo sin ADN. Panel **A:** mujeres sanas. Panel **B:** mujeres con FPI y panel **C:** mujeres con NH.

Las pacientes con NH y microquimerismo presentan una disminución en la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DL_{CO}) comparada con las pacientes con NH sin microquimerismo

Las pacientes con NH se separaron en positivas y negativas para microquimerismo y se compararon los datos demográficos, las pruebas de función respiratoria, y el conteo diferencial de células en el LBA, cuyos datos se resumen en la Tabla 2. Los pacientes con NH positivos para microquimerismo mostraron una disminución en la capacidad de difusión de monóxido de carbono, una prueba que evalúa la capacidad de transferencia de gases a través de la membrana alveolo-capilar (DL_{CO}; 53.5±11.9% vs. 65.2±19.7%; p=0.02), así como una tendencia no significativa a presentar mayor porcentaje de linfocitos en el LBA (64.3±16.7% vs. 54.8±16.3%; p=0.07). No se encontraron diferencias en las otras variables analizadas.

TABLA 2 Características demográficas, clínicas, fisiológicas y de LBA en pacientes con NH.

Variable	Con Microquimerismo (n=34)	Sin Microquimerismo (n=69)	P*
Edad	48.3 ± 12.5	49.0 ± 13	NS
Meses de los síntomas antes del diagnóstico	28.1 ± 22.0	31.1 ± 23.6	NS
CVF % predicha	53.8 ± 15.4	55.5 ± 15.8	NS
PaO₂ mmHg**	50.8 ± 7.1	50.2 ± 11.0	NS
DL_{CO} %	53.5 ± 11.9	65.2 ± 19.7	0.02
StO₂ reposo	85.1 ± 6.6	84.6 ± 9.3	NS
StO₂ ejercicio	71.3 ± 9.8	74.2 ± 9.6	NS
LBA Macrofagos %	34.0 ± 17.5	44.0 ± 16.2	NS
LBA Linfocitos %	64.3±16.7	54.8±16.3	0.07
LBA Neutrófilos %	1.1 ± 2.0	1.2 ± 3.1	NS
LBA Eosinofilos %	0.8 ± 1.0	1.2 ± 2.4	NS

* P corregida por comparaciones múltiples. ** Valores normales a la altitud de la Ciudad de México: 67 ± 3 mmHg. CVF: capacidad vital forzada. DL_{CO}: capacidad de difusión de monóxido de carbono. StO₂: saturación de oxígeno. LBA: lavado bronquioloalveolar. NS: no significativo.

Microquimerismo en células obtenidas en el LBA

Con el fin de saber si las células microquiméricas se encontraban también en el pulmón de las pacientes, se amplificó la secuencia TSPY en el ADN obtenido de LBA de 14 pacientes con NH y 10 pacientes con FPI algunas de las cuales habían dado positivo en sangre periférica.

Los productos de amplificación fueron hibridados con la sonda TSPY y se encontró que 9 de 14 (64%) pacientes con NH fueron positivos para microquimerismo comparado con solo 2 de 10 (20%) pacientes con FPI ($p = 0.047$, prueba exacta de Fisher).

Para confirmar la presencia de células masculinas en las pacientes con NH se analizaron 15 000 núcleos por FISH en 6 muestras de LBA previamente analizadas por Dot-Blot y se corroboró que todas ellas tenían células masculinas microquiméricas y que la frecuencia de éstas variaba de 1/6 260 a 1/15 000 células femeninas (**Figura 6**).

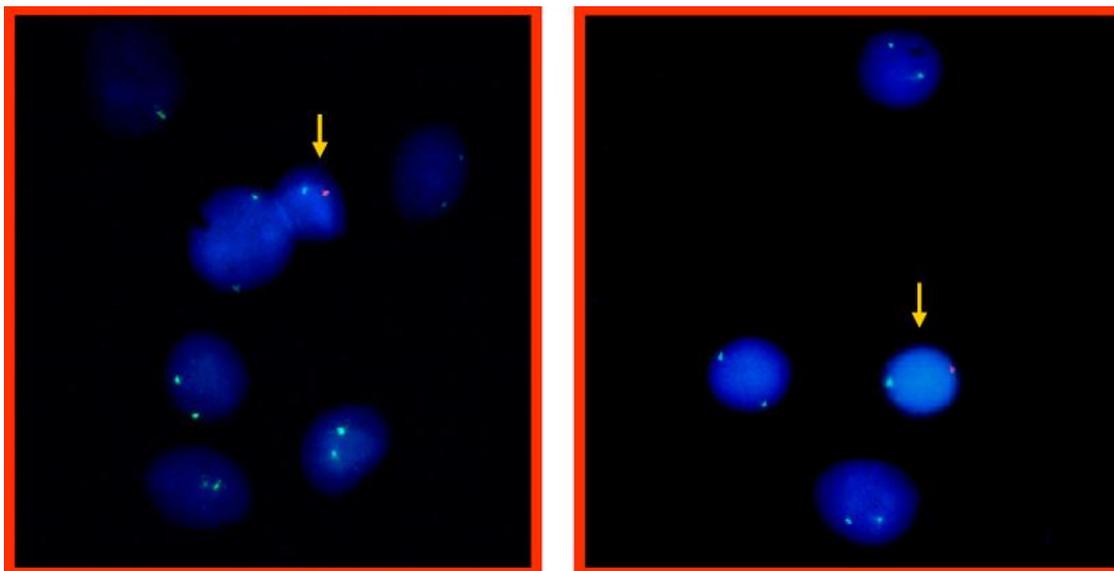


FIGURA 6. Detección por FISH de microquimerismo masculino en células de LBA de dos pacientes femeninos con NH. Las células masculinas (flecha) se identificaron por la presencia del cromosoma X (verde) y el cromosoma Y (rojo), el núcleo de la célula se encuentra contrateñido con DAPI (azul). La frecuencia de células masculinas variaba de paciente a paciente en un rango de 1/6 260 a 1/15 000 células femeninas.

