



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

ANÁLISIS MOLECULAR DEL POLIMORFISMO  
DE LOS GENES MHC RELACIONADOS A  
CLASE I-A (MICA) EN LA FIBROSIS  
PULMONAR IDIOPÁTICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

M. en C. ARNOLDO AQUINO GÁLVEZ

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS: DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA

MÉXICO D.F.

JUNIO 2009



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.

**Este estudio fue apoyado por la Universidad Nacional Autónoma de México  
Grant SDI.PTID.05.6**

**Agradecimientos:**

**Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con la beca No. 103382**

**A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca otorgada.**

**A los miembros del comité tutorial**

**Dr. Moisés Eduardo Selman Lama**

**Dra. Annie Pardo Semo**

**Dr. Julio Granados Arriola**

**El presente trabajo se realizó en:**

**Laboratorio de HLA del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias,  
“Ismael Cosío Villegas”**

**Unidad de Investigación Médica en Inmunología, CMN S-XXI Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría invaluable de la Dra. Martha Pérez-Rodríguez.**

## **Dedico esta tesis a:**

**Paty, Hila, Joan y ¿¿¿???**

Gracias por existir, por estar aquí, por llenar mi vida de color, por ser el motivo para ser mejor día con día, por compartir sus vidas conmigo, por darle sentido a mi vida. Gracias por ser tan tolerante, y ayudarme a tener estabilidad.

Los amo.

**A mis padres y hermanos** por desearme siempre lo mejor en sus oraciones, que estoy seguro han sido escuchadas.

Gracias.

## **Gracias a:**

Ese ser que todos llamamos Dios, por haber escuchado lo que le ha pedido mi mamá día tras día, esto es una muestra de que estas presente cada vez que recurrimos a ti, gracias por estar con nosotros en los tiempos difíciles.

Dr. Selman, Dra. Annie y Dr. Julio por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por todo el apoyo y confianza que me han dado.

Ángel Camarena, gracias, mil gracias, por estar presente en mi formación, por la gran oportunidad que me ofreció hace ya casi 11 años en su laboratorio y que sin ello esto no sería posible.

A todos mis maestros, sin ustedes no habría sido posible llegar a este momento

Oswaldo y Miriam por su apoyo en el momento que más lo necesite. Espero que nunca pierdan esa parte que nos hace falta a todos en este mundo (empatía).

A mi gran amigo Marco por su sincera amistad

A las personas en el posgrado, por todo su apoyo de manera muy especial a Lilia Jiménez, Erika y Ernesto.

A mis compañeros y amigos; Doroteo, Javier, Georgina, Reme, Víctor, Héctor y Jorge.

Enumerar a las personas que me ayudaron de una u otra forma sería casi imposible, ya que por suerte cuento con mucha gente que me ha ayudado y me seguirá ayudando, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

*Piensa, cree, sueña y atrévete.*

*Walt Disney*

*La dignidad no consiste en nuestros honores sino en el  
reconocimiento de merecer lo que tenemos.*

*Aristóteles*

*La sencillez consiste en hacer el viaje por la vida, solo con el equipaje  
necesario.*

*Charles Dudley Warner*

# MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility

Arnoldo Aquino-Galvez · Martha Pérez-Rodríguez · Ángel Camarena · Ramces Falfan-Valencia · Víctor Ruiz · Martha Montaña · Lourdes Barrera · Isabel Sada-Ovalle · Remedios Ramírez · Julio Granados · Annie Pardo · Moisés Selman

Received: 24 February 2009 / Accepted: 1 April 2009 / Published online: 12 April 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal lung disorder of unknown etiology. IPF is likely the result of complex interrelationships between environmental and host factors, although the genetic risk factors are presently uncertain. Because we have found that some MHC polymorphisms confer susceptibility to IPF, in the present study we aimed to evaluate the role of the MHC class I chain-related gene A (MICA) in the risk of developing the disease. MICA molecular typing was done by reference strand mediated conformation analysis in a cohort of 80 IPF patients and 201 controls. In addition, the lung cellular source of the protein was examined by immunohistochemistry, the expression of the MICA receptor NKG2D in lung cells by flow cytometry and soluble MICA by ELISA. A significant increase of MICA\*001 was observed in the IPF cohort (OR = 2.91, 95% CI = 1.04–8.25;  $p$ C = 0.03).

Likewise, the frequency of the MICA\*001/\*00201 genotype was significantly increased in patients with IPF compared with the healthy controls (OR = 4.72, 95% CI = 1.15–22.51;  $p$ C = 0.01). Strong immunoreactive MICA staining was localized in alveolar epithelial cells and fibroblasts from IPF lungs while control lungs were negative. Soluble MICA was detected in 35% of IPF patients compared with 12% of control subjects ( $P$  = 0.0007). The expression of NKG2D was significantly decreased in  $\gamma\delta$  T cells and natural killer cells obtained from IPF lungs. These findings indicate that MICA polymorphisms and abnormal expression of the MICA receptor NKG2D might contribute to IPF susceptibility.

## Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and usually lethal disease of unknown etiology characterized by alveolar epithelial cell injury and activation, followed by the expansion of the fibroblast/myofibroblast population and exaggerated accumulation of extracellular matrix in the lung parenchyma (Selman et al. 2001). Susceptibility to IPF is probably determined by both genetic and environmental factors, although to date, the gene(s) implicated remain elusive (Lawson and Loyd 2006). We have recently found that some MHC polymorphisms confer susceptibility to IPF, likely related with the induction of epithelial cell apoptosis, a critical process in the development of the disease (Falfán-Valencia et al. 2005). However, the mechanisms involved in alveolar epithelial cell injury are largely unknown.

Importantly, epithelial cells undergoing injuries that compromise their function, must be efficiently eliminated to control inflammation or damage and promote tissue repair. One of the mechanisms that participate in the activation of

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements to obtain the PhD degree for AAG at Biological Sciences, UNAM.

A. Aquino-Galvez · Á. Camarena · R. Falfan-Valencia · V. Ruiz · M. Montaña · L. Barrera · I. Sada-Ovalle · M. Selman (✉)  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias,  
“Ismael Cosío Villegas”, Tlalpan 4502,  
CP 14080 Mexico DF, Mexico  
e-mail: mselman1@yahoo.com.mx

M. Pérez-Rodríguez  
Unidad de Investigación Médica en Inmunología,  
CMN S-XXI Instituto Mexicano del Seguro Social,  
Mexico DF, Mexico

R. Ramírez · A. Pardo  
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Mexico DF, Mexico

J. Granados  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición “Salvador Zubirán”, Mexico DF, Mexico

the immune system to remove stressed epithelial cells involves the major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related (MIC) protein and its interaction with the activated NKG2D receptor (Borchers et al. 2006). The MIC gene family consists of two MIC encoding genes (MICA and MICB) and five pseudogenes (MICC–MICG) which are located within the class I region of the MHC on chromosome 6 (Hui et al. 2006; Stastny 2006), 47 kb centromeric to the HLA-B gene (Piancatelli et al. 2005; Lü et al. 2006). Under physiological conditions, MICA and MICB expression is restricted to the intestinal epithelium but is strongly induced in other tissues in response to various pathological conditions including lung, breast, kidney, ovarian, prostate, gastric, and colon carcinomas, melanomas, certain leukemias, as well as in viral and mycobacterial infections (Wu et al. 2002; Groh et al. 2005; Piancatelli et al. 2005; Skov et al. 2005; Borchers et al. 2006; Waldhauer and Steinle 2006; Xu et al. 2006; Zhang et al. 2006; Zou et al. 2006; Madjd et al. 2007). In addition to epithelial cells, MICA has been also detected on the surface of freshly isolated actively growing fibroblasts (Zou et al. 2006).

MICA is recognized by  $\gamma\delta$  T cells, CD8 T cells, and natural killer (NK) cells through the C-type lectin-like NKG2D receptor (Komatsu-Wakui et al. 2001; Groh et al. 2003; Törn et al. 2003; Raffaghello et al. 2004; Gao et al. 2006). Recent studies have demonstrated that the interaction of NKG2D with MICA and MICB on epithelial tumor cells triggers the cytolytic responses of NK and  $\gamma\delta$  T cells, and that this process is independent of antigen presentation (Eisele et al. 2006; Madjd et al. 2007; Osaki et al. 2007). Moreover, blocking the interaction of MICA with NKG2D attenuates NK and T cell-mediated cytotoxicity (Boissel et al. 2006; Waldhauer and Steinle 2006; Xu et al. 2006).

Since IPF involves primarily the abnormal activation of alveolar epithelial cells and the expansion of the fibroblasts population, the aims of this study were: (1) to explore the potential association between this disorder and MICA gene transmembrane polymorphisms; (2) to determine the lung localization and the plasma levels of the protein, and (3) to evaluate the percent of lung cells expressing the MICA receptor NKG2D. This is the first study that examines these associations in patients with IPF.

## Materials and methods

### Patients

Eighty patients with sporadic IPF were included in this study (42 males, 38 females,  $64.77 \pm 11.02$  years). Diagnosis of IPF was performed according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) consensus (American Thoracic Society 2000). Open lung

biopsy was performed in 46% of the patients and all of them showed typical microscopic findings of usual interstitial pneumonia (Katzenstein et al. 2008). In the absence of biopsy, patients had to fulfill the criteria of the ATS/ERS international consensus. Patients with known causes of interstitial lung disease (i.e., collagen vascular disease, drug toxicity, environmental exposure), were excluded.

The control group consisted of 201 unrelated healthy volunteers (72 males, 129 females;  $53.4 \pm 11.2$  years). Patients and controls were individuals with the same ethnic origin and with at least two generations born in Mexico. The protocol was approved by the Ethics Committee of the National Institute of Respiratory Diseases, México. All patients and control subjects were informed of the purpose of the study and their consent obtained.

The percent of NKG2D-expressing cells obtained from bronchoalveolar lavage was analyzed in six patients with IPF, three healthy controls and three patients with hypersensitivity pneumonitis (HP) a granulomatous inflammatory lung disorder that may evolve to fibrosis (Selman et al. 2006).

### DNA extraction

Genomic DNA was extracted from 20 ml of peripheral blood using the BD genomic DNA isolation Kit (Maxim Biotech, San Francisco CA).

### PCR amplification

MICA exons 2–3 and exons 4–5 were amplified with the primers MICA2-3F 5'-TCCTGCCCCAGGAAGGTTGGG-3' and MICA2-3R 5'-AGGGAGAGGAGAGCCCTGGC-3 and the primers MICA4-5F 5'-CAGACTTGCA GGTCAGGGGTCCCG-3' and MICA4-5R 5'-CCTTACC ATCTCCAGAACTGC-3', respectively.

PCR amplifications for exons 2–3 and 4–5 were performed using 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> for MICA 2–3 and 2 mM for MICA 4–5, 0.2 mM dNTPs, 1× *Taq* DNA polymerase buffer, 0.5 pM of each oligonucleotide and 0.75 U of platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 0.5 µg of DNA in 25 µl of volume. PCR conditions for MICA 2–3 were initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 33 cycles of 95°C for 30 s, 65°C for 50 s and 72°C for 30 s, and final extension at 72°C for 8 min. On the other hand, PCR conditions for MICA 4–5 were one cycle at 94°C for 4 min followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 63°C for 1.30 min and 72°C for 2 min, and one cycle at 72°C for 10 min. Cycling was carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City CA). Amplified PCR products were then electrophoresed in submarine 2% agarose gel containing 0.2 µg/ml ethidium bromide for 40 min (30 V/cm) and amplified bands were

visualized in a dual intensity UV light transilluminator (UVP Inc. Upland, CA). PCR products for exons 2–3 and exons 4–5 were 949 and 678 base pairs (bp), respectively.

#### MICA genotyping assay

Molecular typing was done by reference strand mediated conformation analysis (RSCA) for MICA locus polymorphism. The production and hybridization of fluorescent labeled references (FLRs) with the sample, as well as polyacrylamide gel and electrophoretic conditions for RSCA have been previously described (Arguello et al. 1998; Pérez-Rodríguez et al. 2002). Three FLRs were selected for exons 2–3, FLR1 MICA\*001 (EJ32B), FLR2 MICA\*00801 (WT47) and FLR3 MICA\*004 (PF97387); and two for exons 4–5, FLR1 MICA\*001 (EJ32B) and FLR2 MICA\*004 (PF97387).

Internal controls were used to control for gel to gel variation, for MICA exons 2–3 were MICA\*001, \*00201, \*004, \*00701, \*008, \*010, \*017, and \*018. For exons 4–5 were MICA\*001, \*00201, \*004, \*008 and \*010. The mobility of each fluorescent duplex was analyzed using ALLELE LINK computer program (Amersham Pharmacia Biotech) (Arguello et al. 1998).

#### Molecular typing for HLA-B\*loci

Molecular typing for HLA-B locus was done by PCR sequence-specific primers (PCR-SSP) technique using the Fastype HLA-DNA SSP Typing System (Biosynthesis Inc., Dallas, TX), which has been certified by the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI). Briefly, 47 primer pairs were used to determine the 45 major HLA-B group-specificities (from B7 up to B81) in low resolution modality. All PCR amplifications were performed on 75 ng of genomic DNA in a 10- $\mu$ l reaction volume containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 60  $\mu$ M of each dNTP's. In all cases, amplifications were performed using 0.5 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen; Rockville MD). Samples were subjected to 10 cycles of 94°C/20 s, 65°C/1 min and 72°C/30 s, following by 20 cycles at 94°C for 20 s, 61°C for 50 s and 72°C for 30 s with one extension cycle at 72°C for 5 min, using an automated thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700, PE Applied Biosystems, Foster City CA). Amplified PCR-SSP products were then electrophoresed in submarine 2% agarose gels containing 0.2  $\mu$ g/ml ethidium bromide for 40 min (30 V/cm) and amplified bands were visualized in dual intensity UV light transilluminator (UVP inc. Upland, CA), and then analyzed and stored in EDAS290 photo documentation system (Kodak, Rochester, NY). The results were interpreted following the instructions of typing sheets from the procedure guide.

#### Immunohistochemistry

Tissue sections from IPF and controls were treated as previously described (Pardo et al. 1998; Selman et al. 2007). Antigen retrieval was performed in citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 8 min in a microwave. Samples were incubated with anti-human MICA antibody (rabbit polyclonal; 200  $\mu$ g/ml diluted 1:50, 4  $\mu$ g/ml; Santa Cruz, CA) at 4°C overnight. A secondary biotinylated anti-immunoglobulin followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) was used according to manufacturer instructions. 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC, BioGenex) in acetate buffer containing 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as substrate. The sections were counterstained with hematoxylin. The primary antibody was replaced by non-immune serum for negative control slides.

#### Bronchoalveolar lavage

As part of the diagnosis process, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in the IPF patients as described (Selman et al. 2006). Likewise, BAL obtained from three healthy volunteers and three patients with hypersensitivity pneumonitis were used as controls. Cells were resuspended in DMSO 10% and fetal bovine serum 90% at 10<sup>6</sup> cells/ml and kept in liquid nitrogen until use. None of the patients had been treated with corticosteroids or immunosuppressive drug at the time of the study. Cells were thawed as described previously (Disis et al. 2006), and only cryopreserved samples showing >95% viability were used.

#### Determination of NKG2D surface expression by flow cytometry

BAL cells were resuspended in 50  $\mu$ l of staining buffer and labeled with anti-human-CD3-PerCP, anti-human-CD16-FITC, anti-human-CD56-FITC, anti-human TCR  $\gamma\delta$ -PE, anti-human NKG2D-APC, anti-human CD4-APC-Cy7, anti-human CD8-PE-Cy7 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Cells were fixed in paraformaldehyde 1% for cytometry analysis (Barrera et al. 2008). Samples from all assays were analyzed in a FACS Aria flow cytometer (Becton Dickinson, San José, CA) by using FACS Diva software (V.6.1). Typically, 100,000 events were acquired.

#### Quantification of soluble MICA

Soluble MICA (sMICA) was measured using anti-human MICA ELISA kit from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) following the instructions of the manufacturer. Briefly, plates (Costar EIA Plate, Minneapolis, MN) were coated with 100  $\mu$ l (360 mg/ml) of capture antibody per



**Table 1** MICA gene frequency in IPF patients and the control group

| Allele | IPF ( <i>n</i> = 80)<br>(alleles 160) |           | Controls ( <i>n</i> = 201)<br>(alleles 402) |           | pC    | OR   | 95% CI      |
|--------|---------------------------------------|-----------|---|-----------|-------|------|-------------|
|        | <i>n</i>                              | <i>gf</i> | <i>n</i>                                    | <i>gf</i> |       |      |             |
| *00201 | 68                                    | 0.42      | 142   | 0.35      | 0.13  | 1.35 | 0.91–2.00   |
| *010   | 54                                    | 0.33      | 119   | 0.29      | 0.38  | 1.21 | 0.80–1.82   |
| *00801 | 14                                    | 0.08      | 47  | 0.11      | 0.38  | 0.72 | 0.36–1.39   |
| *001   | 10                                    | 0.06      | 9   | 0.02      | 0.03  | 2.91 | 1.04–8.25   |
| *004   | 12                                    | 0.07      | 66  | 0.16      | 0.008 | 0.41 | 0.20–0.80   |
| *017   | 2                                     | 0.01      | 17  | 0.04      | 0.13  | 0.29 | 0.03–1.23   |
| *00701 | 0                                     | ND        | 1   | 0.002     | 0.48  | 2.52 | 0.03–198.45 |
| *018   | 0                                     | ND        | 1   | 0.002     | 0.48  | 2.52 | 0.03–198.45 |

CI confidence interval, *gf* gene frequency, *ND* not detected, *OR* odds ratio, *pC* *P* corrected (*P* values were multiplied for the number of comparisons)

well and incubated for overnight at 4°C. Plasma samples from controls and IPF patients (100 µl) were added and incubated for 2 h at room temperature, and then 2 h with 100 µl of detection antibody and 20 min with streptavidin-horseradish peroxidase. After washing, 100 µl of substrate solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tetramethylbenzidine 1:1) were added for 20 min. Absorbance was measured at 450 nm corrected with 540 nm in an ELISA reader.

#### Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of MICA were determined by direct counting in both, patients and controls. For categorical variables we performed non parametric statistics by using the Epiinfo statistical program v6.04b (Stone Mountain, GA) that included Chi square analysis and Fisher's exact test using 2 × 2 contingency tables. *P* values were corrected (*pC*) by the method of Bonferroni (i.e., multiplying for the number of comparisons at each locus). In each analysis the statistical significance was accepted when the *pC* was <0.05. The magnitude of associations between IPF and MICA genotypes was estimated by using odds ratio (*OR*) and 95% confidence intervals (*CI*). Hardy–Weinberg equilibrium was also tested for each locus in the studied population.

## Results

### MICA alleles and genotypes

Eight MICA alleles were identified in this study, six of them occurring at an allele frequency of more than 0.01. The frequencies of MICA in IPF patients and healthy control subjects are shown in Table 1. The most common alleles in both groups were: MICA\*00201 (*gf* = 0.35 in controls and 0.42 in IPF) and MICA\*010 (0.29 and 0.33, respectively). A significant increase of MICA\*001 (*pC* = 0.03,

*OR* = 2.91, 95% *CI* = 1.04–8.25) and a decrease in the gene frequency of MICA\*004 (*pC* = 0.008, *OR* = 0.41, 95% *CI* = 0.20–0.80) was observed in the IPF cohort (Table 1).

Nineteen genotypes were detected and the more common, in both groups, were: MICA\*00201/\*00201 (0.17 in controls and 0.18 in IPF), MICA\*00201/\*010 (0.16 in controls and 0.21 in IPF) and MICA\*010/\*010 (0.10 in controls and 0.18 in IPF) (Table 2). The frequency of the MICA\*001/\*00201 genotype was significantly increased in patients with IPF compared with the healthy controls (*pC* = 0.01, *OR* = 4.72, 95% *CI* = 1.15–22.51). Conversely, MICA\*004/\*004 homozygous genotype was considerably less frequent in IPF (*gf* = 0.01) than in the controls (*gf* = 0.08) (*pC* = 0.17, *OR* = 0.04, 95% *CI* = 0.0–1.15). Significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium in the distribution of MICA genotypes in IPF patients and healthy controls were not detected.

### Frequency of high and reduced NKG2D binding affinity MICA alleles

Functional comparisons have demonstrated important differences in the NKG2D binding affinity of different MICA alleles (Steinle et al. 2001; Muñoz-Saá et al. 2005). Thus, studies using soluble NKG2D showed that substitution of valine 129 by methionine confer high NKG2D binding affinity while reduction in affinity is observed when methionine 129 is replaced by valine (Steinle et al. 2001). Alleles with valine 129 and reduced affinity are MICA\*004, \*006, \*008, \*009, \*010, \*016, \*019. Alleles with methionine 129 and high affinity are MICA\*001, \*002, \*007, \*011, \*012, \*015, \*017, \*018, \*021 (Steinle et al. 2001; Muñoz-Saá et al. 2005).

We examined whether there were differences in MICA allele and genotype frequencies regarding binding affinities for NKG2D in the IPF and healthy control groups. However, as shown in Table 3, no significant differences were found among both groups.

**Table 2** MICA genotype frequencies in IPF patients and healthy controls

| Genotype      | IPF ( <i>n</i> = 80) |           | Controls ( <i>n</i> = 201) |           | <i>pC</i> | OR   | 95% CI      |
|---------------|----------------------|-----------|----------------------------|-----------|-----------|------|-------------|
|               | <i>n</i>             | <i>gf</i> | <i>n</i>                   | <i>gf</i> |           |      |             |
| *00201/*010   | 17                   | 0.21      | 34                         | 0.16      | 0.49      | 1.33 | 0.65–2.64   |
| *00201/*00201 | 15                   | 0.18      | 36                         | 0.17      | 0.99      | 1.06 | 0.50–2.14   |
| *010/*010     | 15                   | 0.18      | 22                         | 0.10      | 0.12      | 1.88 | 0.85–4.04   |
| *00201/*00801 | 10                   | 0.12      | 18                         | 0.08      | 0.49      | 1.45 | 0.57–3.51   |
| *001/*00201   | 7                    | 0.08      | 4                          | 0.01      | 0.01      | 4.72 | 1.15–22.51  |
| *00201/*004   | 4                    | 0.05      | 11                         | 0.05      | 0.56      | 0.91 | 0.20–3.19   |
| *004/*010     | 4                    | 0.05      | 17                         | 0.08      | 0.45      | 0.57 | 0.14–1.83   |
| *001/*010     | 2                    | 0.02      | 4                          | 0.01      | 0.54      | 1.26 | 0.11–9.01   |
| *00801/*00801 | 2                    | 0.02      | 5                          | 0.02      | 0.64      | 1.01 | 0.09–6.30   |
| *001/*004     | 1                    | 0.01      | ND                         | 0         | 0.48      | 2.53 | 0.03–199.70 |
| *004/*004     | 1                    | 0.01      | 14                         | 0.08      | 0.04      | 0.17 | 0.0–1.15    |
| *004/*017     | 1                    | 0.01      | 4                          | 0.01      | 0.55      | 0.62 | 0.01–6.44   |
| *010/*017     | 1                    | 0.01      | 9                          | 0.04      | 0.16      | 0.27 | 0.01–2.01   |
| *00201/*017   | ND                   | 0         | 2                          | 0.009     | 0.63      | 1.26 | 0.02–24.49  |
| *004/*00801   | ND                   | 0         | 6                          | 0.02      | 0.35      | 0.41 | 0.01–3.48   |
| *00801/*010   | ND                   | 0         | 11                         | 0.05      | 0.09      | 0.22 | 0.01–1.56   |
| *00801/*017   | ND                   | 0         | 2                          | 0.009     | 0.63      | 1.26 | 0.02–24.49  |
| *00201/*00701 | ND                   | 0         | 1                          | 0.004     | 0.48      | 2.53 | 0.03–199.70 |
| *001/018      | ND                   | 0         | 1                          | 0.004     | 0.48      | 2.53 | 0.03–199.70 |

*CI* confidence interval, *gf* gene frequency, *ND* not detected, *OR* odds ratio, *pC* *P* corrected (*P* values were multiplied for the number of comparisons)

**Table 3** MICA allele and genotypes frequencies according to the affinity for NKG2D in IPF patients and healthy controls

| Allele   | IPF ( <i>n</i> = 80)<br>(160) |           | Controls<br>( <i>n</i> = 201)<br>(402) |           | <i>pC</i> | OR   | 95% CI    |
|----------|-------------------------------|-----------|--|-----------|-----------|------|-----------|
|          | <i>n</i>                      | <i>gf</i> | <i>n</i>                               | <i>gf</i> |           |      |           |
| High     | 80                            | 0.5       | 170                                    | 0.42      | 0.11      | 1.36 | 0.93–2.0  |
| Low      | 80                            | 0.5       | 232                                    | 0.57      | 0.11      | 0.73 | 0.50–1.08 |
| Genotype |                               |           |  |           |           |      |           |
| HH       | 22                            | 0.27      | 44                                     | 0.21      | 0.39      | 1.35 | 0.71–2.54 |
| HL       | 36                            | 0.45      | 82                                     | 0.40      | 0.60      | 1.19 | 0.68–2.07 |
| LL       | 22                            | 0.27      | 75                                     | 0.37      | 0.15      | 0.64 | 0.34–1.16 |

*CI* confidence interval, *gf* gene frequency, *ND* not detected, *OR* odds ratio, *pC* *P* corrected, *H* high, *L* low

### MICA/HLA-B haplotypes in IPF

Because the association of MICA may be due to linkage disequilibrium with the polymorphic HLA-B locus, we investigated whether the MICA\*001 or MICA\*004 contribution to IPF susceptibility was independent or attributed to HLA-B. The HLA-B alleles were genotyped in 45 IPF patients and 70 healthy controls.

Sixteen MICA/HLA-B haplotypes were identified in both groups. Haplotypes present at a frequency higher

than 0.02 are shown in Table 4. The most frequent haplotypes were MICA\*00201/B\*35 (0.18 in IPF and 0.19 in controls); MICA\*010/B\*15 (0.12 in IPF and 0.05 in controls), MICA\*00201/B\*39 (0.11 in IPF and 0.07 in controls) and MICA\*010/B\*40 (0.05 in IPF and 0.07 in controls). The haplotypes of MICA/HLA-B alleles did not reveal significant differences between the control and patients groups (Table 4).

### Reduced percentage of NKG2D-expressing BAL cells in IPF patients

The expression of NKG2D receptor in cells obtained by bronchoalveolar lavage was analyzed in patients with IPF, HP and healthy controls by flow cytometry. As shown in Table 5 and Fig. 1, the percentage of total BAL cells expressing NKG2D was significantly decreased in IPF patients compared with healthy individuals and patients with hypersensitivity pneumonitis. The analysis of the T-cell subpopulations, showed a significant decrease of NKG2D expression in NK and  $\gamma\delta$  T cells with a similar distribution in CD8 T cells (Table 5). The intensity of fluorescence was also decreased in IPF cells compared with those of normal subjects or HP patients indicating that the number of receptors per cell (even in CD8+ lymphocytes) was also decreased (Fig. 2).

**Table 4** Haplotype frequency of MICA-HLA-B in IPF patients and control subjects\*

| MICA/HLA-B | IPF<br>( <i>n</i> = 45)<br>(90) |      | Controls<br>( <i>n</i> = 70)<br>(140) |      | pC   | OR   | 95% CI    |
|------------|---------------------------------|------|---------------------------------------|------|------|------|-----------|
|            | <i>n</i>                        | Hf   | <i>n</i>                              | Hf   |      |      |           |
|            | *00201/*35                      | 17   | 0.18                                  | 27   |      |      |           |
| *010/*15   | 11                              | 0.12 | 8                                     | 0.05 | 0.13 | 2.3  | 0.81–6.58 |
| *00201/*39 | 10                              | 0.11 | 11                                    | 0.07 | 0.54 | 1.47 | 0.53–3.99 |
| *010/*40   | 5                               | 0.05 | 10                                    | 0.07 | 0.83 | 0.76 | 0.20–2.56 |
| *010/*35   | 2                               | 0.02 | 7                                     | 0.05 | 0.48 | 0.43 | 0.04–2.35 |

CI confidence interval, hf haplotype frequency, OR odds ratio, pC *P* corrected

\*Only haplotypes present at a frequency of more than 0.5% are shown

### Plasma levels of soluble MICA

We analyzed the levels of sMICA in the plasma of 95 IPF patients and 84 controls. The majority of healthy individuals showed almost undetectable sMICA level (lower than 1 pg/mL). sMICA was detected in 35% of IPF patients [median: 0 (0–1,191.9 pg/ml)], and in 12% of control subjects [median: 0 (0–136.7 pg/ml)]. This difference was statistically significant ( $P = 0.0007$ ; Fisher's exact test). Moreover, detection of MICA protein was associated with an OR (95%CI) of 3.76 (1.71–8.25).

### Immunolocalization of MICA in IPF and control lungs

The lung cellular localization of MICA was evaluated by immunohistochemistry in IPF and control lungs. As illustrated in Fig. 3, immunoreactive MICA was localized primarily in the cytoplasm of alveolar epithelial cells and fibroblasts from fibroblastic foci that exhibited an intense staining in IPF lungs. Immunohistochemical staining for MICA was negative in normal lungs as well as in lung tissue samples incubated without the primary antibody.

## Discussion

Idiopathic pulmonary fibrosis is a chronic and lethal fibrotic lung disease associated with significant morbidity and mortality. It is likely a complex disorder in which interactions between environmental factors and variants in one or more genes result in the development of the disease. However, the putative genes implicated in the pathogenesis of IPF remain elusive.

In a recent study focusing on the MHC region we identified some predisposing polymorphisms associated with this disease (Falfán-Valencia et al. 2005). Since a highly divergent MHC class I chain-related gene A is localized within the class I region (between HLA-B and B-associated transcript genes), we aimed to evaluate variants of this gene in a cohort of IPF patients. We also explored the localization of the protein in IPF lungs and the expression of the MICA receptor NKG2D in immune cells obtained by BAL. The MICA protein has not been implicated in antigen presentation but plays an important role in the immune response binding its immunoreceptor NKG2D and providing costimulatory signal for the activation of NK cells, CD8+ T cells and  $\gamma\delta$  T cells. Upon binding to MICA, NKG2D stimulates lysis pathway resulting in death of altered cells.

Our results revealed that MICA was expressed in IPF lungs, both in alveolar epithelial cells as well as in mesenchymal cells that were forming the fibroblastic/myofibroblastic foci. Since the most significant role for MICA molecules is to function as ligands for cells with the functional ability to lyse target cells spontaneously, the expression of MICA in alveolar epithelial cells and fibroblasts may represent an important defense mechanism aiming to eliminate abnormally activated cells. It is important to emphasize that aberrantly activated alveolar epithelial cells are responsible for the production of most of the profibrotic mediators in the IPF lungs (Selman and Pardo 2006). Also, it can be speculated that alveolar epithelial cells that escape lysis may undergo epithelial–mesenchymal transition, a process that participates in the expansion of the fibroblast population in the fibrotic lungs (Willis et al. 2005; Kim et al. 2006).

**Table 5** NKG2D expression on cells obtained by bronchoalveolar lavage

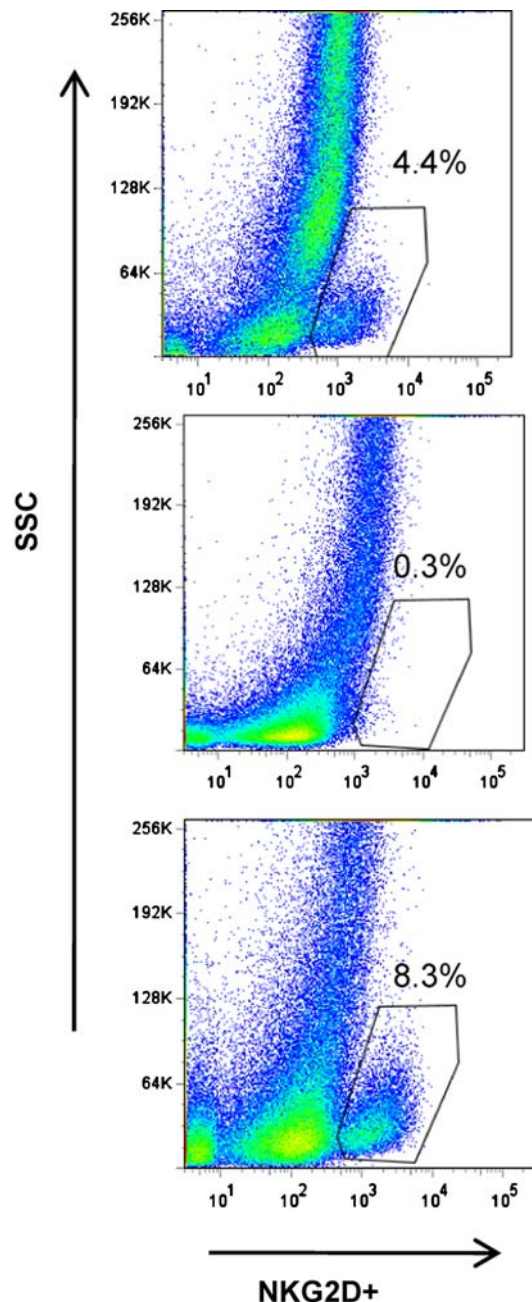
|                                  | NKG2D on Total BAL cells <sup>a</sup> | NKG2D/CD8+ T cells | NKG2D/NK T cells | NKG2D/ $\gamma\delta$ + T cells | NKG2D CD4+ T cells |
|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------|------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control ( <i>n</i> = 3)          | 4.0 ± 0.4                             | 71.1 ± 4.8         | 66.1 ± 5.9       | 37 ± 5.7                        | 0.6 ± 0.2          |
| IPF ( <i>n</i> = 6) <sup>b</sup> | 0.7 ± 0.6**                           | 71.3 ± 13          | 39.1 ± 9.5*      | 11.4 ± 3.8**                    | 4.0 ± 4.7          |
| HP ( <i>n</i> = 3) <sup>c</sup>  | 7.3 ± 1.8                             | 84.9 ± 10          | 68.2 ± 10        | 28.3 ± 8.7                      | 3.2 ± 2.1          |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

<sup>a</sup> Bronchoalveolar lavage

<sup>b</sup> Idiopathic pulmonary fibrosis

<sup>c</sup> Hypersensitivity pneumonitis



**Fig. 1** NKG2D expression on total BAL cells is reduced in patients with IPF. The *dot plots* show the electronic gates used to identify the NKG2D+ population. *Numbers* indicate percentage of cells in each gate. The *dot plots* show one representative experiment out of 5

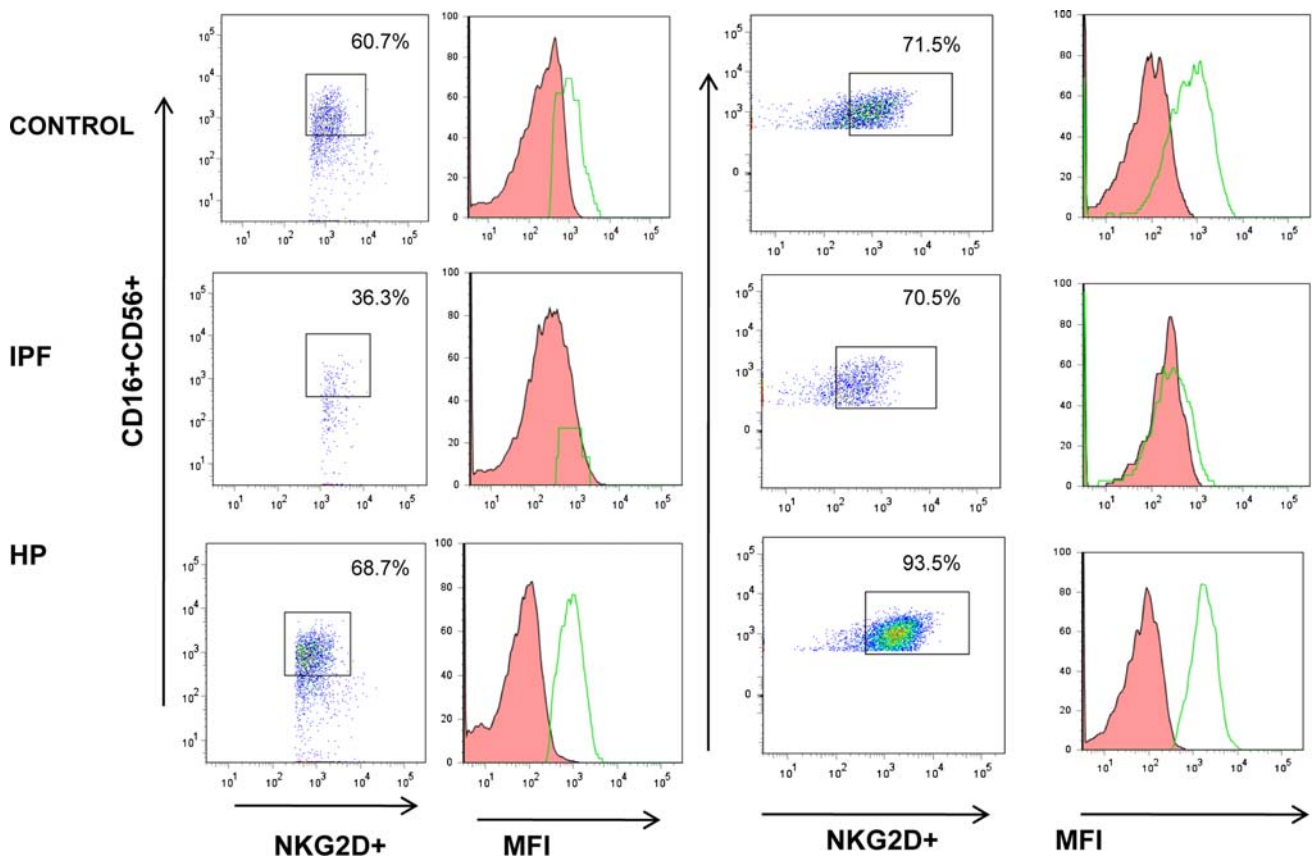
Likewise, persistence of fibroblasts/myofibroblasts in the fibroblastic foci appears to be a key pathological process leading to the abnormal accumulation of extracellular matrix in the lung (Katzenstein and Myers 1998; Selman et al. 2004). The mechanisms involved in the persistence of fibroblasts are presently unknown, although some studies have indicated that resistance to apoptosis may play a role (Thannickal and Horowitz 2006). While most studies

regarding MICA have evaluated its role in epithelial cells, recent reports have demonstrated a similar function in fibroblasts (Zou et al. 2006; Poggi et al. 2007). Thus, IL-2-activated NK cells efficiently lyse skin fibroblasts by triggering NKG2D-MICA interaction (Poggi et al. 2007). In this context, our findings suggest that the persistence of fibroblasts in the IPF lungs despite of expressing MICA may be at least partially related to the evasion of specific NK and T-cell recognition, as it has been described in cancer (Waldhauer et al. 2008).