Fenotipificación de las células microquiméricas obtenidas de LBA

Con el fin de caracterizar el fenotipo de las células microquiméricas en el LBA, se separaron por sorter en un citómetro de flujo las poblaciones celulares de linfocitos T $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ y macrófagos alveolares $CD3^-CD14^+$ en 7 pacientes con NH. Cada una de las poblaciones celulares fue

sometida a FISH con sondas específicas para los cromosomas X y Y encontrándose la presencia de células microquiméricas en 5 de los 7 casos (71%) en por lo menos una de las subpoblaciones (**Figura 7**). En tres casos las células microquiméricas fueron identificadas en más de un tipo celular (macrófagos y linfocitos T CD8⁺ o macrófagos y linfocitos T CD4⁺).

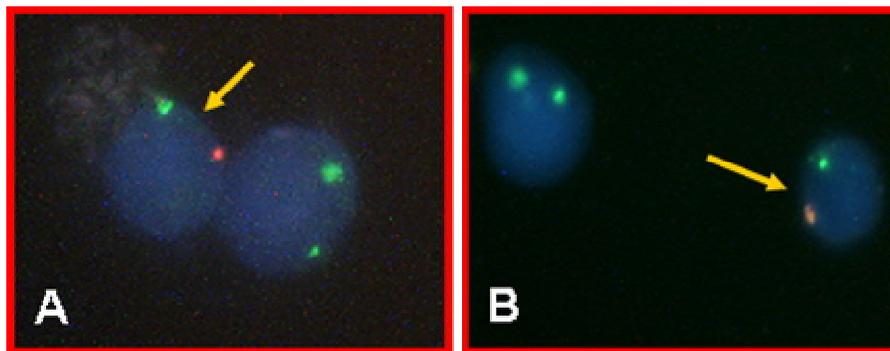


FIGURA 7. Fenotipificación de las células microquiméricas. Células de LBA de pacientes femeninos con NH separadas por citometría de flujo en poblaciones celulares de macrófagos (A) y linfocitos T CD4⁺ (B), donde se detectaron por FISH células microquiméricas masculinas (flechas) que se identifican por la presencia del cromosoma X (verde) y el cromosoma Y (rojo) dentro del núcleo que se encuentra contrateñido con DAPI (azul).

Presencia de células masculinas en tejido pulmonar de pacientes con NH

La presencia de microquimerismo masculino fue evaluado por FISH con sondas específicas para los cromosomas X y Y en laminillas con tejido incluido en parafina de 5 mujeres con NH que habían dado positivo en sangre. En todas estas muestras se detectaron células microquiméricas masculinas que fueron observadas como una sola célula rodeada de células femeninas, formando parte de la arquitectura del tejido afectado. Cuando estos mismos tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina-eosina con el fin de identificar la zona en la que se localizaban las células microquiméricas, éstas se observaron en áreas de inflamación intersticial y ocasionalmente formando parte del epitelio bronquiolar (**Figura 8**).

En contraste no se encontraron células microquiméricas masculinas en el tejido pulmonar de tres pacientes con FPI que también fueron examinados con la misma técnica (**Figura 9**).