Regarding MICA gene variability we found that the frequency of the allele MICA\*001 and the genotype MICA\*001/\*00201 were significantly increased in the patients with IPF suggesting that these variants could predispose to the disease. The differences were observed in an allele and a genotype that have low frequencies in our population. Some genotypes were not detected (mostly in IPF patients) that could be due to an under-representation or a real absence of certain MICA alleles and genotypes in the study population.

The putative consequences of MICA polymorphisms in the development of IPF are presently unclear. An amino acid substitution in MICA at position 129 in the  $\alpha 2$  domain has been shown to affect NKG2D binding (Steinle et al. 2001). However, no differences in the frequency of high and low affinity MICA variants for NKG2D were found between IPF patients and healthy controls. Nevertheless, numerous polymorphic nucleotides exist within exons 2–4 of the MICA gene, where the three extracellular domains of the molecule are encoded (Robinson et al. 2005). These polymorphisms may also lead to different degree of binding affinity to NKG2D (Steinle et al. 2001) or abnormal expression (Suemizu et al. 2002). Furthermore, MICA polymorphisms may influence not only its binding to the NKG2D but also the release of the soluble form of MICA from the cell surface which in turn down-regulates the activity of NKG2D by promoting its internalization and degradation (Tamaki et al. 2008). In this context, an important finding of this study was that our patients with IPF displayed a lower percentage of lung cells having the NKG2D receptor as well as a significant decrease of the number of receptors per cell. This decrease may be at least partially related to the presence of sMICA. As mentioned, this deficiency may account at least partially for the persistence of fibroblasts in the fibroblastic foci, a process that has been associated with the inexorable progression of the disease (Selman et al. 2004). Additionally, there is evidence that TGF- $\beta 1$ , a potent fibrogenic mediator, can suppress NK lytic activity by down-modulating the expression of NKG2D (Lee et al. 2004). IPF is characterized by increased levels of lung TGF- $\beta 1$  (Khalil et al. 2001), suggesting that this mediator may also be involved in the decreased expression of this receptor observed in the lung immune cells of our patients.

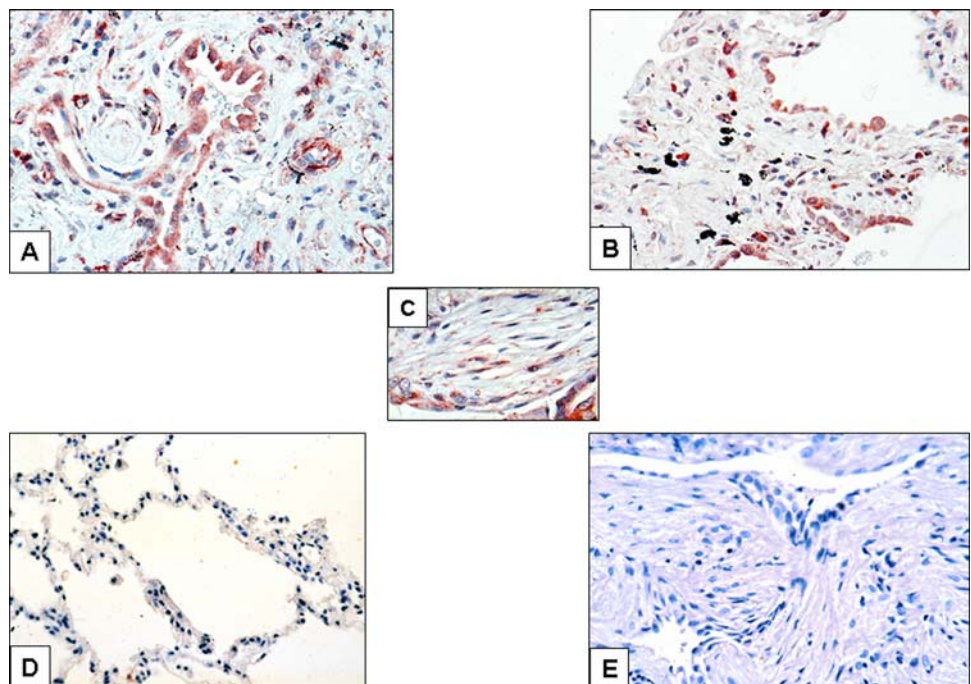




**Fig. 2** NKG2D expression on NK and CD8+ T cells from IPF and HP patients and healthy controls. BAL T cells were labeled with anti-CD3, CD8, CD16, CD56 and NKG2D mAb for multiparametric FACS analysis. NK (CD16+ CD56+) and CD3+ CD8+ T cells were gated according to their FSC and SSC profile (*dot plot*). *Numbers* indicate

percentage of cells in each gate. Each subpopulation was further analyzed for their expression of NKG2D (*histograms*). *Filled histograms* represent isotype controls and *empty histograms* represent the indicated antibody

**Fig. 3** Immunohistochemical detection of major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) in formalin-fixed, paraffin-embedded IPF and normal lung sections. *Panels a and b* show strong MICA immunostaining in alveolar epithelial cells, and some interstitial cells. *Panel c* fibroblastic focus in an IPF lung illustrating positive MICA staining. *Panel d* normal lungs showed no reactivity. *Panel e* negative control where the primary antibody was replaced by non-immune serum



Furthermore, it has been recently suggested that sustained expression of MICA and TGF- $\beta$  might lead to modulation of NKG2D with subsequent inhibition of NKG2D-dependent cytotoxicity (Zhang et al. 2008). Also, a recent report showed that reactive oxygen species have a major role in decreasing NKG2D expression on NK cells (Peraldi et al. 2009). Oxidative stress is an important pathological process in IPF (Kinnula et al. 2005).

In summary, this is the first study demonstrating that some polymorphisms of the MICA gene as well as an increased expression of MICA associated with downregulation of the receptor NKG2D are present in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. The effect may relate to T cell dysfunction in the lung microenvironment with the consequent evasion of abnormally activated epithelial cells and/or fibroblasts to innate immune defense mechanisms. However, some NKG2D ligands are constitutively expressed in a restricted number of normal cells, suggesting that may be involved in some unique tissue-specific functions that do not necessarily relate to their role in immune surveillance. Further studies are necessary to reveal the precise role of these abnormalities in the pathogenesis of IPF.

**Acknowledgments** This study was supported by Universidad Nacional Autónoma de México, Grant SDI.PTID.05.6.

## References

- American Thoracic Society (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 161:646–664
- Arguello JR, Little AM, Bohan E, Goldman JM, Marsh SGE, Madrigal JA (1998) High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). *Tissue Antigens* 52:57–66
- Barrera L, Mendoza F, Zuñiga J, Estrada A, Zamora AC, Melendro EI, Ramírez R, Pardo A, Selman M (2008) Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 177:44–55
- Boissel N, Rea D, Tieng V, Dulphy N, Brun M, Cayuela JM, Rousselot P, Tamouza R, Le Bouteiller P, Mahon FX, Steinle A, Charron D, Dombret H, Toubert A (2006) BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J Immunol* 176:5108–5116
- Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D (2006) NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 291:L222–L231
- Disis ML, De la Rosa C, Goodell V, Kuan LY, Chang J, Kuus-Reichel K, Clay TM, Lyerly HK, Bhatia S, Ghanekar SA, Maino VC, Maecker HT (2006) Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *J Immunol Methods* 308:13–18
- Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A, Weller M, Friese MA (2006) TGF- $\beta$  and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 129:2416–2425
- Falfán-Valencia R, Camarena A, Juárez A, Becerril C, Montaña M, Cisneros J, Mendoza F, Granados J, Pardo A, Selman M (2005) Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet* 118:235–244
- Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien SJ, Carrington M (2006) Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two North American populations. *Human Immunol* 67:152–158
- Groh V, Brühl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T (2003) Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9452–9457
- Groh V, Li YQ, Cioca D, Hunder NN, Wang W, Riddell SR, Yee C, Spies T (2005) Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6461–6466
- Hui J, Palmer LJ, Jamesw AL, Musz AW, Beilby JP (2006) Alu-MICB dimorphism within the class I region of the major histocompatibility complex is associated with asthma and airflow obstruction in the Busselton population. *Clin Exp Allergy* 36:728–734
- Katzenstein AL, Myers JL (1998) Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1301–1315
- Katzenstein AL, Mukhopadhyay S, Myers JL (2008) Diagnosis of usual interstitial pneumonia and distinction from other fibrosing interstitial lung diseases. *Hum Pathol* 39:1275–1294
- Khalil N, Parekh TV, O'Connor R, Antman N, Kepron W, Yehaulaeshet T, Xu YD, Gold LI (2001) Regulation of the effects of TGF- $\beta$  1 by activation of latent TGF- $\beta$  1 and differential expression of TGF- $\beta$  receptors (T  $\beta$  R-I and T  $\beta$  R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 56:907–915
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA (2006) Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13180–13185
- Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD (2005) Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 172:417–422
- Komatsu-Wakui M, Itsokikuanwaaga YK, Leelayuwat C, Kashiwase K, Tanaka S, Moriyama H, Nakajima F, Park MH, Jia GJ, Chimge N-O, Sideltseva EW, Juji T (2001) Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. *Tissue Antigens* 57:1–8
- Lawson WE, Loyd JE (2006) The genetic approach in pulmonary fibrosis: can it provide clues to this complex disease? *Proc Am Thorac Soc* 3:345–349
- Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS (2004) Elevated TGF- $\beta$ 1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* 172:7335–7340
- Lü M, Xia B, Li J, Ye M, Zhang X, Tan Q (2006) MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Immunol* 120:199–204
- Madjd Z, Spendlove I, Moss R, Bevin S, Pinder SE, Watson NFS, Ellis I, Durrant LG (2007) Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immunol* 7:17
- Muñoz-Saá I, Cambra A, Pallarés L, Espinosa G, Juan A, Pujalte F, Matamoros N, Mila J, Julia MR (2005) Allelic diversity and affinity variants of MICA are imbalanced in Spanish patients with Behcet's disease. *Scand J Immunol* 64:77–82
- Osaki T, Saito H, Yoshikawa T, Matsumoto S, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M (2007) Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 13:382–387
- Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Meléndez J, Pérez J, Ruíz V, Segura L, Sznajder JI, Selman M (1998) Gelatinases A and B are upregulated in lung rats by subacute hyperoxia. Pathogenetic implications. *Am J Pathol* 153:833–844

- Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, Metivier F, Randoux C, Kossari N, Guérin A, Geffroy S, Delavaud G, Marin-Esteban V, Glotz D, Charron D, Toubert A (2009) Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *J Immunol* 182:1696–1705
- Pérez-Rodríguez M, Argüello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SGE, Madrigal JA (2002) Further polymorphism of the MICA gene. *Eur J Immunogenetics* 29:35–46
- Piancatelli D, Del Beato T, Oumhani K, El Aouad R, Adorno D (2005) MICA polymorphism in a population from north Morocco, Metalsa Berbers, using sequence-based typing. *Human Immunol* 66:931–936
- Poggi A, Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Musso A, Zocchi MR (2007) NKG2D and natural cytotoxicity receptors are involved in natural killer cell interaction with self-antigen presenting cells and stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1109:47–57
- Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pistoia V (2004) Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 6:558–568
- Robinson P, Stuber D, Deryckere F, Tedbury P, Lagrange M, Orfanoudakis G (2005) Identification using phage display of peptides promoting targeting and internalization into HPV-transformed cell lines. *J Mol Recognit* 18:175–182
- Selman M, Pardo A (2006) Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 3:364–372
- Selman M, King TE, Pardo A (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134:136–151
- Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP 3rd (2004) Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 64:405–430
- Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A (2006) Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173:188–198
- Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J, Gaxiola M, Pérez-Padilla R, Navarro C, Richards T, Dauber J, King TE Jr, Pardo A, Kaminski N (2007) Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS ONE* 2(5):e482
- Skov S, Terndrup PM, Andresen L, Thor SP, Woetmann A, Ødum N (2005) Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res* 65:11136–11145
- Stastny P (2006) Introduction: MICA/MICB in innate immunity, adaptive immunity, autoimmunity, cancer, and in the immune response to transplants. *Hum Immunol* 67:141–144
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T (2001) Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53:279–287
- Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H (2002) A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2971–2976
- Tamaki S, Kawakami M, Yamanaka Y, Shimomura H, Imai Y, Ishida JI, Yamamoto K, Ishitani A, Hatake K, Kirita T (2008) Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Immunol* 130:331–337
- Thannickal VJ, Horowitz JC (2006) Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 3:350–356
- Törn C, Gupta M, Zake LN, Sanjeevi CB, Landin-Olsson M (2003) Heterozygosity for MICA5.0/MICA5.1 and HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 are independent genetic risk factors for latent autoimmune diabetes in adults. *Human Immunol* 64:902–909
- Waldhauer I, Steinle A (2006) Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 66:2520–2526
- Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic S, Rammensee HG, Steinle A (2008) Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 68:6368–6376
- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z (2005) Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166:1321–1332
- Wu J, Groh V, Spies T (2002) T Cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol* 169:1236–1240
- Xu X, Rao G, Gaffud MJ, Ding HG, Maki G, Klingemann H-G, Groh V, Spies T, Sp Caillat-Zucman, Gattuso P, Plate J, Prinz RA (2006) Clinicopathological significance of major histocompatibility complex class I-related chain A and B expression in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2704–2712
- Zhang T, Barber A, Sentman CL (2006) Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor. *Cancer Res* 66:5927–5933
- Zhang S, Hüb S, Sène D, Penfornis A, Bresson-Hadni S, Kantelip B, Caillat-Zucman S, Vuitton DA (2008) Expression of major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor-beta in the liver of humans with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites? *J Infect Dis* 197:1341–1349
- Zou Y, Mirbaha F, Stastny P (2006) Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK Cell killing. *Human Immunol* 67:183–187

# ÍNDICE

Lista de abreviatura

Abstract

Resumen

1. Fibrosis pulmonar idiopática

1.1 Historia

1.2 Epidemiología

1.3 Etiología

1.4 Patogénesis

2. Aspectos inmunológicos en la FPI

3. Susceptibilidad genética en FPI

3.1 FPI en familias (mapeo genético)

3.2 FPI esporádica estudios de casos control (Genes candidatos)

4. Genes MHC relacionados a clase I (MIC)

4.1 Complejo principal de histocompatibilidad

4.2 Localización y estructura de MICA

4.3 Función biológica de MICA

4.4 Polimorfismo de MICA

4.5 MICA y enfermedad

4.5.1 MICA y cáncer (Mecanismos de evasión inmunológica)

5. NKG2D

6. Justificación

7. Hipótesis

8. Objetivo general

8.1 Objetivos particulares

9. Material y métodos

9.1 Cálculo del tamaño de la muestra



- 9.2 Población en estudio
  - 9.2.1 Pacientes con fibrosis pulmonar idiopática
  - 9.2.2 Grupo control
- 10. Tipificación molecular de los alelos MICA
  - 10.1 Extracción de DNA
  - 10.2 Amplificación de los exones 2-3 y 4-5 de MICA por PCR
- 11. Análisis conformacional de cadenas de referencia RSCA
- 12. Tipificación molecular de HLA-B
- 13. Inmunohistoquímica de MICA
- 14. Cuantificación de MICA soluble
- 15. Citometría de flujo para NKG2D
- 16. Análisis estadístico
- 17. Resultados
  - 17.1 Asociación de MICA con FPI
  - 17.2 Distribución de alelos MICA según la afinidad para NKG2D
  - 17.3 MICA / HLA-B en FPI y controles
  - 17.4 MICA soluble en plasma de pacientes FPI y controles
  - 17.5 Inmunolocalización de MICA en tejidos pulmonares
  - 17.6 Determinación de NKG2D en células de LBA
- 18. Discusión
- 19. Conclusiones
- 20. Bibliografía

Palabras clave:

Fibrosis pulmonar idiopática, Susceptibilidad genética, Genes MHC relacionados a clase I (MIC), MICA, Complejo principal de histocompatibilidad, Polimorfismo, NKG2D, Análisis conformacional de cadenas de referencia, RSCA, HLA-B, LBA.