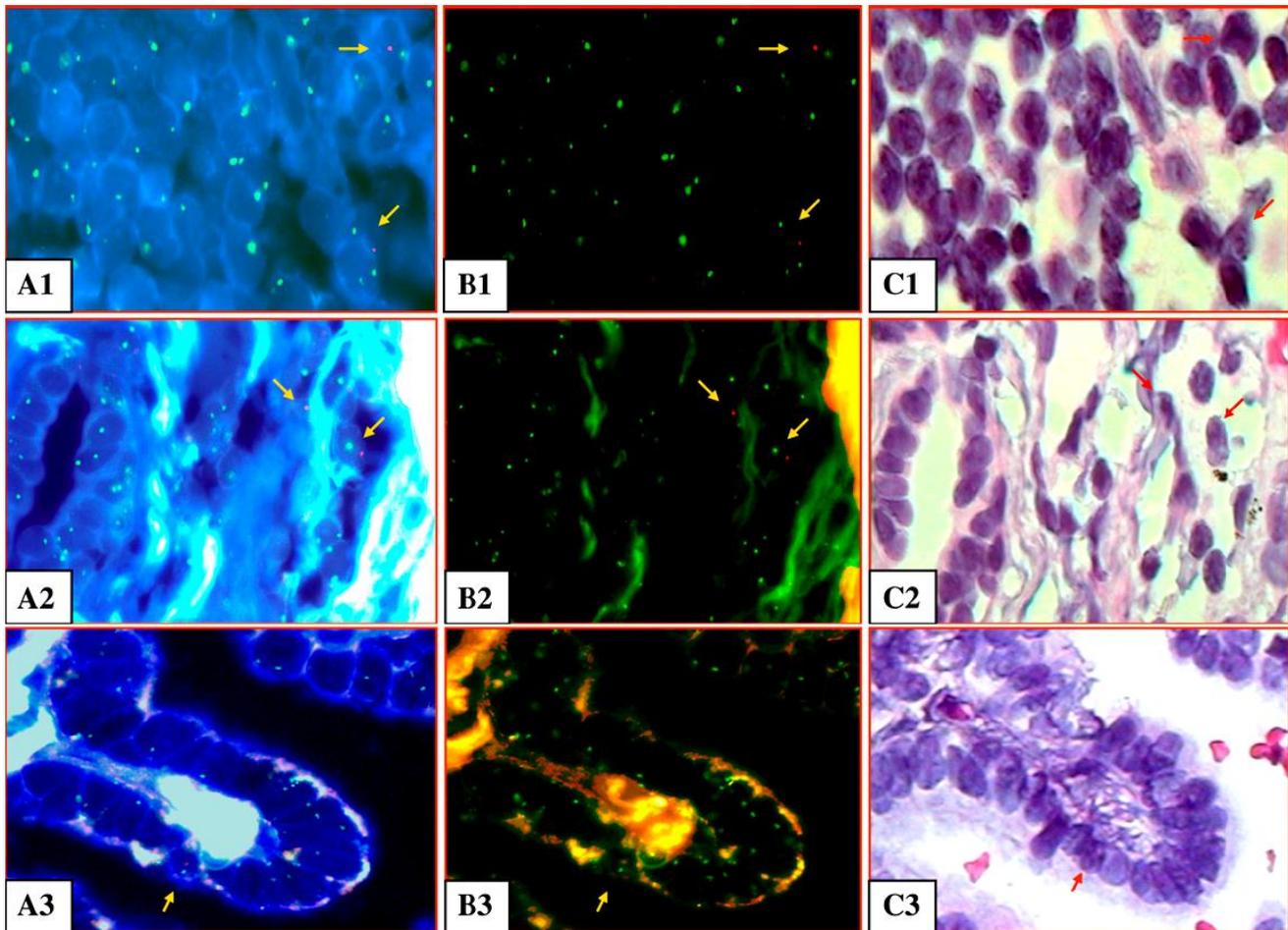


FIGURA 8. FISH en tejido pulmonar de tres pacientes con NH. Los tejidos se hibridaron con sondas específicas para los cromosomas X (verde) y Y (rojo) El núcleo de la célula se identifica por DAPI (azul). **A:** filtro triple DAPI-Fluoresceína-Rojo Texas. **B:** filtro doble Fluoresceína-Rojo Texas. **C:** microscopía de luz con los mismos tejidos pero teñidos con hematoxilina-eosina. Magnificación original 100x. Las flechas indican las células masculinas XY (señales roja y verde) rodeadas por células femeninas XX (señales verdes) en un infiltrado inflamatorio (**A1** y **A2**) y en un epitelio bronquiolar (**A3**).

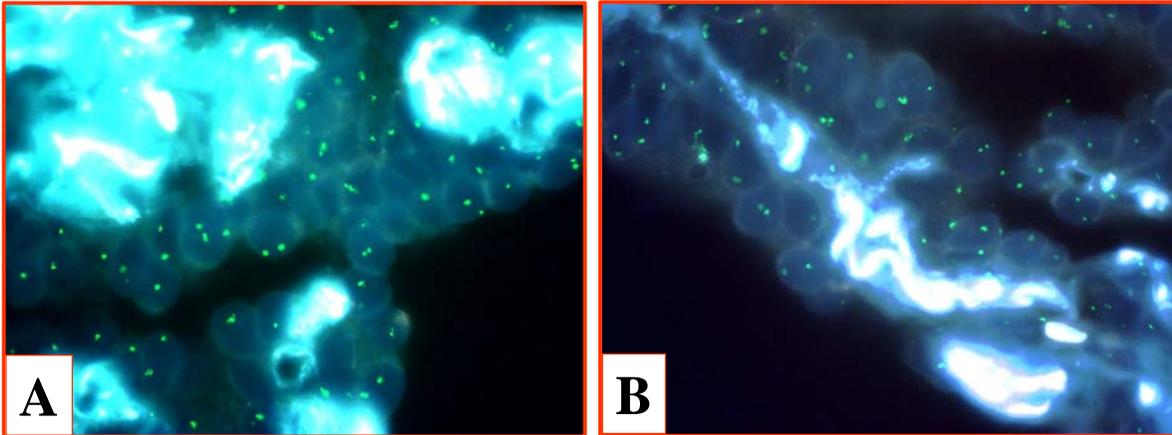


FIGURA 9. FISH con sondas específicas para los cromosomas X y Y en tejido pulmonar de dos pacientes femeninos con FPI. Solo se observan células femeninas que muestran dos cromosomas X (verde), el núcleo de la célula se encuentra contrateñido con DAPI (azul). **A y B:** Filtro triple DAPI-Fluoresceína-Rojo Texas. Magnificación original 100x.

7. DISCUSIÓN

Efectos biológicos del microquimerismo

Actualmente se reconoce que la placenta no es una barrera estricta que impida el tráfico celular lo que trae como consecuencia que durante el embarazo exista una activa transferencia de células entre la madre y el feto⁴¹. De hecho, la persistencia de estas células por muchos años después del parto es un fenómeno bien descrito^{51,62,78} y al parecer esta persistencia se debe a que el feto le transfiere a la madre células troncales, las cuales pueden alojarse en la médula ósea y perpetuarse o generar diferentes linajes celulares quizás por el resto de la vida de la madre¹⁰¹. Las consecuencias que éste fenómeno conlleva es que la madre porte células de origen fetal cuyo complemento genético presenta un set haploide diferente al de la madre.