## Lista de abreviaturas.

|        |   |
|--------|---|
| A      | Adenina   |
| ACCP   | American College of Chest Physicians                        |
| ACE    | Enzima convertidora de angiotensina                         |
| ADAM   | Proteínas con dominios de metaloproteinasas y desintegrinas |
| AEC    | 3-amino--9-etil-carbazol                                    |
| ASHI   | American Society for Histocompatibility and Immunogenetics  |
| ATS    | American Thoracic Society                                   |
| B2M    | B-2-microglobulina  |
| BAT    | Transcritos asociados a HLA-B                               |
| Bf     | Factor B  |
| C      | Citosina  |
| C2     | Factor 2 del complemento                                    |
| C4     | Factor 4 del complemento                                    |
| CD4    | Marcador de Linfocitos T cooperadores                       |
| CD8    | Marcador de Linfocitos T citotóxicos                        |
| CXCR   | Receptor de quimiocinas CXC                                 |
| DAP10  | Proteína adaptadora 10                                      |
| DKC    | Disqueratosis congénita                                     |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                                   |
| dNTP's | Mezcla de desoxinucleótidos                                 |
| EBV    | Virus de Epstein Barr                                       |
| ELISA  | Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima                     |
| EPIDs  | Enfermedades pulmonares intersticiales difusas              |
| ERS    | European Respiratory Society                                |
| f.g    | Frecuencia génica   |
| FACS   | Fluorescence Activated Cell Sorting                         |
| FPI    | Fibrosis pulmonar idiopática                                |
| G      | Guanina   |
| H      | Alta afinidad   |
| HFE    | Gen de la hemocromatosis                                    |
| HLA    | Antígenos leucocitarios humanos                             |
| HLA-A  | HLA locus A   |
| HLA-B  | HLA locus B   |
| HLA-DM | HLA locus DM  |
| HLA-DO | HLA locus DO  |
| HLA-DP | HLA locus DP  |
| HLA-DQ | HLA locus DQ  |
| HLA-DR | HLA locus DR  |
| hrs    | Horas   |
| HSP 70 | Proteínas de choque térmico                                 |
| IC     | Intervalo de confianza                                      |
| IFN    | Interferón  |
| IIPs   | Neumonías intersticiales idiopáticas                        |
| IL     | Interleucina  |
| INER   | Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias            |

|          |  |
|----------|--|
| L        | Baja afinidad  |
| LBA      | Lavado bronquioalveolar  |
| LRC      | Complejo de receptores de leucocitos                                       |
| LST-1    | Transcrito específico de leucocitos  |
| LT       | Linfotoxina  |
| Mb       | Megabases  |
| MHC      | Complejo Principal de Histocompatibilidad                                  |
| MIC      | MHC relacionada a clase I  |
| MICA     | MHC relacionada a clase I-A  |
| MICA2-3F | Primer sentido para exón 2-3 de MICA                                       |
| MICA2-3R | Primer anti-sentido para exón 2-3 de MICA                                  |
| MICA4-5F | Primer sentido para exón 4-5 de MICA                                       |
| MICA4-5R | Primer anti-sentido para exón 4-5 de MICA                                  |
| MICB     | MHC relacionada a clase I-B  |
| min      | Minuto   |
| µl       | Microlitro   |
| ml       | Mililitro  |
| mM       | Milimolar  |
| MMP      | Metaloproteinasa de matriz   |
| n        | Número de la muestra   |
| ng       | Nanogramos   |
| NH       | Neumonitis por hipersensibilidad   |
| NK       | Células asesinas naturales   |
| NKC      | Complejo de NK   |
| NKG2D    | Receptor de activación similar a lectinas de tipo C                        |
| nm       | Nanómetros   |
| OR       | Proporciones de probabilidad (Odds Ratio)                                  |
| Pb       | Pares de bases   |
| PBS      | Solución buffer de fosfatos  |
| Pc       | P corregida  |
| PCR      | Reacción en cadena de la polimerasa  |
| Pg       | Picogramos   |
| RMF      | Referencias marcadas con fluorescencia                                     |
| RNA      | Ácido ribonucleico   |
| rpm      | Revoluciones por minuto  |
| RSCA     | Análisis conformacional de cadenas de referencia                           |
| SFTPC    | Gen de la proteína C del surfactante                                       |
| SNPs     | Polimorfismos de un solo nucleótido  |
| SP       | Proteína de surfactante  |
| SSP      | Primer secuencia específica  |
| T γ/δ    | Células T Gamma- Delta   |
| T        | Timidina   |
| TERC     | Componente de ARN que proporciona la plantilla en la síntesis del telómero |
| TERT     | Proteína que cataliza la adición de repeticiones del telómero              |
| TGF-β    | Factor de crecimiento transformante beta                                   |
| Th1      | Respuesta ayudadora de tipo 1  |

|     |                               |
|-----|-------------------------------|
| Th2 | Respuesta ayudadora de tipo 2 |
| TNF | Factor de necrosis tumoral    |
| U   | Unidades                      |
| UV  | Luz ultravioleta              |

## **Abstract**

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal lung disorder of unknown etiology. IPF is likely the result of complex interrelationships between environmental and host factors, although the genetic risk factors associated to the development of the disease are presently uncertain. Because we have found that some MHC polymorphisms confer susceptibility to IPF, in the present study we aimed to evaluate the role of the MHC class I chain-related gene A (MICA) in the risk to develop the disease. MICA molecular typing was done by reference strand mediated conformation analysis in a cohort of 80 IPF patients and 201 controls. In addition, the lung cellular source of the protein was examined by immunohistochemistry, the expression of the MICA receptor NKG2D in lung cells by flow cytometry, and soluble MICA in plasma by ELISA. A significant increase of MICA\*001 ( $p=0.03$ , OR=2.91, 95% CI=1.04-8.25) was observed in the IPF cohort. Likewise, the frequency of the MICA\*001/\*00201 genotype was significantly increased in patients with IPF compared with the healthy controls ( $p=0.01$ , OR=4.72, 95% CI=1.15-22.51). Immunoreactive MICA was localized in alveolar epithelial cells and fibroblasts from IPF lungs that exhibited an intense cytoplasmic staining while the protein was not noticed in normal lungs. Soluble MICA was detected in 35% of IPF patients compared with 12% of control subjects ( $p=0.0007$ ). The expression of NKG2D was significantly decreased in  $\gamma\delta$  T cells and natural killer cells obtained from IPF lungs. Our findings indicate that MICA polymorphisms and abnormal expression of the MICA receptor NKG2D might contribute to IPF susceptibility.

## Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), es una neumopatía intersticial crónica de etiología desconocida caracterizada por daño y activación de células epiteliales alveolares, proliferación de fibroblastos, y acumulación exagerada de matriz extracelular en el parénquima pulmonar. La susceptibilidad a desarrollar FPI está probablemente determinada por factores genéticos y ambientales, aunque, hasta ahora, el posible gen o genes implicados permanecen sin ser definidos. Cuando las células epiteliales se someten a estrés físico o químico y se compromete su función, deben ser eficazmente eliminadas para controlar la inflamación y promover la reparación celular. Uno de los mecanismos de detección y eliminación se relaciona con la activación de células inmunes e involucra a la proteína MHC relacionada a clase I, llamada MIC (por sus siglas en inglés *Major histocompatibility complex (MHC) class I chain related*) y al receptor de activación similar a lectinas de tipo C denominado NKG2D. En este contexto, y tomando en consideración que la lesión y activación aberrante de las células epiteliales es uno de los principales mecanismos patogénicos de la FPI, y que MIC también se expresa en fibroblastos, otra célula crítica en el desarrollo de la fibrosis, consideramos que el sistema MIC/NKG2D era un candidato importante para ser estudiado en este padecimiento.

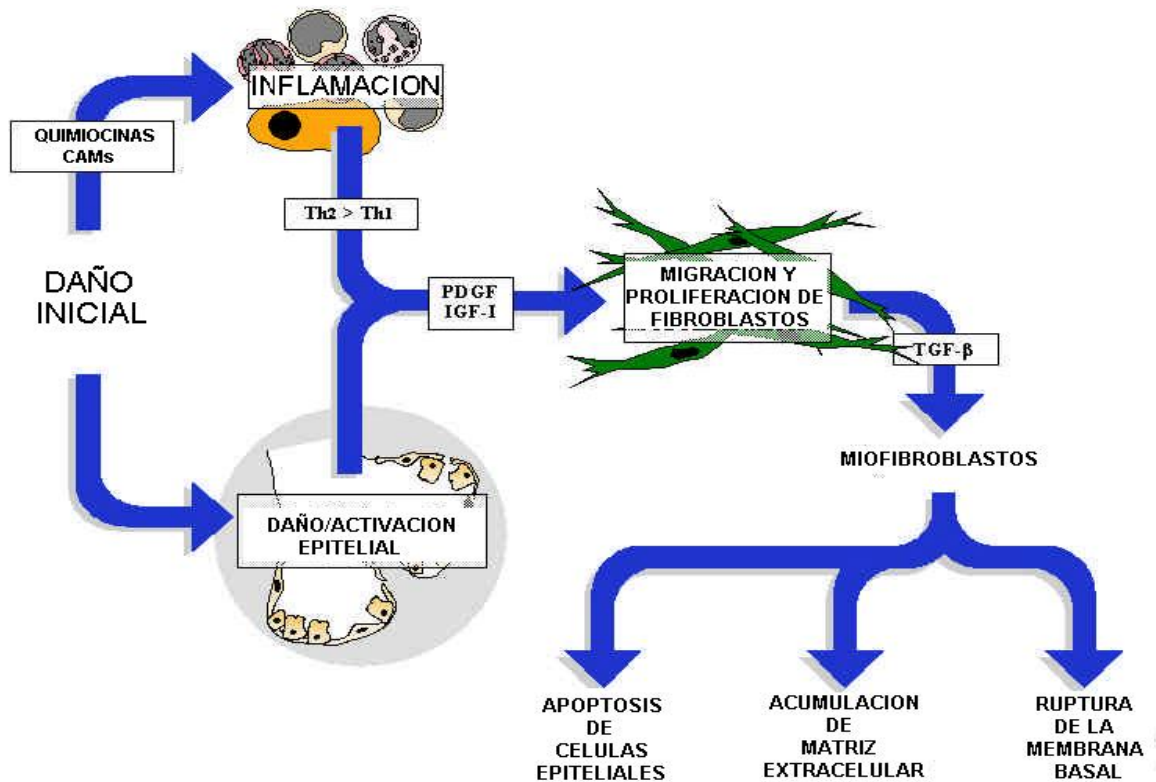
En este trabajo de tesis se exploraron los polimorfismos genéticos de MICA mediante tipificación molecular realizada con la técnica de RSCA (*reference strand mediated conformation analysis*) en una cohorte de 80 pacientes con FPI y 201 controles. Adicionalmente se tipificó el locus HLA-B en 45 pacientes y 70 controles. Se exploró la expresión de la proteína por inmunohistoquímica en tejido pulmonar y se determinaron por ELISA los niveles de MICA soluble en el plasma de pacientes con FPI y controles; asimismo, se cuantificó el receptor de MICA (NKG2D) por citometría de flujo. Nuestros resultados mostraron un incremento significativo del alelo MICA\*001 ( $pC=0.03$ ,  $OR=2.91$ ,  $95\% CI=1.04-8.25$ ) y del genotipo MICA\*001/\*00201 ( $pC=0.01$ ,  $OR=4.72$ ,  $95\% CI=1.15-22.51$ ) en los pacientes con FPI comparado con los controles sanos. MICA se observó en fibroblastos y células del epitelio alveolar en pulmones de pacientes con FPI, pero no en pulmones sanos. El análisis citométrico realizado con células pulmonares obtenidas de lavado bronquioalveolar mostró un decremento significativo del porcentaje de células T  $\gamma\delta$  y NK que expresaban NKG2D en pacientes con FPI. Por otro lado, MICA soluble se detectó en el 35% de los pacientes en comparación con el 12% de los sujetos control ( $p = 0.0007$ ). Estos hallazgos indican que algunos polimorfismos de MICA y una expresión anormal de se receptor NKG2D pueden contribuir a la susceptibilidad y desarrollo de la FPI.

## 1. Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

La FPI es la más común de las neumopatías intersticiales idiopáticas y, de hecho, la más agresiva de todas las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPIDs) (1). Sus mecanismos patogénicos se desconocen, pero durante muchos años se consideró que se trataba de una inflamación crónica que no se resolvía, lo que provocaba la reacción fibrótica. Sin embargo, recientemente se ha planteado que la inflamación no desempeña un papel importante en la patogénesis de la FPI sino que este padecimiento es más bien una enfermedad “epitelial-fibroblástica” (2). En este contexto, se ha postulado la existencia de al menos 2 vías diferentes para el desarrollo de fibrosis pulmonar (3, 4):

a) La vía inflamatoria, que participa en las EPIDs asociadas al uso de diferentes medicamentos, exposición a agentes ocupacionales y/o ambientales y enfermedades autoinmunes, entre otras. En estos padecimientos se puede identificar claramente una fase inicial de inflamación al que le sigue una fase tardía de fibrosis.

b) La vía epitelial/fibroblástica, que participa en la patogenia de la FPI. De acuerdo con este paradigma, la lesión y activación epiteliales desempeñan un papel fundamental en orquestar la respuesta fibrótica sin participación de la inflamación (2) **(Figura 1)**



**FIGURA 1.** Esquema hipotético de las dos vías que conducen a fibrosis pulmonar (3).

## 1.1 Historia

En general se considera que los doctores Louis Hamman y Arnold Rich fueron los primeros en describir a la FPI como una nueva entidad clínica y patológica en los años de 1933, 1935 y 1944 (5-7). Sin embargo, existen reportes previos en los que se reportan datos de autopsias consistentes con FPI; estas descripciones se realizaron en 1872 por von Buhl; en 1898 por Rindfleisch; en 1907 por Sandoz, y 1912 von Hanseemann.

La principal contribución de Hamman y Rich fue el reconocimiento y la descripción detallada de los rasgos clínicos y patológicos de una forma de enfermedad pulmonar a la que ellos llamaron fibrosis pulmonar intersticial difusa aguda. Esta



descripción publicada por Hamman y Rich ayudó a identificar casos adicionales de FPI (8). Los primeros 3 pacientes fueron tratados en el Hospital de John Hopkins entre los años de 1931 a 1933, por disnea severa y cianosis, los cuales fallecieron entre tres semanas a tres meses después de ingresar al hospital. En la autopsia los pulmones mostraron fibrosis intersticial severa a la que se conoció durante dos décadas como síndrome de Hamman y Rich (9). Este padecimiento recibió múltiples nombres que causaban muchas confusiones en los criterios diagnósticos y terapéuticos hasta que a fines de los años 90's se unificó su denominación a FPI. En los años 2000 y 2002, a través de un consenso internacional con la participación de las asociaciones: *American Thoracic Society*, *European Respiratory Society*, y *American College of Chest Physicians* se establecieron los criterios diagnósticos definitivos (1).

## **1.2 Epidemiología de la FPI**

La incidencia y prevalencia de la FPI ha sido difícil de determinar debido a que los criterios diagnósticos no fueron uniformes hasta hace algunos años (10). Sin embargo se estima que la enfermedad afecta al menos a 5 millones de personas en todo el mundo. Una de la primeras evaluaciones en 1972 sugirió que la FPI tenía una prevalencia de 3 a 5/100,000 habitantes (9). Esta enfermedad se presenta por todo el mundo y no tiene predilección étnica.

La enfermedad ocurre generalmente después de los 50 años de edad y dos tercios de los pacientes son mayores de 60 años (2, 4, 10, 11).

Los pacientes afectados comúnmente son más hombres que mujeres (2:1), con edad promedio al momento del diagnóstico de 66 años (12). Recientemente, en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) se reportó que la FPI tiene una prevalencia de 14.0 por 100,000 habitantes con una incidencia de 6.8/100,000 (13). Como se mencionó, la prevalencia de esta enfermedad aumenta significativamente con la edad pasando de 0.8 por 100,000 en sujetos entre 18 y 34 años a 64.7 por 100,000 en aquellos mayores de 75 años.

La mortalidad por FPI se ha incrementado. En un estudio reciente que abarcó causas de muerte entre los años 1992-2003 en EUA, la mortalidad por FPI ajustada por edad se incrementó 28.4% en hombres y 41.3% en mujeres (14).

La enfermedad ocurre mayoritariamente en forma esporádica (97% de los casos) aunque en un pequeño porcentaje se observa en diferentes miembros de una misma familia, afectando fundamentalmente hermanos (10).

Marshall y colaboradores estimaron que en el Reino Unido, los casos familiares explican del 0.5-2.2 % de todos los casos con FPI, con una prevalencia de 1.34 casos por millón. Loyd recientemente sugirió que la verdadera frecuencia de FPI familiar pudiera ser bastante más alta. El autor relató que, en el programa de trasplante pulmonar Vanderbilt, 9 de 47 individuos (el 19 %) que se sometieron a trasplante mostraron una historia familiar positiva (15).

### **1.3 Etiología**

El término "idiopática" se utiliza porque a la fecha no se ha determinado la causa de esta enfermedad. La FPI es muy probablemente el resultado de una combinación de predisposición genética e influencia ambiental (16).

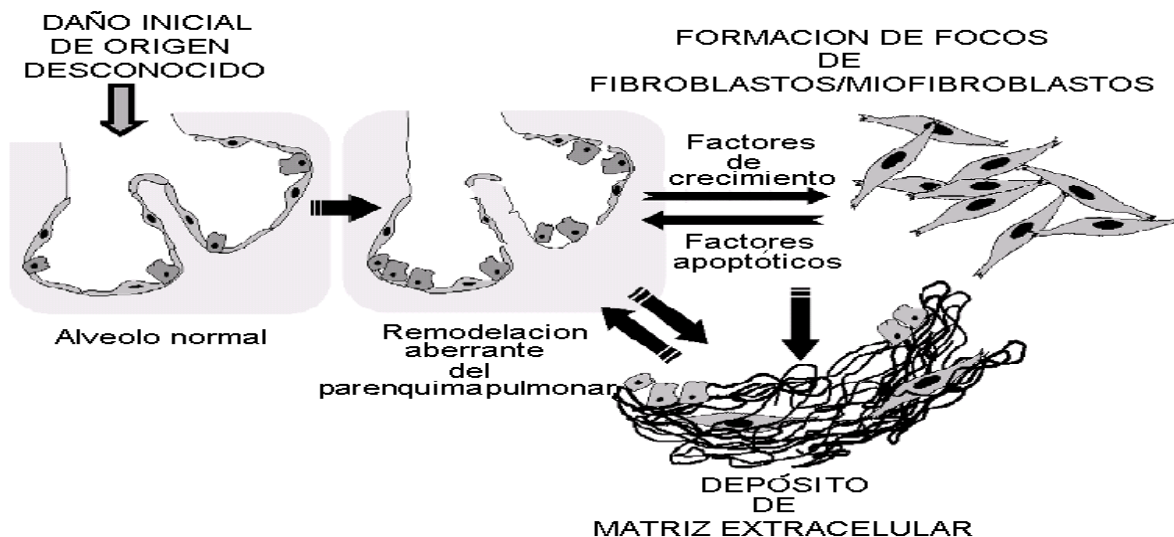
En relación a los posibles factores ambientales, diversos estudios epidemiológicos han sugerido una relación entre exposiciones ambientales y la FPI. Entre ellos destacan la exposición a polvos de madera y metales, y particularmente el tabaquismo (11, 17). En este contexto, estudios realizados tanto en la enfermedad esporádica como familiar han sugerido que el hábito de fumar cigarrillos incrementa el riesgo a desarrollar FPI (17, 18). Adicionalmente, algunas infecciones virales, como por ejemplo con el virus Epstein Barr se han asociado con un mayor riesgo, pero a la fecha los resultados son escasos y contradictorios (2).

### **1.4 Patogénesis**

Los mecanismos patogénicos que participan en el desarrollo de la FPI no se conocen con precisión. En los últimos años se ha sugerido que la enfermedad se origina de múltiples focos microscópicos de daño y activación epitelial. Las células epiteliales alveolares activadas son responsables del incremento de fibroblastos en el pulmón, a través de por lo menos 3 mecanismos: a) liberación de factores que inducen migración y proliferación de fibroblastos residentes; b) liberación de agentes quimiotácticos de fibrocitos (células circulantes precursoras de fibroblastos) y c) a través de un proceso conocido como transición epitelio-

mesénquima (19, 20). Asimismo, participan en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos a través de la secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ).

En este microambiente, los focos de fibroblastos/miofibroblastos secretan cantidades excesivas de componentes de la matriz extracelular, inducen apoptosis de las células epiteliales y ruptura de las membranas basales lo que en su conjunto conduce la destrucción de la arquitectura de parénquima pulmonar (21-23) (**Figura 2**).