Sin embargo, los efectos biológicos de la presencia permanente de estas células microquiméricas en la madre no se conocen con precisión. En este contexto, se han propuesto dos hipótesis; una de ellas se basa en la diferencia entre el HLA materno y el de las células microquiméricas y plantea que el microquimerismo podría estar implicado en la patogénesis de algunas enfermedades, principalmente autoinmunes, causando un daño parecido al que se desarrolla en la enfermedad injerto versus

huésped⁷⁴. Sin embargo, debido al reducido número de células microquiméricas se ha sugerido que otros mecanismos de daño tisular tendrían que desencadenarse, como por ejemplo el desarrollo de una reacción inmune exagerada debido a la presentación indirecta de antígenos propios por parte de las células microquiméricas.

La otra hipótesis, que se basa en los hallazgos de que las células fetales microquiméricas tienen capacidad multilinaje, propone que las células microquiméricas están asociadas con una favorable respuesta materna al daño tisular; esto es, que frente a una lesión estas células desarrollan su capacidad para generar células maduras de diferentes linajes en los órganos maternos afectados contribuyendo así a la apropiada regeneración del tejido^{56, 87}.

En la búsqueda de factores promotores de la neumonitis por hipersensibilidad

La NH inducida por la exposición a proteínas de aves ocurre solo en un pequeño porcentaje de las personas que inhalan antígenos aviarios. Estas observaciones sugieren que la NH es probablemente el resultado de varios factores que convergen en el individuo expuesto a la inhalación de partículas orgánicas. Algunos estudios indican que una susceptibilidad genética asociada al sistema HLA, o a la presencia de determinados polimorfismos del factor de necrosis tumoral podrían favorecer el desarrollo de la enfermedad^{2, 24}. Otras investigaciones sugieren que infecciones virales, o la exposición a un segundo agente ambiental podrían desempeñar un papel promotor^{25,26}. Sin embargo, aún no se ha identificado un cofactor que claramente promueva el desarrollo de la enfermedad, por lo que se desconoce la manera en que la exposición al antígeno, el ambiente y la genética del individuo interactúan para inducir la NH. De manera interesante, esta enfermedad predomina en el sexo femenino, y se manifiesta frecuentemente después de la edad reproductiva^{7,12}.

Microquimerismo y neumonitis por hipersensibilidad

Es precisamente en busca de posibles factores promotores para el desarrollo de la NH que se decidió estudiar la presencia de microquimerismo en mujeres con esta enfermedad indagando inicialmente la presencia de células masculinas en la sangre circulante. Nuestros resultados mostraron que aproximadamente una tercera parte de las pacientes con NH estudiadas portaban células masculinas circulantes, y que esta frecuencia era significativamente mayor que la encontrada en pacientes femeninos con FPI y en mujeres sanas. Tomando en consideración que todas las mujeres estudiadas habían tenido por lo menos un hijo varón y que habíamos excluido del estudio otras fuentes

potenciales de microquimerismo, suponemos que el origen de las células masculinas detectadas es fetal.

La edad y el número de hijos no influyen en la frecuencia de microquimerismo

Debido a que las pacientes con FPI eran las que presentaban el menor porcentaje de microquimerismo y tenían en promedio 10 años más que las pacientes con NH y las mujeres sanas, se examinó el efecto de la edad en la presencia de microquimerismo. Nuestros resultados demostraron que las diferencias en la frecuencia de microquimerismo no están influenciadas por la edad de las pacientes. Asimismo, el análisis de la posible influencia del número de hijos varones en la frecuencia de microquimerismo masculino no mostró ningún efecto, siendo las pacientes con FPI las que presentaban el mayor número de hijos varones y la menor frecuencia de microquimerismo. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en otros padecimientos en los cuales también se ha demostrado que no existe correlación entre la frecuencia de microquimerismo masculino y el número de hijos varones o el lapso de tiempo desde que se tuvo el último hijo^{89,102}.

Las pacientes con neumonitis por hipersensibilidad con microquimerismo muestran un mayor deterioro funcional respiratorio que aquellas sin microquimerismo

Al separar a las pacientes con NH positivas y negativas para microquimerismo se encontró que las primeras presentaban una mayor reducción de la capacidad de difusión de monóxido de carbono DL_{CO} así como una tendencia a presentar un mayor porcentaje de linfocitos T en las células de LBA, sugiriendo una asociación entre el microquimerismo y la respuesta inflamatoria o con un peor curso clínico de la enfermedad. Estos hallazgos parecen apoyar la hipótesis que propone que las células microquiméricas pueden estar implicadas en la patogénesis de esta enfermedad.

Neumonitis por hipersensibilidad y microquimerismo pulmonar

Puesto que nuestro estudio se enfoca a una enfermedad órgano específica, la demostración de un aumento significativo de microquimerismo en sangre circulante de pacientes con NH no era suficiente para demostrar un papel de las células microquiméricas en la enfermedad. Por lo tanto se prosiguió con el análisis local de microquimerismo en células obtenidas de lavado bronquioloalveolar donde encontramos que alrededor de dos terceras partes de las pacientes con NH presentaban células microquiméricas masculinas y que éstas se encontraban formando parte de las subpoblaciones de

linfocitos T facilitadoras y supresoras/citotóxicas, así como de macrófagos alveolares. Por el contrario, las muestras obtenidas de pacientes con FPI eran en su mayoría negativas para microquimerismo masculino.