**FIGURA 2.** Esquema hipotético de los principales mecanismos patogénicos en la FPI (22).

El perfil transcripcional revelado por microarreglos de oligonucleótidos apoya la hipótesis del papel de las células epiteliales y fibroblastos en la patogénesis de la FPI.

La comparación de la expresión de genes en pulmones de pacientes con FPI y neumonitis por hipersensibilidad (NH) (enfermedad inflamatoria que puede

progresar a la fibrosis), mostró que esta última se caracteriza por la sobre-expresión de numerosas citocinas y quimiocinas y sus receptores así como de genes relacionados con la activación de células T, mientras que la FPI se distingue por la expresión de genes de activación epitelial y de miofibroblastos así como de remodelación tisular (24).

## **2. Aspectos inmunológicos en la FPI**

El complejo de células y factores humorales que es conocido colectivamente como sistema inmunológico puede ser dividido en dos tipos interrelacionados: la inmunidad innata (natural) y la inmunidad adquirida.

El primer sistema funcional como tal, es conocido como inmunidad innata, el cual comprende a un gran número de diferentes poblaciones celulares, como lo son: células epiteliales, monocitos, macrófagos, células dendríticas, leucocitos polimorfonucleares (PMN), células asesinas naturales (NK), y varias subpoblaciones linfocitarias que funcionan como un puente entre la inmunidad innata y adquirida como lo son los linfocitos B CD5 y linfocitos T  $\gamma\delta$ .

Dentro de este tipo de inmunidad se incluyen un gran número de citocinas, ciertas enzimas como la lisozima, proteínas del sistema del complemento, proteína c reactiva, proteínas de unión a manosa, y CD14. Así también comprende algunos receptores celulares como lo son CD14, D35, CD21 y CD11b.

En relación a la inmunidad adquirida ésta compromete a un mecanismo único mediante el cual la diversidad genética presente en los receptores de células T

(TCR) y de células B (BCR) son esenciales para la gran variedad y especificidad de la respuesta inmune adquirida. Así, tales receptores se unen a antígenos previamente procesados, y si las señales de coestimulación están presentes ocurre una proliferación antígeno-específica de linfocitos generándose una respuesta inmune específica.

Por otro lado existen dos familias de moléculas que desempeñan papeles relevantes en la inmunidad adquirida: los productos de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y citocinas las cuales proporcionan un eslabón esencial para comunicación entre células. (25).

Las diferentes subpoblaciones de células T son reconocidas en gran parte por su expresión de proteínas de superficie (denominadas CD). Todas las células T expresan CD3, como parte del TCR y estas se su vez se subdividen en aquellas células que expresan CD4 y CD8. (26)

En los pasados 20 años, se ha demostrado que la respuesta efectora de las células T CD4 muestra una dicotomía con la participación de dos subpoblaciones conocidas como células T de tipo Th 1 (*T-helper 1*) y células T de tipo Th 2 (*T-helper 2*) (27,28)

Los dos tipos de respuesta, Th1 y Th2 se caracterizan por la producción de un patrón específico de citocinas. Los linfocitos Th1 secretan interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ), mientras que los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Los linfocitos Th1 participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada,

mientras que los linfocitos Th2 cooperan con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción de inmunoglobulina E (IgE) e IgG1 (en ratón) o IgG4 (en humanos), y promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mastocitos (29-31).

Las respuestas fuertemente polarizadas de tipo Th1 y tipo Th2 no sólo desempeñan papeles diferentes en la protección, si no que también pueden promover reacciones inmuno-patológicas diferentes (32).

Un cambio del perfil de citocinas de tipo Th1 a un tipo Th2, puede desempeñar un papel importante en la progresión de la fibrosis. Las citocinas de tipo Th2 generalmente son activadoras de fibroblastos y pueden promover el depósito de matriz extracelular. Por el contrario, un perfil de citocinas de tipo Th1, en particular IFN- $\gamma$ , parece ejercer efectos antifibróticos inhibiendo la activación de miofibroblastos, una acción que probablemente está relacionada con el bloqueo de la señalización de TGF- $\beta$ 1 (33). En este contexto, se ha observado que los pacientes con FPI presentan un perfil de citocinas de tipo Th2, lo que sugiere que este desequilibrio puede contribuir a fibrogénesis (33). En particular, se ha encontrado que las células epiteliales alveolares dañadas liberan IL-4, y no expresan IFN- $\gamma$ , lo que en conjunto favorece la migración y proliferación de fibroblastos y la acumulación de la matriz extracelular. En contraste, las células epiteliales de los pulmones de pacientes con sarcoidosis o neumonitis por hipersensibilidad (padecimientos inflamatorios que pueden curar o eventualmente progresar a la fibrosis) muestran la expresión de ambas citocinas (34).

Asimismo, los niveles de IL-4 se encuentran aumentados en los fluidos de LBA de pacientes con FPI (35). Se ha sugerido que esta interleucina es casi dos veces más potente como mediador profibrótico que el TGF- $\beta$  (36).

Por otro lado, se han demostrado un papel importante de IL-13 en la patogénesis de la fibrosis pulmonar experimental, aunque su posible implicación en la FPI se desconoce. La sobreexpresión de IL-13 en el pulmón provoca fibrosis sub-epitelial en vía aérea de ratones, esto en ausencia de cualquier estímulo inflamatorio adicional, mientras que el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-13 marcadamente reduce el depósito de colágena en los pulmones de animales desafiados con *A. fumigatus* conidia o bleomicina (37, 38), IL-13 puede servir como activador indirecto de TGF  $\beta$ , y es potente estimulador de las metaloproteinasas de matriz 2, 9, 13 y 14 (39).

El TGF- $\beta$  1 es un mediador fundamental en la reparación normal de las heridas, así como en el desarrollo de fibrosis. La producción en exceso de TGF- $\beta$ 1 latente y su posterior activación tiene un profundo efecto profibrosante incluyendo la inducción de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos así como de la exagerada producción de matriz extracelular en especial de colágenas fibrilares (40). La activación del TGF- $\beta$  es un elemento clave en la progresión de FPI.

En el pulmón adulto normal en humanos, la expresión de TGF- $\beta$ 1 se localiza principalmente en macrófagos alveolares, mientras que en la FPI es principalmente sintetizado por las células epiteliales alveolares (41). Más aún, se ha observado que el epitelio pulmonar en la FPI expresa la integrina alfa ( $\nu$ ) beta 6



el cual constituye uno de los principales mecanismos de activación de este factor (42).

### 3. Susceptibilidad genética en FPI

El desarrollo de la FPI es probablemente determinado por múltiples factores genéticos, en el que cada uno contribuye con modestos efectos sobre la predisposición a esta enfermedad (**Figura 3**). Probablemente, en combinación con los apropiados disparadores ambientales los individuos que poseen estos factores genéticos predisponentes pueden desarrollar FPI.

Varios polimorfismos de genes han sido estudiados en pacientes con FPI pero los resultados han mostrado asociaciones débiles o inexistentes. Además, en la mayoría de los casos los resultados no han sido corroborados en cohortes independientes (43).



**Figura 3.** El desarrollo da la FPI probablemente depende de múltiples factores, incluyendo la edad, susceptibilidad genética, factores ambientales, y tal vez la naturaleza del agente que causa el daño.

La evidencia más convincente de que la presencia de factores genéticos desempeña un papel en el desarrollo de la fibrosis, al menos en algunos casos, es la existencia de fibrosis pulmonar idiopática familiar (44, 45).

Otra observación que indica una base genética para el desarrollo de fibrosis pulmonar, es que no todos los humanos sometidos a distintos agentes agresores desarrollan el proceso patológico. Esto se ha descrito en exposiciones a partículas orgánicas e inorgánicas o por el uso de algunos medicamentos. En el caso de modelos experimentales se ha descrito que mientras que los ratones de la cepa C57BL desarrollan la fibrosis pulmonar en respuesta a la instilación con bleomicina los ratones BALBc son resistentes al daño.

Sin embargo, los estudios genéticos de la FPI han sido difíciles debido a los limitados casos familiares, inicio tardío de la enfermedad, heterogeneidad fenotípica, y una alta tasa de mortalidad. La identificación de marcadores genéticos que proporcionan susceptibilidad a la FPI y/o modifiquen su progresión son relevantes en el entendimiento de la patogénesis (46)

Diversas investigaciones han evaluado polimorfismos genéticos en la FPI. Los genes candidatos incluyen genes de citocinas, de proteínas del surfactante y de metaloproteinasas de matriz entre otros. Los estudios mas recientes en FPI familiar han demostrado una fuerte asociación con mutaciones en el gen de la proteína C del surfactante (47), así como con los genes TERC (componente de ARN que proporciona la plantilla para la síntesis del telómero) y TERT (proteína que cataliza la adición de repeticiones del telómero), unidades funcionales de un

complejo enzimático denominado telomerasa. Sin embargo estas mutaciones no se observan en casos esporádicos.

### **3.1 FPI en familias (mapeo genético)**

Aproximadamente uno de cada 50 pacientes con FPI tiene a un familiar en primer grado afectado. El modelo de herencia es más consistente con una enfermedad autosómica dominante con penetrancia incompleta.

La presentación clínica de FPI familiar es indistinguible de la FPI esporádica salvo que la edad de inicio tiende a ser más temprana (55 años contra 67 años) (48, 49). Como se mencionó, el análisis de ligamiento en familias ha mostrado mutaciones en dos tipos de genes, los de TERC y TERT y el de la proteína C del surfactante.

Armanios describió previamente a una familia con disqueratosis congénita autosómica dominante con haplo-insuficiencia de telomerasa debido a una mutación en TERT en la cual, cuatro de los siete individuos afectados fueron diagnosticados con la fibrosis pulmonar idiopática. Posteriormente Tsakiri y colaboradores secuenciaron TERT en una cohorte de 73 pacientes con FPI familiar e identificaron varias mutaciones; cinco mutaciones fueron heterocigotos en TERT y una en TERC. Las longitudes del telómero en los linfocitos de los individuos afectados eran significativamente menores cuando se compararon contra los controles sanos pareados por la edad.

Así, estos estudios demostraron que los sujetos con estas mutaciones muestran evidencia de acortamiento de telómeros así como una mayor susceptibilidad al desarrollo de FPI (48, 49)

Por otro lado, se ha encontrado que casi el 70 % de portadores de mutaciones en la telomerasa con más de 40 años de edad tienen alguna enfermedad pulmonar (48). En dos estudios más recientes los mismos grupos de investigación examinaron el largo de los telómeros en individuos con FPI esporádica y se encontró que cuando se compararon contra los controles sanos pareados por edad, los individuos con FPI tenían más cortos los telómeros en leucocitos obtenidos en sangre periférica (50, 51). En uno de ellos se reportó además que este acortamiento anormal existía en las células del epitelio alveolar (50).

En relación a la proteína C del surfactante, Thomas y colaboradores estudiando a 11 individuos de una familia afectada con FPI en cinco generaciones, identificaron una trasversión heterocigota en el exón 5 (+128 T por A) del gen de la proteína C del surfactante en todos los individuos enfermos. Esta mutación resulta en una sustitución de glutamina por leucina en una región muy conservada dentro del dominio carboxilo terminal del precursor de la proteína SP-C. Esta mutación puede producir una proteína no plegada, lo que altera su tráfico celular. Los autores observaron una distribución aberrante de la proteína SP-C en las células del epitelio alveolar de los individuos afectados (52).

Considerando el papel relevante de esta proteína en la integridad estructural del epitelio alveolar, sus modificaciones pueden proporcionar la susceptibilidad al

daño para los neumocitos de tipo II. Mutaciones en sitios de empalme del gen *SP-C* también han sido descritas en otras familias con este padecimiento (46). Es importante señalar que las mutaciones que afectan al gen de la proteína C del surfactante parecen estar implicadas en la susceptibilidad genética sólo de algunos casos de FPI familiar. La asociación de la mutación de genes *SP-C* con la FPI familiar sugiere que los genes implicados en el mantenimiento de la estructura y función del epitelio alveolar son importantes para el desarrollo de FPI.

### **3.2 FPI esporádica en estudios de casos control (Genes candidatos)**

Los estudios de casos y controles han sido ampliamente utilizados para determinar una asociación genética en casos esporádicos (43). En tales estudios, predomina la exploración de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés), en genes candidatos biológicamente importantes, se examinan en sujetos enfermos no relacionados y se comparan contra los sujetos sanos no relacionados (53).

A la fecha, los genes que más frecuentemente se han estudiado están relacionados con inflamación, como la interleucina (IL) 1 alfa, IL1B, IL12B, IL6, IL10, IL8, IL1RN (antagonista del receptor de la interleucina 1), TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), TNFRII (receptor II del factor de necrosis tumoral), LTA (linfotoxina alfa), receptor de quimiocinas CXCR1, CXCR2, IFN $\gamma$ , CR1 (receptor del complemento 1), proteínas del surfactante A1, A2, B, C y D, inhibidor del activador del plasminógeno-1, TGF $\beta$ 1 y la enzima convertidora de angiotensina I (43).

Algunas asociaciones reportadas son las siguientes: ILRN +2018 T (OR 3.8) Reino Unido, blancos (88/88); Italia, blancos (61/103), TNF $\alpha$  -308 A (OR 13.9) Reino Unido (88/88); Italia (61/103); Australia, blancos (22/140), CR1 +5507 (OR 6.2) Italia blancos (74/166), Utilizando una cohorte de mexicanos con FPI, Selman y colaboradores evaluaron los polimorfismos de genes *SP-A1*, *SP-A2*, *SP-B*, *SP-C*, y genes *SP-D*. El haplotipo 6A4 del gen *SP-A1* mostró asociación con pacientes no fumadores con FPI y el alelo 1580C del gen *SP-B* en pacientes con FPI fumadores (54).

En otro estudio más reciente realizado también en población mestiza mexicana se encontró una asociación de FPI con el genotipo 2G/2G de la metaloproteinasa de matriz-1 (colagenasa-1) (55).

En relación a los genes MHC y FPI, el estudio mas reciente indica que tres haplotipos pudieran estar involucrados y estos son HLA-DRB1\*0407-HLA-DQB1\*0302 (OR 2.49), HLA-DRB1\*1402-HLA-DQB1\*0301 (OR 5.48), HLADRB1\*0101-HLADQB1\*0501 (OR 3.66) (16).

#### **4. Genes MHC relacionados a clase I (MIC)**

##### **4.1 Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)**

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es la región más importante en el genoma de vertebrados en relación a infección y autoinmunidad, y es crucial en la inmunidad adaptativa e innata. Desde su descubrimiento en el ratón en 1936, el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se ha hecho una de las regiones

más intensamente estudiadas en el genoma de los vertebrados y posee los genes más polimórficos descubiertos a la fecha (56, 57). En el año 2003 se completó la secuencia ampliada del MHC como parte de la secuenciación del cromosoma 6 humano, y ahora se sabe que el MHC cubre un total de 7.6 Mb sobre este cromosoma (56, 58).

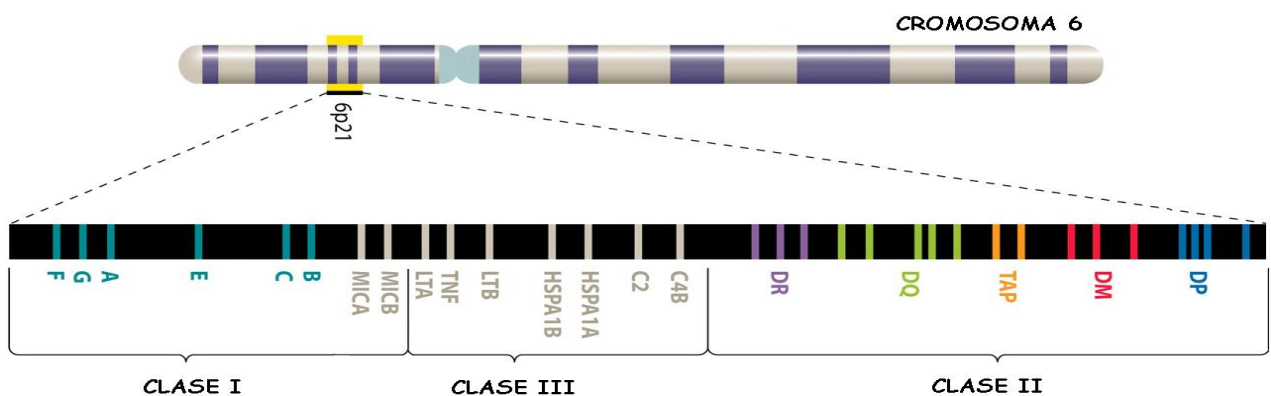
Aunque las moléculas MHC fueron al principio estudiadas por su capacidad de conferir tolerancia (histocompatibilidad) en los injertos de tejido, y más tarde en trasplantes de órganos, su función primaria es proporcionar protección contra patógenos. Esto se consigue a través de sofisticadas vías, mediante las cuales, las moléculas MHC de clase I presentan antígenos endógenos a los linfocitos T CD8 y las moléculas de clase II presentan antígenos exógenos a las células T CD4 (56).

Por convención se ha dividido al MHC en tres regiones contiguas. La mayor parte es centromérica en el cromosoma 6 (6p21.3), se denomina región de clase II y contiene 17 genes y pseudogenes conocidos. Contiguo a ésta se encuentra la región de clase III, que codifica varios de los componentes del sistema de complemento. Telomérica a la región de clase III se localiza la región de clase I, que codifica más de 18 genes y pseudogenes (57,59) (**Figura 4**).