De igual manera se analizó la presencia de células microquiméricas en cortes de tejido pulmonar de pacientes con NH encontrándose por FISH células positivas para el cromosoma Y en zonas de inflamación tisular y formando parte del epitelio bronquiolar. En contraste, los pulmones examinados de pacientes con FPI fueron negativos. En este contexto, nuestros hallazgos sugieren que las células masculinas presuntamente de origen fetal pueden migrar de la sangre circulante hasta el pulmón en un porcentaje importante de las mujeres con NH.

Funciones de las células microquiméricas en el pulmón de las pacientes con neumonitis por hipersensibilidad

Hasta donde sabemos esta es la primera demostración de microquimerismo en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, aunque el hallazgo de células microquiméricas en pulmón se ha reportado en algunas enfermas con lupus eritematoso sistémico¹⁰³, esclerosis sistémica progresiva⁸⁰ y síndrome de Sjögren⁶⁹.

Sin embargo nuestros hallazgos no determinan cual es el efecto de las células microquiméricas en el pulmón de las pacientes con NH y más aún, es importante señalar que en general los efectos del microquimerismo no se conocen con precisión¹⁰⁴. La observación de que células microquiméricas también son detectadas en la sangre circulante en un cierto porcentaje de mujeres sanas, resalta la disyuntiva de si estas células de origen fetal están implicadas en la patogénesis de algunas enfermedades o bien si son solo un fenómeno secundario del embarazo o más aún si tienen efectos benéficos sobre la salud de la madre contribuyendo a la reparación del daño tisular.

El hallazgo de células microquiméricas con fenotipo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como de macrófagos y células epiteliales en el pulmón de las pacientes con NH apoya el concepto de la capacidad multilínea de las células microquiméricas como se ha propuesto en estudios previos. Así, se han encontrado células microquiméricas con fenotipo de leucocitos, células troncales hematopoyéticas, células troncales mesenquimatosas, células epiteliales y hepatocitos^{56,88,89}. Puesto que la capacidad multilínea de las células microquiméricas se ha sugerido como indicio de su papel en la reparación tisular, nuestro hallazgo de células microquiméricas formando parte del epitelio bronquiolar podría apoyar esta hipótesis. Sin embargo, las pacientes alveolíticas con microquimerismo

mostraron un mayor deterioro en las pruebas funcionales de intercambio gaseoso y una tendencia a un mayor incremento en el porcentaje de linfocitos en el lavado bronquioloalveolar, lo que sugiere un mayor daño pulmonar.

En este sentido, nuestros hallazgos parecen por un lado apoyar el papel de las células microquiméricas en la patogénesis de la NH y por otra parte parecen apoyar el papel de las células microquiméricas en la reparación tisular.

El papel de las células microquiméricas ya sea en la regeneración tisular o en la patogénesis de la NH podría estar determinado por la respuesta inmunológica local

Según la hipótesis mas aceptada de la patogénesis de la NH para que se desarrolle la enfermedad deben concurrir en el individuo dos eventos de manera sincronizada: la inhalación del *factor inductor*, que en este caso es el antígeno aviario y la presencia de *factores promotores* como la susceptibilidad genética y las infecciones virales. En este contexto las células microquiméricas que permanecen en la médula ósea de la madre podrían ser activadas durante el daño tisular por factores quimiotácticos y citocinas que las hicieran proliferar y diferenciarse hacia ciertos linajes celulares migrando hacia las zonas de daño pulmonar tal como está reportado que lo hacen algunas células troncales de la médula ósea en humanos¹⁰⁵. Una vez que las células microquiméricas llegaran al órgano afectado sus diferencias genéticas con respecto al genoma materno podrían por un lado a) inducir una reacción aloinmune capaz de favorecer la inflamación a nivel local, como lo sugiere la presencia de linfocitos maternos T CD8⁺ capaces de reaccionar en contra de los antígenos HY de las células masculinas produciendo interferón gama⁵⁹ y en este contexto las células microquiméricas jugarían un papel como *factores promotores* de la inflamación pulmonar o b) las células microquiméricas podrían inducir tolerancia inmunológica materna mediante la producción de un perfil de citocinas tipo Th2; dicho perfil de citocinas ya se ha reportado como el propio de los linfocitos T microquiméricos⁵⁷; si se lograra inducir la tolerancia de las células microquiméricas entonces éstas podrían cumplir con su papel en la reparación tisular. Por lo tanto el efecto final del microquimerismo estaría determinado por la respuesta inmunológica local en torno a las células microquiméricas y este dependería del perfil de citocinas que predominara en el microambiente.

En el futuro una mejor caracterización funcional de las células microquiméricas podría darnos más pistas sobre el papel que estas células juegan en la patogénesis de la NH.

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que las pacientes con neumonitis por hipersensibilidad presentan un incremento en la frecuencia de microquimerismo masculino y confirman la capacidad multilinaje de las células microquiméricas lo que sugiere una asociación de estas células con la NH.