El grupo de genes HLA de clase II comprende a los genes clásicos de clase II (*HLA-DP*, *-DQ*, *-DR* y pseudogenes) y los genes de clase II no clásicos (*HLA-DM* y *-DO*). Los genes clásicos se expresan sobre la superficie celular como proteínas heterodímeras formadas por sus respectivas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ; mismas que presentan antígenos a las células T CD4+. Los genes no clásicos de clase II no se

expresan en la superficie de la célula, pero forman complejos heterotetraméricos implicados en el cambio y cargado de péptidos sobre las moléculas clásicas de clase II (56). El grupo de genes HLA de clase III en una serie de genes intercalados entre la clase I y II. Algunos de estos genes, por ejemplo, los genes del complemento C4, C2, y factor B, desempeñan un papel en el sistema inmune innato (60). También se encuentran allí los genes para TNF- $\alpha$ , linfotoxinas  $\alpha$  y  $\beta$ , así como los genes para las proteínas de choque térmico, HSP 70-1 y HSP 70-2. **(Figura 4)**

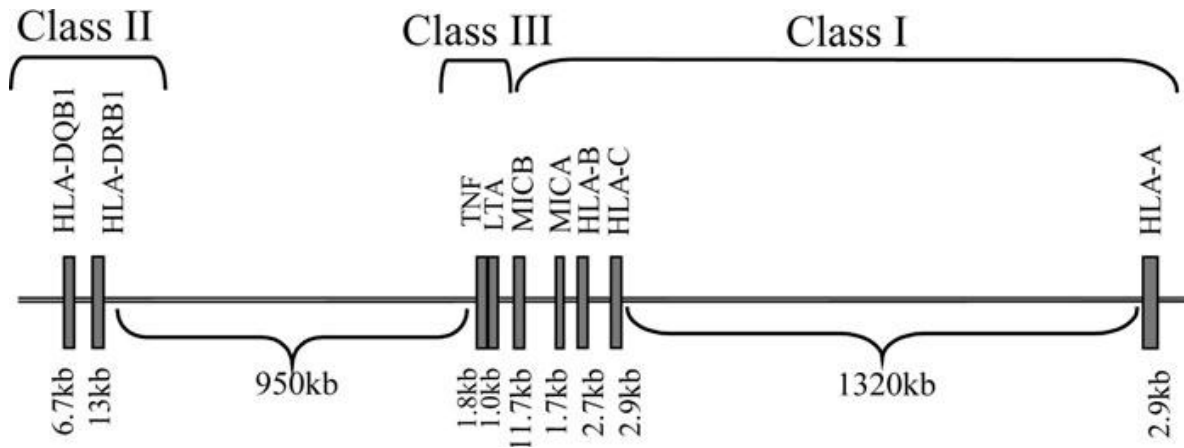
El grupo de genes HLA de clase I comprende a los genes HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B y -C), los genes no clásicos (HLA-E, -F, -G, HFE y 12 pseudogenes) así como a los genes MHC relacionados a clase I, conocidos como genes MIC (MICA, MICB, y 5 pseudogenes). Junto con la  $\beta$ -2 microglobulina, los productos de los genes clásicos de clase I presentan antígenos a las células T CD8 + y están implicados en la respuesta inmune mediada por las células NK **(Figura 4)**. Esta respuesta implica la interacción con receptores codificados en el complejo de receptores de leucocitos (LRC) y el complejo de NK (NKC).



**Figura 4.** Representación esquemática del Complejo principal de histocompatibilidad o MHC.







**Figura 6.** Representación esquemática de la localización del gen MICA dentro del MHC humano (68).

El gen de MICA está compuesto por 6 exones (69) que se transcriben dando como resultado una proteína con un tallo citoplasmático, una región transmembranal y 3 dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) (70) (**Figura 7**); exhibe un alto polimorfismo en la región de transmembrana y el dominio extracelular (71).

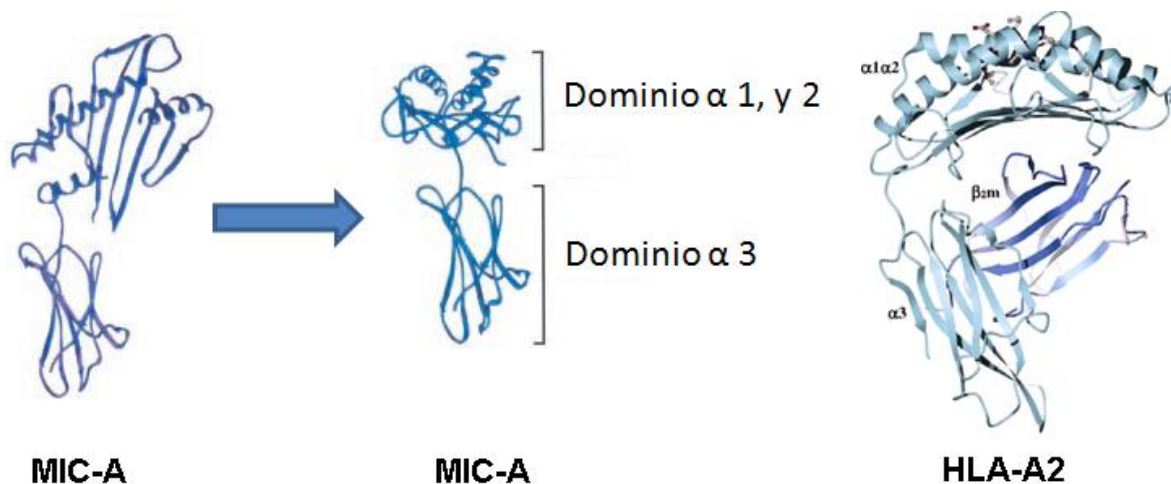
### 4.3 Función biológica de MICA

MICA es una glucoproteína de superficie celular con funciones relacionadas a la inmunidad innata (72), muestra un patrón de expresión altamente restringido en sujetos sanos (73), es decir, generalmente no se expresa en el tejido normal con excepción de células epiteliales intestinales (59, 74).

Los genes MICA sólo muestran 19%, 25% y 35% de homología a los dominios extracelulares  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -3 respectivamente de otros genes MHC clase I (61) (**Figura 7**).

A pesar de este hecho se sabe que codifica proteínas plegadas de una manera similar a las moléculas MHC. Sin embargo, funcionalmente no se parecen a las moléculas MHC de clase I ya que no se asocian con la  $\beta$ -2 microglobulina (67, 75), no se unen a CD8(61) y no presentan péptidos sobre la superficie (64, 67) (**Figura 7**).

Otra diferencia con los productos de los genes clásicos de HLA clase I, es que la expresión de MICA no está influenciada por los interferones de tipo I y tipo II, ya que su expresión es sobre regulada por calor y estrés debido a elementos de respuesta a choque térmico en la región promotora de este gen (75, 76).

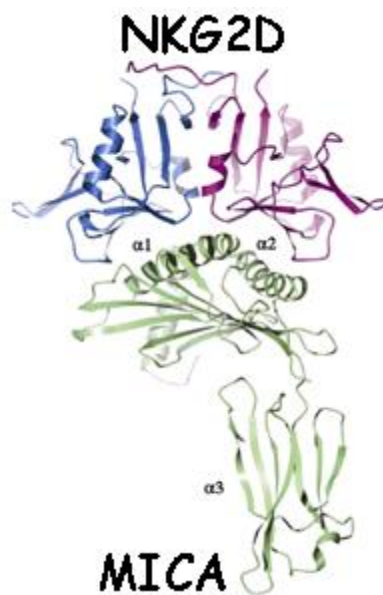


**Figura 7.** Representación de la estructura de MICA. Se pueden observar las diferencias con la molécula HLA de clase I clásica (HLA-A) (77, 78).

En condiciones fisiológicas normales, MICA parece ser crucial en el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal, ya que su expresión favorecería la eliminación de las células epiteliales infectadas o dañadas; la presencia de altos niveles de MICA en células epiteliales podría representar el

mecanismo mediante el cual el sistema inmune puede reconocer y destruir células sometidas a estrés **(Figura 5)** (79)

La expresión de MICA por el epitelio y su reconocimiento por células del sistema inmune sugieren que puede desempeñar un papel importante en la vigilancia inmune y en la inducción directa de inmunidad en mucosas **(Figura 5)**. Diversos estudios han establecido que la expresión de MICA se induce por estrés y se une a NKG2D, un receptor de células NK, células T  $\gamma/\delta$  y linfocitos T CD8 citotóxicos (64, 80-83) **(Figura 8)**.

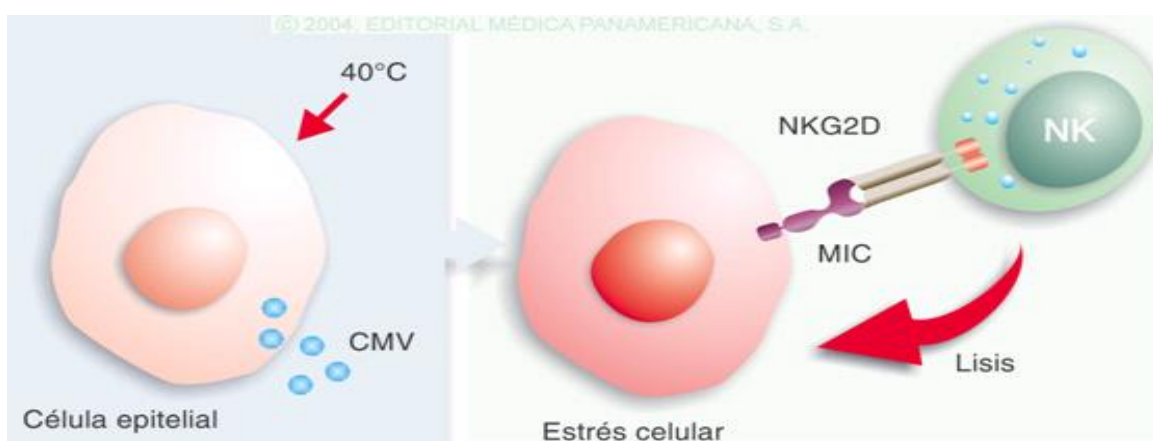


**Figura 8.** Proteína MICA y su receptor NKG2D; este receptor solo lo expresan las células con capacidad citotóxica (84).

Entre las llamadas situaciones de estrés celular que inducen la expresión de MICA se encuentran el daño al ADN, transformación maligna (cáncer), e infecciones intracelulares (virus y *mycobacterias*) (85, 86) **(Figura 9)**; su expresión es prácticamente inexistente en la superficie de células humanas normales no

estimuladas aunque los transcritos de esta proteína pueden estar presentes en fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales (85) **(Figura 5)**.

Algunos autores han referido que puede expresarse en muy bajos niveles en células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y células dendríticas, pero no en células de linaje linfohematopoyético (72). Por otro lado, se ha reportado que el estrés oxidativo aumenta la expresión de MIC (87).



**Figura 9.** Función biológica de la proteína MICA. (Editorial Médica Panamericana 2004)

La expresión de MIC es inducida en un gran número de células tumorales epiteliales, incluyendo cáncer de colon, de mama, pulmón, ovario renal y carcinoma hepatocelular pero no en tejidos normales (88, 89).

#### 4.4 Polimorfismos de MICA

MICA exhibe un alto grado de polimorfismo alélico y actualmente se conocen 64 alelos (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>). Estos se clasifican en base a la secuencia de nucleótidos del gen MICA completo. El polimorfismo más intensamente estudiado dentro del gen MICA, es el polimorfismo de los

microsatélites que consiste en un número variable de repeticiones del trinucleótido GCT que se encuentra dentro del exón 5 codificando para un número variable de alaninas dentro de la región transmembranal (69, 76); estos alelos son MICA- A4, -A5, -A5.1, -A6, -A7, -A9 y -A10, los que representan 4, 5, 6, 7, 9 y 10 repeticiones de los triplete (GCT/AGC) respectivamente (90).

El alelo MICA-A5.1 con la inserción de una guanina (GCT > GGCT) después del segundo triplete provoca una mutación en el marco de lectura que genera un codón de paro prematuro en la región de transmembrana, por lo tanto, trunca el tallo citoplasmático de MICA (42 aminoácido de longitud hidrófobo). La proteína soluble truncada se mueve a la membrana apical, a diferencia de la proteína normal que se mueve a la membrana basolateral (76).

El significado biológico de los diversos polimorfismos dentro de este gen no se conocen con precisión; se ha sugerido que ciertos cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína pueden influenciar para que se lleve a cabo una expresión anormal, como es el caso de los alelos MICA\*010, y MICA\*025 en los que una substitución de nucleótidos causa un cambio de aminoácidos (prolina por arginina), en el dominio alfa 1 en la posición 6, afectando el plegado de la molécula y la supresión de su expresión en la superficie de célula (91).

En otros casos influye en la afinidad de la interacción con su inmunoreceptor NKG2D. Un reporte ha demostrado que la presencia del aminoácido metionina o valina en el codón 129 del dominio  $\alpha$ -2 confiere una fuerte o baja afinidad por su receptor NKG2D respectivamente (67).

## 4.5 MICA y enfermedad

Este pequeño segmento del genoma humano ha sido estudiado en diferentes enfermedades con fondo autoinmune, como por ejemplo diabetes mellitus, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celiaca, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, y enfermedad de Behcets (92-96).

En particular se han realizado estudios de asociación con enfermedades que previamente se conocían relacionadas con alelos de los locus HLA-B y -C, como la espondilitis anquilosante, enfermedad de Behçet, psoriasis vulgaris y enfermedad de Kawasaki. Sin embargo, la mayor parte de estudios de asociación en base a casos y controles se han concentrado en polimorfismos de los microsatélites dentro del exón 5 (**Tabla 1**).

Muy pocos estudios han explorado todos los polimorfismos de MICA y la mayoría de estos han sido relativamente pequeños en el tamaño de la muestra y se han realizado en un grupo étnico en particular.

Estudios con más de un grupo étnico se han enfocado a espondilitis anquilosante y enfermedad de Behçet, y el consenso ha sido que cualquier asociación con los alelos de MICA es aparentemente secundaria, debido al desequilibrio de enlace con los alelos HLA-B (71).

| Enfermedad                | Alelo asociado  | Población   |
|---------------------------|---|---|
| Espondilitis anquilosante | MICA-A4(HLA-B*27)<br>MICA*007 y MICA*010<br>(HLA-B27<br>MICA-4 (HLA-B*27)                   | Caucasoides (europeos)<br>Oriental (Japoneses)<br>Caucasoides (Africanos y asiáticos)<br>Caucasoides (Italianos)  |
| Enfermedad de Behcets     | MICA-A6 (HLA-B51)<br>MICA*009 y MICA-6 (HLA-B51)<br>MICA*009 (HLA-B51)<br>MICA-A6 (HLA-B51) | Oriental (japoneses)<br>Medio oriente (palestinos)<br>Oriental (japoneses)<br>Caucásicos (Griegos)<br>Caucásicos (españoles)<br>Orientales (Japoneses)<br>Orientales (Japoneses) y caucásicos (griegos y españoles) |
| Psoriasis                 | MICA*002 y MICA-A9<br>PERB11.1*06<br>MICA-A5.1 (HLA-C*06)                                   | Caucásico (Españoles)<br>Caucásicos (Australianos)<br>Orientales (Coreanos)   |

Tabla 1. Algunas enfermedades autoinmunes asociadas con alelos de MICA en diversas poblaciones.

#### 4.5.1 MICA y cáncer (mecanismos de evasión inmunológica)

Las células NK son parte del sistema inmune innato, con la citotoxicidad como uno de sus varios mecanismos efectores y desempeña un papel fundamental en contra de células tumorales y la eliminación de células infectadas por virus. El receptor de célula NK, G2D (NKG2D) está implicado en la activación de estas células así como de algunas subpoblaciones de linfocitos T y desempeña un papel importante en la vigilancia inmune antitumoral. NKG2D es activado por una amplia variedad de ligandos que sirven como marcadores de estrés celular, y entre estos destaca MICA (97, 61).



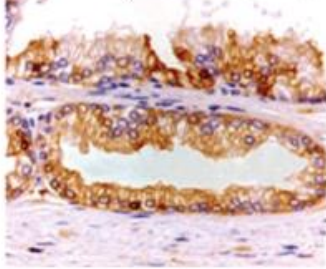
La unión de MICA con el receptor NKG2D provoca la respuesta citolítica de las células NK, linfocitos T  $\gamma\delta$  y CD8+ (98) y por lo tanto la muerte de la célula tumoral o infectada.

Evidencia experimental acumulada en los últimos años indica que el sistema MICA-NKG2D participa de diferentes maneras en la respuesta inmune (75, 80, 99, 100), pero esta interacción es particularmente importante para la reacción antitumoral (79, 101-105). El mecanismo efector anti-tumor utilizado por las células NK comprende la citotoxicidad contra las células blancas susceptibles y la secreción de INF- $\gamma$  y otras citocinas pro-inflamatorias (106-107).

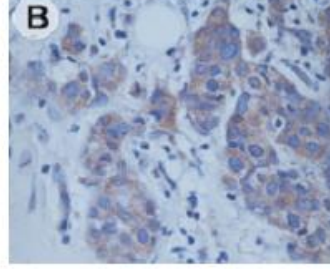
En la mayoría de los casos las células NK lisan a células blanco susceptibles secretando gránulos citotóxicos que contienen granzimas y perforinas; sin embargo, algunos estudios en ratones y en células humanas deficientes de granzimas y perforinas revelan que las células NK también pueden lisar a las células blanco mediante citotoxicidad mediada por receptores de muerte tales como el sistema Fas-FasL y por medio de ligandos que inducen apoptosis relacionados a TNF (TRAIL) (108).

MICA se expresa en una amplia variedad de tumores, como melanomas, cáncer de mama, de colon, y cáncer hepático así como en algunas leucemias (110) **(Figura 10)**. En líneas celulares epiteliales tumorales, la transcripción de MICA y MICB es activada por proliferación, choque térmico y estrés oxidativo (111).

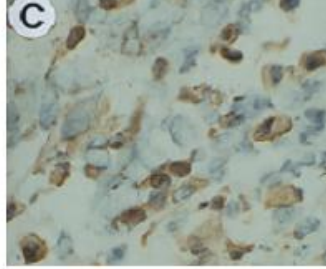
Cáncer de próstata. Wu et al. 2002



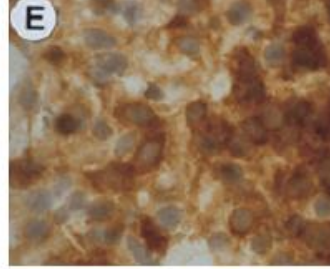
Cáncer de mama. Groh et al. 1999



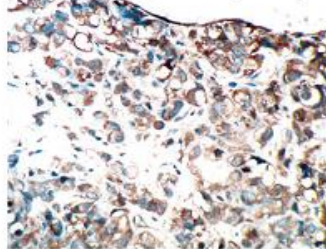
Cáncer de pulmón. Groh et al. 1999



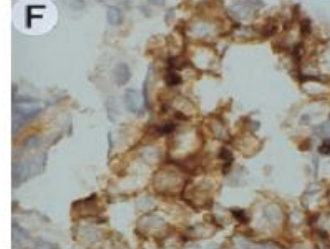
Cáncer renal. Groh et al. 1999



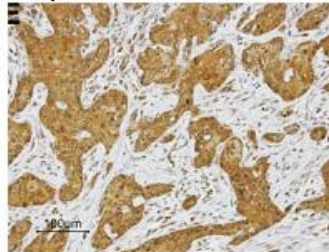
Osteosarcoma. Xiao et al. 2008



Cáncer de ovario. Groh et al. 1999



Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Reinders et al 2006

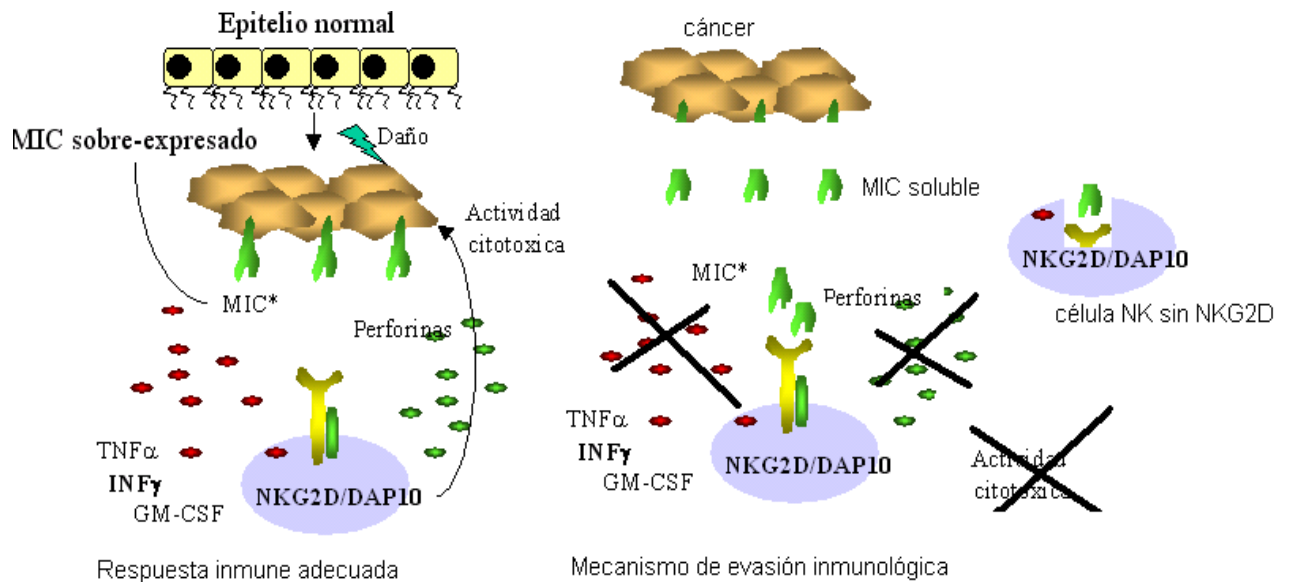


**Figura 10.** Expresión de MIC en algunos tipos de tumores malignos (119-121)

Asimismo, se han encontrado niveles aumentados de MICA en el suero de pacientes con diferentes tumores de origen epitelial (109, 112).

Varios estudios sugieren que uno de los mecanismos de escape tumoral lo constituye la liberación de MICA de las células cancerosas lo que sistemáticamente imposibilita su unión al receptor NKG2D de las células NK, linfocitos  $T\gamma\delta$  y  $CD8+$  y por lo tanto evita la respuesta inmune anti-tumoral (59). **(Figura 11).**

En este contexto, se ha descrito a MICA soluble como un marcador en cáncer e incluso en algunos casos los niveles elevados correlacionan significativamente con el estadio de la enfermedad o con la presencia de metástasis (112-118) **(Figura 11).**



**Figura 11.** Mecanismo de evasión inmunológica sugerido en cáncer.

Por otro lado, estudios recientes demuestran un papel importante del  $TGF\beta$  en la expresión del receptor NKG2D. Se le ha descrito como una molécula central responsable del escape inmune del tumor porque regula negativamente a NKG2D en células NK y células T  $CD8$  (74). Por ejemplo, Friese y colaboradores usaron

un RNA de interferencia para inhibir al TGF $\beta$ , con lo que observaron una mejoría en la respuesta inmune anti-glioma, mediada por el receptor NKG2D (84).

Asimismo, se ha sugerido que algunas enzimas de la familia ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase domain*) pueden ser responsables del corte de MICA sobre la superficie de las células dañadas. Así, Waldhauer y colaboradores utilizando RNA de interferencia describieron que las proteasas responsables del corte proteolítico de MICA son la ADAM10 y ADAM17 (122). También, experimentos realizados con inhibidores de metaloproteinasas de matriz de amplio espectro (inhibidores comerciales) evitaron el corte de MICA de la superficie celular (84).

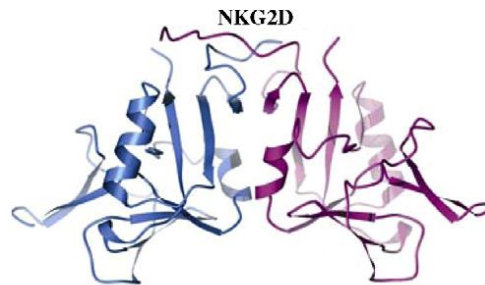
## **5. NKG2D**

El receptor NKG2D representa la unión entre la inmunidad innata y adaptativa (123). Como ya se mencionó, es expresado por células del sistema inmune innato (células de NK), de transición (células  $\gamma\delta$  y NKT) y adaptativo (células T CD8+) (124). Este receptor provee señales de coestimulación a las células T CD8 y activa poderosamente a las células NK (114). Las células T CD4 vírgenes no expresan NKG2D, pero si lo hacen las células T CD4 de pacientes con artritis reumatoide (59).

NKG2D es un receptor de activación similar a las lectinas de tipo C, codificado dentro del complejo NK sobre el cromosoma 12, y su función primordial es promover la lisis de las células tumorales mediante la unión de sus ligandos MIC.(112). NKG2D es una glicoproteína de transmembrana, con un dominio

citoplasmático N-terminal (aminoácido 1 al 51), una región anclada de transmembrana (aminoácido 52 al 72) y un dominio extracelular C-terminal (aminoácidos 73 al 216) con tres sitios potenciales de N-glicosilación (**Figura 12**).

En la superficie celular, NKG2D forma un homodímero estabilizado por un puente disulfuro, asociado a la proteína adaptadora DAP10, una proteína de transmembrana de tipo I que media exclusivamente la señalización de NKG2D. El homodímero NKG2D asociado con dos homodímeros DAP10 forman una estructura hexamérica. En ausencia de DAP10, NKG2D es retenido dentro de la célula (125). NKG2D y DAP10 transforman señales que activan o coestimulan las funciones efectoras de las células con actividad citotóxica (97, 122) y una de la citocinas que regulan su expresión es la IL-15 (126).



**Figura 12.** Estructura del receptor NKG2D (78).

Se han descrito algunos polimorfismos dentro del gen de este receptor, sugiriendo un importante papel en relación a la inmunovigilancia en cáncer (97).

## **6. Justificación**

La fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza por daño y activación anormal de las células epiteliales así como de la expansión de la población de fibroblastos/miofibroblastos en el parénquima pulmonar. El sistema MICA/NKG2D es importante en la eliminación de este tipo de células y una disminución en su efectividad podría desempeñar un papel en la patogénesis de esta enfermedad. A la fecha, no existe ningún estudio sobre polimorfismos de MICA y sobre el comportamiento del ligando MICA y el receptor de activación NKG2D en fibrosis pulmonar idiopática. Un mejor entendimiento del posible papel de la respuesta inmune innata podría abrir diferentes opciones terapéuticas para este padecimiento que es progresivo, irreversible y letal.

## **7. Hipótesis**

El gen MHC relacionado a clase I-A (MICA) y/o la proteína MICA y el eje MICA/NKG2D se asocian con la susceptibilidad y/o desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática.

## **8. Objetivo general**

Evaluar el posible papel de MICA y la relación MICA/NKG2D en la susceptibilidad a desarrollar fibrosis pulmonar idiopática.

### **8.1 Objetivo particulares**

- 1) Determinar mediante la técnica de análisis conformacional de cadenas de referencia (RSCA) los alelos pertenecientes a los loci HLA-MICA en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y controles sanos no relacionados.
- 2) Determinar frecuencias genotípicas de los genes MICA en pacientes y controles.
- 3) Determinar los niveles de MICA soluble en plasma mediante ELISA.
- 4) Determinar el o los tipos celulares que expresan MICA en tejido pulmonar por inmunohistoquímica.
- 5) Cuantificar por citometría de flujo el porcentaje de células obtenidas por lavado bronquioalveolar que expresan el receptor NKG2D.

## **9. Material y metodos**

### **9.1 Calculo del tamaño de la muestra**

Por medio del paquete estadístico *Power and Sample Size Calculation* Versión 2.1.31 y tomando como referencia un estudio previo de asociación, se calculó el tamaño de la muestra para un nivel de confianza del 95%, un poder de 80 y con una relación enfermos-controles de 1:1. Se utilizó la razón de momios (OR) de un estudio de asociación entre los genes HLA y FPI. La frecuencia génica de los controles que se utilizó fue del alelo DRB1\*1402. El OR para este alelo fue de 4.77 (16) y como resultado el tamaño de muestra obtenido es de 73 controles y 73 enfermos; sin embargo, se consideró triplicar el número de controles para permitir que los alelos con frecuencias menores se puedan observar. Finalmente las cohortes quedaron constituidas por 201 controles y 80 casos.

### **9.2 Población en estudio**

#### **9.2.1 Pacientes con fibrosis pulmonar idiopática**

Se estudiaron 80 sujetos mestizos mexicanos no relacionados, con el diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática. El diagnóstico se realizó de acuerdo a los parámetros sugeridos por la Sociedad Americana del Tórax (1) y se confirmó mediante el análisis histológico de la biopsia pulmonar. Los criterios de inclusión fueron:

- a) Ser mestizo mexicano (por lo menos 2 generaciones nacidas en México).
- b) Diagnóstico confirmado de fibrosis pulmonar idiopática.



- c) No padecer o haber padecido enfermedades autoinmunes o infecciosas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad.
- d) Estar de acuerdo a participar en el protocolo de investigación y firmar una carta de consentimiento.

Se estudiaron cuarenta y dos pacientes (52%) del sexo masculino y 38 (48%) del sexo femenino y la edad media fue de 65 años. El estudio se realizó de acuerdo a la Declaración de Helsinki, fue aprobado por el comité de ética institucional y se obtuvo el consentimiento de cada paciente.

### **9.2.2 Grupo Control**

Se analizaron 201 individuos mestizo mexicanos, voluntarios no relacionados con los pacientes con FPI, y clínicamente sanos, a los cuales se les realizaron los mismos análisis que al grupo problema. Setenta y dos (35%) fueron del sexo masculino y 129 (65%) del sexo femenino, la edad media fue de 42.7 años.

## **10. Tipificación molecular de los alelos MICA**

### **10.1 Extracción de DNA**

El DNA genómico se obtuvo por medio de un método basado en detergentes iónicos, con un estuche comercial (*BD Tract Genomic DNA*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 10.2 Amplificación de los exones 2-3 y 4-5 de MICA por PCR

Los exones 2-3 fueron amplificados con los iniciadores MICA2-3F 5'-T CCT GCC CCA GGA AGG TTG GG-3' y MICA2-3R 5'-AGG GAG AGG AGA GCC CCT GGC-3. Los exones 4-5 con MICA4-5F 5'-CAG ACT TGC AGG TCA GGG GTC CCG-3' y MICA4-5R 5'- CCT TAC CAT CTC CAG AAA CTG C-3'.

Los iniciadores MICA2-3F y MICA2-3R amplifican una región de 949 pb que incluye a los exones 2 y 3 del gen MICA, y los iniciadores MICA4-5F y MICA4-5R amplifican una región de 678 pb.

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: se utilizó una mezcla de reacción para PCR que contenía en cada reacción la concentración final de 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, para MICA 2-3 y 2mM para MICA 4-5, 0.2 mM de dNTPs, 1X de buffer de DNA Taq polimerasa, 0.5 pM de cada uno de los iniciadores y 0.75 U de DNA taq polimerasa platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), y 0.5 µg de DNA en 25 µl como volumen final.

Las condiciones de PCR para MICA 2-3 fueron una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos seguida de 33 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 65°C durante 50 segundos y 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 8 minutos.

Las condiciones de PCR para MICA 4-5 fueron una desnaturalización inicial de 94°C durante 4 minutos seguida de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 63°C

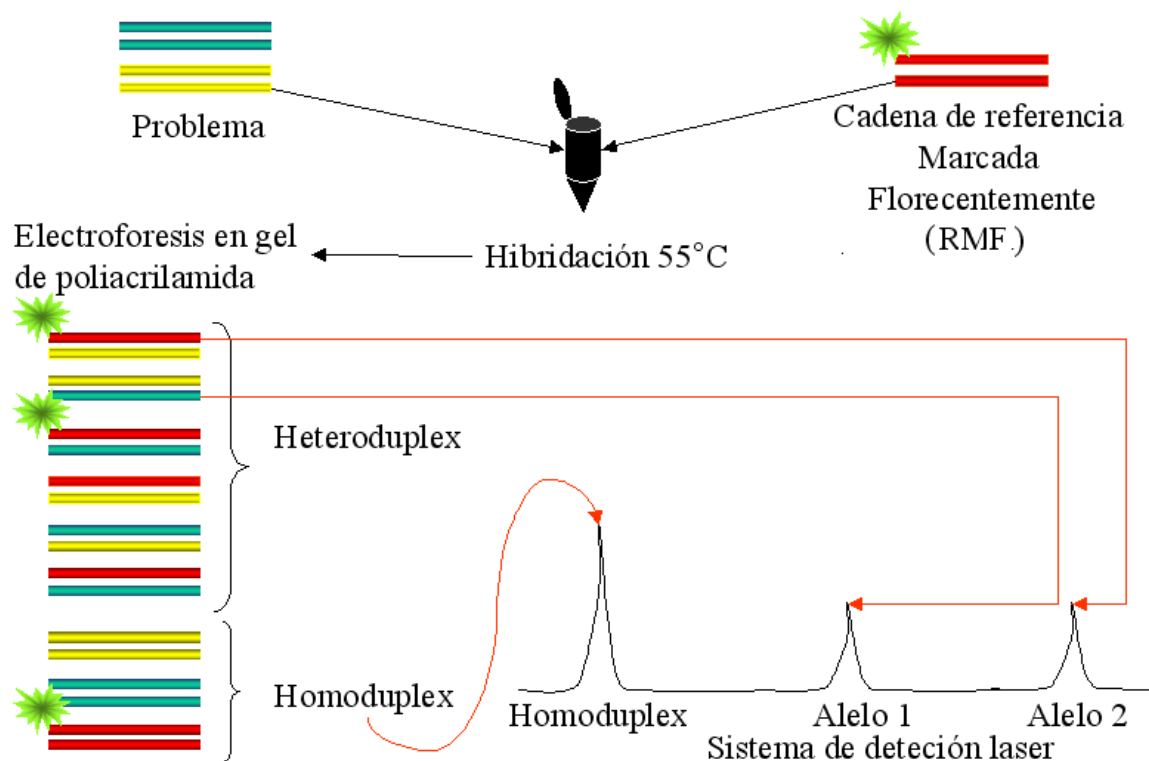
durante 1.30 minutos y 72°C durante 2 minutos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City CA). Los productos de PCR amplificados fueron corridos mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2% con 0.2 µg/ml de bromuro de etidio por 40 minutos (30V/cm) y los productos fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Inc. Upland, CA), con la finalidad de comprobar la amplificación de 949 pb para el exón 2-3 y 678 pb para el exón 4-5.

#### **11. Análisis conformacional de cadenas de referencia RSCA (*Reference strand mediated conformation analysis*)**

La tipificación molecular del polimorfismo de MICA fue realizada mediante la técnica de análisis conformacional de cadenas de referencia (RSCA por sus siglas en ingles) **(Figura 13)**.

La producción e hibridación de referencias marcadas con fluorescencia (RMF) con las muestras, así como las condiciones de electroforesis y el gel de poliacrilamida para el RSCA se realizaron siguiendo indicaciones previamente descritas (127, 128).



**Figura 13.** Representación gráfica de la técnica “análisis conformacional de cadenas de referencia”.

Tres RMF fueron seleccionadas para el exón 2-3, RMF1 MICA\*001 (EJ32B), RMF2 MICA\*00801 (WT47) y RMF3 MICA\*004 (PF97387) mientras que para el exón 4-5 se seleccionaron dos RMF1 MICA\*001 (EJ32B), RMF2 MICA\*004 (PF97387).

Los controles internos que se utilizaron para los exones 2-3 de MICA fueron los alelos MICA\*001, \*00201, \*004, \*00701, \*008, 010, \*017, y \*018. Para los exones 4-5 fueron los alelos MICA\*001, \*00201, \*004, \*008 y 010 (**Tabla 2 y 3**)

**Tabla 2.** Controles internos y RMF utilizados en la determinación de la movilidad de los exones 2-3 de MICA

| MICA 2-3<br>RMF | No de Ctról. Interno | Alelo | Línea celular |
|-----------------|----------------------|-------|---------------|
|-----------------|----------------------|-------|---------------|

|                                |   |                                    |                     |
|--------------------------------|---|------------------------------------|---------------------|
| RMF 1<br>MICA*001<br>(EJ32B)   | 1 | MICA*00201<br>MICA*017             | M7<br>DBB           |
|                                | 2 | MICA* 00801<br>MICA*004            | LB<br>PF97387       |
|                                | 3 | MICA*010                           | BOLETH              |
| RMF 2<br>MICA*00801<br>(WT47)  | 4 | MICA*00201<br>MICA*018<br>MICA*001 | M7<br>BM16<br>DUCAF |
|                                | 5 | MICA*004                           | PF97387             |
| RMF 3<br>MICA*004<br>(PF97387) | 6 | MICA*00201<br>MICA*001             | M7<br>EJ32B         |
|                                | 7 | MICA*00701<br>MICA*018             | BM92<br>BM16        |

Abreviaturas: RMF Referencias con marca fluorescente.

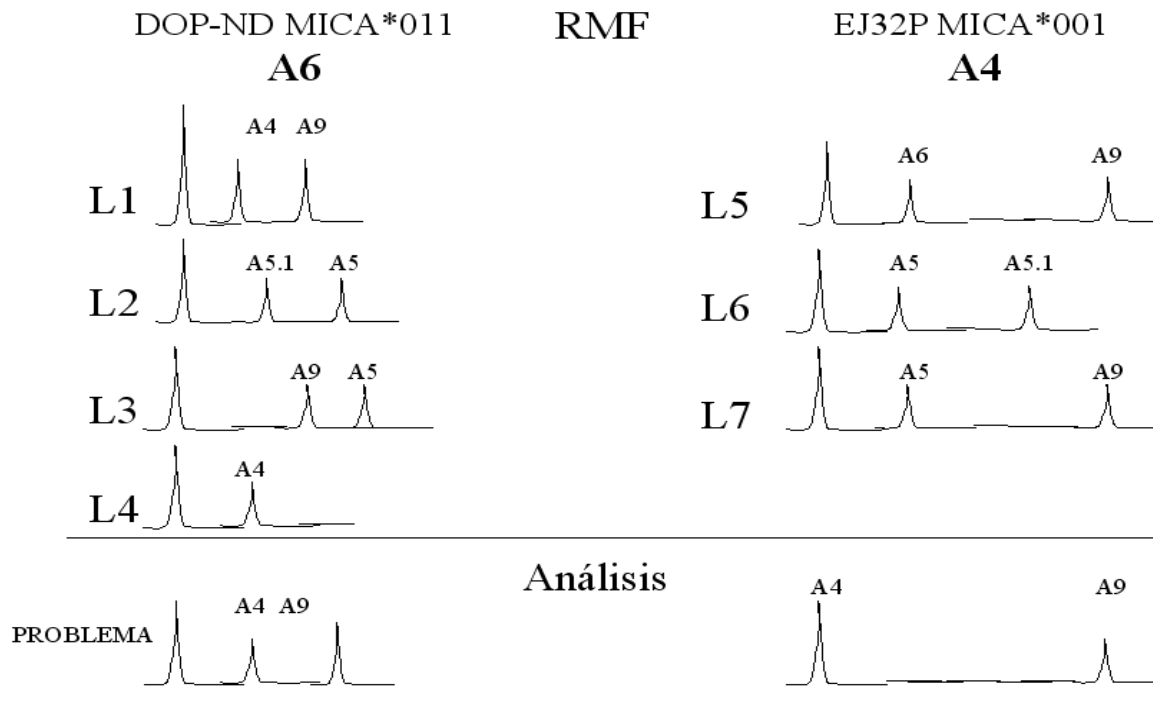
**Tabla 3.** Controles internos (microsatélites) y RMF utilizados en la determinación de la movilidad de los exones 4-5 de MICA.

| MICA 4-5<br>RMF  | No de Ctról. Interno | Alelo                | Linea celular |
|------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| RMF 1<br>MICA-A6 | 1                    | MICA*A4<br>MICA*A9   | DUCAF<br>M7   |
|                  | 2                    | MICA*A5<br>MICA*A5.1 | BOLETH<br>LB  |
|                  | 3                    | MICA*A5<br>MICA*A9   | BOLETH<br>M7  |
| RMF 2<br>MICA-A4 | 4                    | MICA*A6<br>MICA*A9   | PF97387<br>M7 |
|                  | 5                    | MICA*A5<br>MICA*A5.1 | BOLETH<br>LB  |
|                  | 6                    | MICA*A5<br>MICA*A9   | BOLETH<br>M7  |

Abreviaciones: RMF Referencias con marca fluorescente.