9. REFERENCIAS

1. Selman M. Hypersensitivity Pneumonitis. In: Interstitial Lung Disease. Schwarz M, and King T, Eds. B.C. Decker Inc., Hamilton Ontario, pp. 393-422, 1998.
2. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. Clin Chest Med. 2004;25(3):531-547.
3. Selman M. Neumonitis por hipersensibilidad. En: Neumopatías Intersticiales Difusas. Panamericana., Mexico D.F., pp 65-87, 1997.
4. Selman M, Chapela R, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. Seminars Resp Med. 1993;14:353-359.
5. Selman M, Chapela R, Salas J, Sansores R, Carrillo G, Sánchez M, Barrios R. Hypersensitivity pneumonitis. Clinical approach and an integral concept about its pathogenesis. A mexican point of view. In: Interstitial Pulmonary Diseases. Selected Topics. M. Selman, R. Barrios Eds., CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, pp 171-196, 1991.
6. Hasleton P. S. Hypersensitivity Pneumonitis. In: Spencer's Patology of the Lung. Mc Graw-Hill. New York, pp 433-445, 1996.
7. Perez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Sanchez M, Carrillo G, Perez R, Sansores R, Gaxiola M, Selman M. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. Am Rev Respir Dis. 1993;148(1):49-53.
8. Pérez-Padilla R, Gaxiola M, Salas J, Mejía M, Ramos C, Selman M. Bronchiolitis in chronic pigeon breeder's disease. Morphological evidence of a spectrum of small airway lesions in hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigens. Chest. 1996;110:371-377.
9. Baldwin CI, Todd A, Bourke SJ, Allen A, Calvert JE. Pigeon fanciers' lung: identification of disease-associated carbohydrate epitopes on pigeon intestinal mucin. Clin Exp Immunol. 1999;117(2):230-236.
10. Todd A, Coan RM, Allen A. Pigeon breeders' lung: pigeon intestinal mucin, an antigen distinct from pigeon IgA. Clin Exp Immunol. 1991;85(3):453-458.
11. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:952-958.
12. Hill MR, Briggs L, Montano MM, Estrada A, Laurent GJ, Selman M, Pardo A. Promoter variants in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) protect against susceptibility in pigeon breeders' disease. Thorax. 2004;59(7):586-590.
13. Chapela R, Selman M, Salas J, Terán L, Fortoul T. Influencia del embarazo y puerperio en el desarrollo de la alveolitis alérgica extrínseca. Allergol et Immunopathol. 1985;13:305-309.
14. Silva CI, Churg A, Muller NL. Hypersensitivity pneumonitis: spectrum of high-resolution CT and pathologic findings. Am J Roentgenol. 2007;188(2):334-344.

15. Cheung OY, Muhm JR, Helmers RA, Aubry MC, Tazelaar HD, Koor A, Leslie KO, Colby TV. Surgical pathology of granulomatous interstitial pneumonia. *Ann Diagn Pathol.* 2003;7(2):127-138.
16. 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.* 2005;60(8):665-671.
17. 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.* 2004;116(10):662-668.
18. Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Selman M. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1698-1704.
19. Costabel U, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2001;7(5):255-261.
20. 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.* 1993;104(1):38-43.
21. Haslam PL, Parker DJ, Townsend PJ. Increases in HLA-DQ, DP, DR, and transferrin receptors on alveolar macrophages in sarcoidosis and allergic alveolitis compared with fibrosing alveolitis. *Chest.* 1990;97(3):651-661.
22. 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.* 2006;173:188-198.
23. Selman M, Montañó M, Ramos C, Chapela R, González G, Vadillo F. Lung collagen metabolism and the clinical course of hypersensitivity pneumonitis. *Chest.* 1988;94:347-353.
24. Camarena A, Juárez A, Mejía M, Estrada A, Falfán R, Zúñiga J, Granados J, Selman M. Major histocompatibility complex and TNF- α gene polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1528-1533.
25. Dakhama A, Hegele RG, Laflamme G, Israel-Assayag E, Cormier Y. Common respiratory viruses in lower airways of patients with acute hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1316-1322.
26. Gudmundsson G, Monick MM, Hunninghake GW. Viral infection modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol.* 1999;162(12):7397-7401.
27. Ohtsuka Y, Munakata M, Tanimura K, Ukita H, Kusaka H, Masaki Y, Doi I, Ohe M, Amishima M, Homma Y, et al. Smoking promotes insidious and chronic farmer's lung disease, and deteriorates the clinical outcome. *Intern Med.* 1995;34(10):966-971.
28. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: international consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161: 646-664.

29. Selman M, King T, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: progress in understanding its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001;134: 136-151.
30. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2001; 345(7):517-525.
31. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):364-372.
32. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs.* 2004;64(4):405-430.
33. Booth H, Laurent GJ. Role of the immune system in the pathogenesis of cryptogenic fibrosing alveolitis. En: *Autoimmune aspects of lung disease.* Eds. DA Isenberg & SG. Spiro. Birknauser Verlag Basel, Suiza, pp. 233-249, 1998.
34. Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phillips JA 3rd, Sporn TA, McAdams HP, Schwarz MI, Schwartz DA. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172(9):1146-1152.
35. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, Lawson WE, Xie M, Vulto I, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Greider CW, Loyd JE. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2007;356(13):1317-1326.
36. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(18):7552-7557.
37. Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):293-298.
38. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1301-1315
39. Nelson JL. Microchimerism and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 1998;10: 564-571.
40. Hall JM, Lingenfelter P, Adams SL, Lasser D, Hansen JA, Bean MA. Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridization. *Blood.* 1995;867:2829-2832.
41. Lo YMD, Lo ESF, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS. Two-way cell traffic between mother and fetus. Biological and clinical implications. *Blood.* 1996;88:4390-4396.
42. Lo Y, Lau T, Chan L, Leung T, Chang A. Quantitative analysis of the bi-directional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem.* 2000;46:1301-1309.
43. Jimenez D, Tarantal A. Quantitative Analysis of Male Fetal DNA in Maternal Serum of Gravid Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Pediatr Res.* 2003;53:18-23.
44. Bianchi D, Farina A, Weber W, Delli-Bovi L, DeRiso M, Williams J, Klinger K. Significant fetal-maternal hemorrhage after termination of pregnancy: Implications for development of fetal cell microchimerism. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184,703-706.
45. Khosrotehrani K, Johnson KL, Lau J, Dupuy A, Cha DH, Bianchi DW. The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism: a systematic review. *Arthritis & Rheum.* 2003;48(11):3237-3241.

46. De Moor G, De Bock G, Noems I, De Bic S. A new case of human chimerism detected after pregnancy: 46, XY karyotype in the lymphocytes of a woman. *Acta Clin Belg.* 1988;43: 231-235.
47. Lee TH, Plagieroni T, Ohto H, Holland PV, Busch M. Survival of donor leukocyte subpopulation in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microchimerism in severe trauma patients. *Blood.* 1999;93:3127-3139.
48. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol.* 1999;105:574-583.
49. Osada H, Doi S, Fukushima T, Nakauchi H, Seki K, Sekiya S. Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion.* 2001;41:499-503.
50. Guetta E, Gordon D, Simchen MJ, Goldman B, Barkai G. Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34⁺ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30:13-21.
51. Evans P, Lambert N, Maloney S, Furst D, Moore J y Nelson L. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood.* 1999;93(6): 2033-2037.
52. Artlett C, Cox L, Ramos R, Dennis T, Fortunato R, Hummers L, Jimenez S, Smith B. Increased Microchimeric CD4⁺ T Lymphocytes in peripheral blood from women with systemic sclerosis. *Clin Immunol.* 2002;103:303-308.
53. van Wijk IJ, van Vugt JM, Mulders MA, Konst AA, Weima SM, Oudejans CB. Enrichment of fetal trophoblast cells from the maternal peripheral blood followed by detection of fetal deoxyribonucleic acid with a nested X/Y polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:871-878.
54. O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Molecular Human Reproduction.* 2003;9:497-502
55. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001;98:2396-2402.
56. Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA.* 2004;292:75-80.
57. Scaletti C, Vultaggio A, Bonifacio S, Emmi L, Torricelli F, Maggi E, Romagnani S, Piccinni MP. Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens. *Arthritis & Rheum.* 2002;46:445-450.
58. De Wit D, Van Mechelen M, Zanin C, Doutrelepon J, Velu T, Gerard C. Preferential activation of Th-2 cells in chronic graft-versus-host-disease. *J Immunol.* 1993;150:361-366.
59. Piper KP, McLarnon A, Arrazi J, Horlock C, Ainsworth J, Kilby MD, Martin WL, Moss PA. Functional HY-specific CD8⁺ T cells are found in a high proportion of women following pregnancy with a male fetus. *Biol Reprod.* 2006;76:96-101.
60. Ariga H, Ohto H, Busch MP, et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Transfusion.* 2001;41:1524-1530.

61. Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet.* 2001;60:145-150.
62. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, De Maria A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years post partum. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:705-708.
63. Artlett CM, Smith JB, Jiménez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338:1186-1191.
64. Lambert N, Lo D, Erickson T, Tylee T, Guthrie K, Furst D, Nelson L. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood.* 2002;100:2845-2851.
65. Artlett CM, Cox LA, Jimenez SA. Detection of cellular microchimerism of male or female origin in systemic sclerosis patients by polymerase chain reaction analysis of HLA-Cw antigens. *Arth & Rheum* 2000;43:1062-1067.
66. Hideyuki M, Hiromitsu N, Takayuki S. Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. *The Lancet.* 1999;354:220.
67. Nelson L, Furst D, Maloney S, Gooley T, Evans P, Smith A, Bean M, Ober C, Bianchi D. Microchimerism and HLA-compatible relationship of pregnancy in scleroderma. *The Lancet.*1998;351:559-562.
68. Khosrotehrani K, Bianchi DW. Fetal cell microchimerism: helpful or harmful to the parous woman? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003;15:195-199.
69. Kuroki M, Okayama A, Nakamura S, Sasaki T, Murai K, Shiba R, Shinohara M. Detection of maternal-fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2002;61:1041-1046.
70. Endo Y, Negishi I, Ishikawa O. Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology.* 2002;41:490-495.
71. Johnson K, McAlindon T, Mulcahy E. Microchimerism in a female patient with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism.* 2001;44:2107-2111.
72. Abbud M, Pavarino E, Alvarenga M, Fernandes I, Toledo R, Tajara E, Savoidi M, Goldman G, Goloni E. Systemic Lupus Erythematosus and microchimerism in autoimmunity. *Transplantation Proceedings.* 2002;34:2951-2952.
73. Mosca M, Curcio M, Lapi S, Valentini G, D'Angelo S, Rizzo G, Bombardieri S. Correlation of Y chromosome microchimerism with disease activity in patients with SLE: analysis of preliminary data. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:651-654.
74. Nelson JL. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease. Is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis & Rheum.* 1996;39:191-194.
75. Medsger T. Epidemiology of systemic sclerosis. *Clin Dermatol.* 1994;12:207-216.
76. Graham-Brown R, Sarkany I. Scleroderma-like changes due to chronic graft-versus-host disease. *Clin Exp Dermatol.* 1983;8:531-538.

77. Lambert N, Evans P, Hashizumi T, Maloney S, Gooley T, Furst D, Nelson L. Persistent fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA-DQA1*0501: Implications in autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2000;164:5545-5548
78. Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans P, Nelson J. Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;104:41-47.
79. Artlett CM, O'Hanlon TP, Lopez AM, Song YW, Miller FW, Rider LG. HLA-DQA1 is not an apparent risk factor for microchimerism in patients with various autoimmune diseases and in healthy individuals. *Arthritis & Rheum*. 2003;48:2567-2572.
80. Johnson KL, Nelson JL, Furst DE, McSweeney PA, Roberts DJ, Zhen DK, Bianchi DW. Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheum*. 2001;44:1848-1854
81. Fanning P, Jonsson J, Clouston A, Edwards-Smith C, Balderson G, Macdonald G, Crawford D, Kerlin P, Powell L, Powell E. Detection of male DNA in the liver of female patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2000;33:690-695.
82. Selva-O'Callaghan A, Mijares Boeckh-Behrens T, Balada E, Solans R, Simeón-Aznar C, Fonollosa V, Vilardell M. Lack of evidence of foetal microchimerism in female Spanish patients with systemic sclerosis. *Lupus*. 2003;12:15-20.
83. Corpechot C, Barbu V, Chazouilleres O, Poupon R. Fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2000;33:696-700.
84. Invernizzi P, De Andreis C, Sirchia S, Battezzati P, Zuin M, Rossella F, Perego F, Bignotto M, Simoni G, Podda M. Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;122:418-422.
85. Tanaka A, Lindor K, Gish R, Batts K, Shiratori Y, Omata M, Nelson J, Ansari A, Coppel R, Newsome M, Gershwin ME. Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1999;30:833-838.
86. Aractingi S, Sibilia J, Meignin V, Launay D, Hachulla E, Le Danff C, Janin A, Mariette X. Presence of microchimerism in labial salivary glands in systemic sclerosis but not in Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46:1039-1043.
87. Khosrotehrani K, Bianchi DW. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J Cell Sci*. 2005;118:1559-1563.
88. Johnson KL, Samura O, Nelson JL, McDonnell M, Bianchi DW. Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology*. 2002;36:1295-1297.
89. Stevens AM, McDonnell WM, Mullarkey ME, Pang JM, Leisenring W, Nelson JL. Liver biopsies from human females contain male hepatocytes in the absence of transplantation. *Lab Invest*. 2004;84:1603-1609.
90. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson K, Samura O, Lee S, Bianchi D. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case control study. *The Lancet*. 2001;358:2034-2038.
91. Aractingi S, Berkane N, Bertheau P, Le Goué C, Dausset J, Uzan S. Fetal DNA in skin of Polymorphic Eruptions of Pregnancy. *The Lancet*. 1998;352:1898-1901.

92. Khosrotehrani K, Guegan S, Fraitag S, Oster M, de Prost Y, Bodemer C, Aractingi S. Presence of Chimeric Maternally Derived Keratinocytes in Cutaneous Inflammatory Diseases of Children: The Example of Pityriasis Lichenoides. *J Invest Dermatol.* 2006;126(2):345-348
93. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. TIMP -1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment?. *Am J Physiol.* 2000;279:L562-L574.
94. Floros J, Lin HM, García A, Salazar MA, Guo X, DiAngelo S, Montañó M, Luo J, Pardo A, Selman M. Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J Infect Dis.* 2002;182:1473-1478.
95. Arnemann J, Eppelen JT, Cooke HJ, Sauermann U, Engel W, Schmidtke J. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(21):8713-8724.
96. Arnemann J, Jakubiczka S, Thuring S, Schmidtke J. Cloning and sequence analysis of a human Y-chromosome-derived, testicular cDNA, TSPY. *Genomics.* 1991;11(1):108-114.
97. Thrall RS, Scalise PJ. Bleomycin. En: *Pulmonary fibrosis*, SH Phan, R.S. Thrall Eds. Marcel Dekker, New York, pp. 231-292, 1995.
98. Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer.* 1999;83(4):449-455.
99. Frias S, Ramos S, Molina B, Del Castillo V, Mayen DG. Detection of mosaicism in lymphocytes of parents of free trisomy 21 offspring. *Mutat Res.* 2002;520(1-2):25-37.
100. Johnson KL, Zhen DK, Bianchi DW. The use of fluorescence in situ hybridization (FISH) on paraffin-embedded tissue sections for the study of microchimerism. *Biotechniques.* 2000;29(6):1220-1224.
101. O'Donoghue K, Chan J, De la Fuente J, Kennea N, Sandison A, Anderson JR, Roberts IA, Fisk NM. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *The Lancet.* 2004;364:179-182.
102. Renne C, Ramos Lopez E, Steimle-Grauer SA, Ziolkowski P, Pani MA, Luther C, Holzer K, Encke A, Wahl RA, Bechstein WO, et al. Thyroid fetal male microchimerisms in mothers with thyroid disorders: presence of Y-chromosomal immunofluorescence in thyroid-infiltrating lymphocytes is more prevalent in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease than in follicular adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5810-5814.
103. Johnson KL, McAlindon TE, Mulcahy E, Bianchi DW. Microchimerism in a female patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheum.* 2001;44(9):2107-2111.
104. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and other disorders. *Autoimmun Rev.* 2004;3:454-463,
105. Neuriger IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries. *Respiratory Research.* 2004;5:6.