3).

La movilidad de cada homoduplex fue analizada a través del programa ALLELE LINK (Amersham Pharmacia Biotech). De esta manera y comparando con los controles internos se determinaron los alelos de MICA (127) (**Figura 14**).



**Figura 14.** Representación del análisis e interpretación de resultados con el programa de computadora ALLELE LINK (Amersham Pharmacia Biotech). Se observa la movilidad de los productos hibridados con las RMF (A6 y A4). Los controles internos (L1 al L7) tienen un patrón de movilidad establecido, con lo que al comparar contra el problema podemos determinar el alelo; es importante comprobar la movilidad del problema al menos con dos RMF (A4 y A6 para el exón 4-5).

## 12. Tipificación molecular de HLA-B

La tipificación molecular del locus HLA-B se realizó mediante la técnica de PCR-SSP (*sequence specific primer*) utilizando el kit comercial Fastype HLA-DNA SSP Typing System (Biosynthesis Inc., Dallas TX), el cual ha sido certificado por la *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics* (ASHI).

Se utilizaron 47 pares de primers para determinar los 45 principales grupos específicos de HLA-B (de B 7 a B 81) por baja resolución. Todas las amplificaciones de PCR fueron realizadas con 75 ng de ADN genómico en 10 µl de volumen de reacción conteniendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 60µM de cada dNTP's (129, 130).

Las condiciones de PCR fueron 20 ciclos con una temperatura inicial de 94°C por 20 segundos, seguido de 61°C por 50 segundos y 72°C por 30 segundos; se utilizó un termociclador de la marca GeneAmp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems. Foster City CA). Adicionalmente se agregaron 10 ciclos de 94°C por 20 segundos, seguido de 65°C por 1 minuto, esto después del último paso de desnaturalización en el primer ciclo y para finalizar 5 minutos adicionales a 72°C fueron incluidos después del último ciclo. En todos los casos, las amplificaciones fueron realizadas utilizando 0.5 U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen; Rockville MD).

Los productos amplificados por PCR-SSP fueron corridos en un gel de agarosa al 2% conteniendo 0.2 µg/ml de bromuro de etidio por 40 minutos (30V/cm) las bandas alelo específicas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP inc. Upland, CA) posteriormente fueron analizados y almacenados en el equipo de foto documentación EDAS290 (Kodak, Rochester, NY). Los resultados fueron interpretados siguiendo las instrucciones de las hojas de tipificación de la guía de procedimientos.

### **13. Inmunohistoquímica de MICA**

Las secciones de tejido pulmonar de pacientes con FPI y normales fueron desparafinadas, rehidratadas y bloqueadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en metanol por 30 minutos. Para mejorar la exposición de MICA las preparaciones se sometieron a amortiguador de citrato (10 mM, pH 6.0) durante 8 minutos en el microondas. Las secciones de tejido fueron tratadas con un diluyente de anticuerpo que reduce los

componentes del fondo (Chemicon Australia Pty), diluido 1:100 en PBS durante 20 minutos y luego incubadas con el anticuerpo MICA antihumano (de conejo policlonal; 200 µg/ml diluido 1:50, 4 µg/ml; Santa Cruz, CA) a 4°C durante la noche.

Pasada la incubación se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado anti-inmunoglobulina seguido por un anticuerpo conjugado con peroxidasa (BioGenex, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como sustrato se utilizó el 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, BioGenex) en amortiguador de acetato conteniendo 0.05% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina (131).

El anticuerpo primario fue remplazado por suero no inmune para las laminillas control negativas. Como controles positivos para la expresión de MICA se utilizaron tejidos con cáncer de próstata. Las laminillas fueron examinadas en un microscopio Nikon E600 y las imágenes digitales fueron obtenidas con una cámara Digital Nikon DXm1200C.

#### **14. Cuantificación de MICA soluble**

La cuantificación de la proteína MICA se realizó mediante un ensayo de ELISA utilizando un estuche comercial (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN) para detectar la proteína MICA soluble en muestras de plasma, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las placas (Costar EIA Plate, Minneapolis, MN) fueron cubiertas con 100 µl (360 µg/ml) de anticuerpo de captura por pozo e incubadas durante toda la noche a



temperatura ambiente. Después de lavarlas se bloquearon con 300  $\mu$ l de reactivo diluyente por pozo.

Diluciones seriales de la curva estándar y muestras de plasma (100  $\mu$ l) se agregaron a cada pozo e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregaron 100  $\mu$ l de estreptavidina-HRP a cada uno de los pozos e incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando la luz directa. Después de lavar, se añadieron 100  $\mu$ l de la solución de sustrato y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente se agregaron 50  $\mu$ l de la solución *stop* en cada uno de los pozos y la absorbancia se leyó a 450 nm en un lector ELISA. Se utilizó una curva estándar de la relación logarítmica entre la concentración y la absorbancia para calcular la concentración MICA soluble en muestras de plasma.

## **15. Citometría de flujo para NKG2D**

La determinación del fenotipo de superficie de los linfocitos T y células NK se realizó en células de lavado bronquioalveolar (LBA). Las células fueron descongeladas, lavadas, y resuspendidas en amortiguador de tinción y se incubaron con anticuerpos monoclonales para determinar las subpoblaciones de células T  $\gamma\delta$ , NK, NKT, T CD4 y T CD8 (BD Pharmingen, San Diego, CA) y posteriormente fueron fijadas en paraformaldehído al 1 % para el análisis por citometría de flujo (132).

Las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti- CD16-FITC, anti-CD56-FITC, anti-TCR  $\gamma\delta$ -PE, anti-NKG2D-APC, anti-CD4-APC-Cy7 y anti-CD8-PE-Cy7 (Becton Dickinson, San José, CA). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACS Aria (Becton Dickinson, San Jose, CA) utilizando el software FACS Diva. Se adquirieron 100,000 eventos por tubo.

## **16. Análisis estadístico**

Las frecuencias alélicas de MICA fueron determinadas por conteo directo en pacientes con FPI y sujetos sanos. La comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de MICA en pacientes con FPI y el grupo control fue evaluada por la prueba Chi-cuadrada combinada con tablas de contingencia de 2x2 utilizando el programa estadístico EPIINFO (Versión 6.04b). Se estimó el intervalo de confianza del 95% (95% IC) así como la razón de momios (OR). Se analizó el equilibrio Hardy-Weinberg para todas las combinaciones genotípicas de cada variante de MICA.

## 17. Resultados

### 7.1 Asociación de MICA con FPI

Ocho alelos de MICA fueron identificados en este estudio, de los cuales 6 mostraron una frecuencia alélica por arriba de 0.01. Las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con FPI y los sujetos control se muestran en la **tabla 4**.

Los alelos más comunes en ambos grupos fueron: MICA\*00201 (fg=0.35 en controles y 0.42 en FPI) y MICA\*010 (0.29 en controles y 0.33 FPI).

Se observó un aumento significativo del alelo MICA\*001 en los pacientes con FPI en relación al grupo control (pC=0.03, OR=2.91, 95% IC=1.04-8.25) y una disminución en la frecuencia del alelo MICA\*004 en los pacientes con FPI en relación al grupo control (pC=0.008, OR=0.41, 95% IC=0.20-0.80) (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Frecuencia génica de los alelos de MICA en pacientes y grupo control.

| Alelo       | FPI<br>n = 80<br>(160 alelos) |             | CTROL<br>N = 201<br>(402 alelos) |             | OR          | pC           | IC                 |
|-------------|-------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------------|
|             | n                             | Fg          | n                                | fg          |             |              |                    |
| *00201      | 68                            | 0.42        | 142                              | 0.35        | 1.35        | 0.13         | 0.91 - 2.00        |
| *010        | 54                            | 0.33        | 119                              | 0.29        | 1.21        | 0.38         | 0.80 - 1.82        |
| *00801      | 14                            | 0.08        | 47                               | 0.11        | 0.72        | 0.38         | 0.36 - 1.39        |
| <b>*001</b> | <b>10</b>                     | <b>0.06</b> | <b>9</b>                         | <b>0.02</b> | <b>2.91</b> | <b>0.03</b>  | <b>1.04 - 8.25</b> |
| <b>*004</b> | <b>12</b>                     | <b>0.07</b> | <b>66</b>                        | <b>0.16</b> | <b>0.41</b> | <b>0.008</b> | <b>0.20 - 0.80</b> |
| *017        | 2                             | 0.01        | 17                               | 0.04        | 0.29        | 0.13         | 0.03 - 1.23        |
| *00701      | 0                             | ND          | 1                                | 0.002       | 2.52        | 0.48         | 0.03 - 198.45      |
| *018        | 0                             | ND          | 1                                | 0.002       | 2.52        | 0.48         | 0.03 - 198.45      |

Abreviaturas: IC intervalo de confianza; fg frecuencia génica; ND no detectado; OR odds ratio; pC p corregida

Por otro lado, se encontraron diecinueve genotipos; los más comunes en ambos grupos fueron: MICA\*00201/\*00201 (fg = 0.17 en controles y 0.18 en FPI), MICA\*00201/\*010 (fg = 0.16 en controles y 0.21 en FPI) y MICA \*010/\*010 (fg = 0.10 en controles y 0.18 en FPI). (**Tabla 5**).

La frecuencia del genotipo MICA\*001/\*00201 se encontró considerablemente aumentada en pacientes con FPI en relación con los controles sanos (pC=0.01, OR=4.72, 95% IC=1.15-22.51). A la inversa, el genotipo homocigoto MICA\*004/\*004 fue menos frecuente en FPI (fg=0.01) que en los controles (fg=0.08) (pC = 0.17, OR = 0.04, 95% IC = 0.0-1.15) (**Tabla 5**).

Algunos alelos y genotipos no fueron detectados esto podría deberse a una baja representación de estos alelos o genotipos en nuestros grupos de estudio, o a una verdadera ausencia de ciertos alelos o genotipos de MICA en nuestros grupos de estudio. No se observaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg en la distribución de genotipos de MICA en pacientes con FPI y controles sanos.

**Tabla 5.** - Frecuencias genotípicas de MICA en pacientes y grupo control.

| Genotipo           | FPI<br>n= 80 |             | Ctrol<br>n=201 |             | OR          | PC          | CI                  |
|--------------------|--------------|-------------|----------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
|                    | n            | fg          | n              | fg          |             |             |                     |
| *00201/*010        | 17           | 0.21        | 34             | 0.16        | 1.33        | 0.49        | 0.65 - 2.64         |
| *00201/*00201      | 15           | 0.18        | 36             | 0.17        | 1.06        | 0.99        | 0.50 - 2.14         |
| *010/*010          | 15           | 0.18        | 22             | 0.10        | 1.88        | 0.12        | 0.85 - 4.04         |
| *00201/*00801      | 10           | 0.12        | 18             | 0.08        | 1.45        | 0.49        | 0.57 - 3.51         |
| <b>*001/*00201</b> | <b>7</b>     | <b>0.08</b> | <b>4</b>       | <b>0.01</b> | <b>4.72</b> | <b>0.01</b> | <b>1.15 - 22.51</b> |
| *00201/*004        | 4            | 0.05        | 11             | 0.05        | 0.91        | 0.56        | 0.20 - 3.19         |
| *004/*010          | 4            | 0.05        | 17             | 0.08        | 0.57        | 0.45        | 0.14 - 1.83         |
| *001/*010          | 2            | 0.02        | 4              | 0.01        | 1.26        | 0.54        | 0.11 - 9.01         |
| *00801/*00801      | 2            | 0.02        | 5              | 0.02        | 1.01        | 0.64        | 0.09 - 6.30         |
| *001/*004          | 1            | 0.01        | ND             | 0           | 2.53        | 0.48        | 0.03 -199.70        |
| <b>*004/*004</b>   | <b>1</b>     | <b>0.01</b> | <b>14</b>      | <b>0.06</b> | <b>0.17</b> | <b>0.04</b> | <b>0.0 - 1.15</b>   |
| *004/*017          | 1            | 0.01        | 4              | 0.01        | 0.62        | 0.55        | 0.01 - 6.44         |
| *010/*017          | 1            | 0.01        | 9              | 0.04        | 0.27        | 0.16        | 0.01 - 2.01         |
| *00201/*017        | ND           | ND          | 2              | 0.009       | 1.26        | 0.63        | 0.02 - 24.49        |
| *004/*00801        | ND           | ND          | 6              | 0.02        | 0.41        | 0.35        | 0.01 -3.48          |
| *00801/*010        | ND           | ND          | 11             | 0.05        | 0.22        | 0.09        | 0.01 - 1.56         |
| *00801/*017        | ND           | ND          | 2              | 0.009       | 1.26        | 0.63        | 0.02 - 24.49        |
| *00201/*00701      | ND           | ND          | 1              | 0.004       | 2.53        | 0.48        | 0.03 - 199.70       |
| *001/018           | ND           | ND          | 1              | 0.004       | 2.53        | 0.48        | 0.03 -199.70        |

Abreviaturas: IC intervalo de confianza; fg frecuencia génica; ND no detectado; OR odds ratio; pC p corregida

## 17.2 Distribución de alelos MICA según la afinidad para NKG2D

En la búsqueda de una correlación funcional para conocer el papel de MICA en la FPI, los alelos de este gen fueron agrupados según la presencia de valina o metionina en la posición 129 (polimorfismo una A por una G dentro del exón 3 en la posición 454), lo que se asocia con baja o alta afinidad para su unión con el receptor NKG2D. Los alelos con valina en la posición 129 son de baja afinidad y están representados por MICA\*004, \*006, \*008, \*009, \*010, \*016, \*019. Los alelos con metionina en la posición 129 son de alta afinidad y están representados por MICA\*001, \*002, \*007, \*011, \*012, \*015, \*017, \*018, \*021 (133). **(Tabla 6).**

**Tabla 6.** Alelos de MICA que codifican para valina o metionina 129, asociados con alta o baja afinidad para su receptor NKG2D.

| Alta afinidad (metionina 129) | Baja afinidad (valina 129) |
|-------------------------------|----------------------------|
| *001                          | *004                       |
| *002                          | *006                       |
| *007                          | *008                       |
| *011                          | *009                       |
| *012                          | *010                       |
| *015                          | *016                       |
| *017                          | *019                       |
| *018                          |                            |
| *021                          |                            |

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos con alta (A) y baja afinidad (B) para el receptor NKG2D en pacientes con FPI y controles sanos se muestran en la **tabla 7**.

En el grupo control los alelos con alta afinidad mostraron una frecuencia de 0.42 y los de baja afinidad de 0.57; para los pacientes con FPI los de alta afinidad tuvieron una frecuencia de 0.50 y los de baja afinidad también de 0.50 (**Tabla 7**).

Las frecuencias genotípicas fueron: A/A (f.g. = 0.21); A/B (f.g. = 0.40) y BB (f.g. = 0.37) para grupo control y A/A (f.g. = 0.27); A/B (f.g. = 0.45) y BB (f.g. = 0.37) para pacientes con FPI (**Tabla 7**).

El análisis estadístico no reveló ninguna diferencia significativa en las frecuencias alélicas y genotípicas asociado con la alta o baja afinidad para NKG2D entre los pacientes con FPI y los controles sanos.

**Tabla 7.** Frecuencias alélicas de MICA de acuerdo a una alta o baja afinidad por su receptor NKG2D, en pacientes y grupo control.

| Alelo    | FPI          |      | Ctrol.        |      | OR   | PC   | IC          |
|----------|--------------|------|---------------|------|------|------|-------------|
|          | n = 80 (160) |      | n = 201 (402) |      |      |      |             |
|          | N            | gf   | n             | gf   |      |      |             |
| A        | 80           | 0.5  | 170           | 0.42 | 1.36 | 0.11 | 0.93 – 2.0  |
| B        | 80           | 0.5  | 232           | 0.57 | 0.73 | 0.11 | 0.50 – 1.08 |
| Genotipo |              |      |               |      |      |      |             |
| A/A      | 22           | 0.27 | 44            | 0.21 | 1.35 | 0.39 | 0.71 – 2.54 |
| A/B      | 36           | 0.45 | 82            | 0.40 | 1.19 | 0.60 | 0.68 – 2.07 |
| B/B      | 22           | 0.27 | 75            | 0.37 | 0.64 | 0.15 | 0.34 – 1.16 |

Abreviaturas: IC intervalo de confianza; gf frecuencia génica; ND no detectado; OR odds ratio; pC p corregida; A = alta afinidad, B = baja afinidad.

### 17.3 MICA / HLA-B en FPI y controles

Como la asociación con MICA pudiera deberse al desequilibrio de enlace con el extraordinariamente polimórfico locus HLA-B, investigamos si la contribución de los marcadores MICA\*001 o MICA\*004 relacionados con la susceptibilidad y o protección a la FPI era independiente o podía ser atribuida a alelos del locus HLA-B. Los alelos de HLA-B fueron tipificados en cuarenta y cinco pacientes con FPI y 70 individuos controles sanos, previamente estudiados para el polimorfismo de MICA. Veintisiete alelos HLA-B y 16 haplotipos de MICA/HLA-B fueron identificados en ambos grupos; la frecuencia de los haplotipos de MICA/HLA-B se muestran en la **tabla 8**.

Tres haplotipos MICA-HLA-B fueron identificados con una frecuencia superior al 1% en pacientes con FPI y uno en el grupo control. El análisis estadístico reveló que la asociación de los alelos de MICA con la susceptibilidad o protección a la FPI es independiente de HLA-B. Sin embargo es importante señalar que el

haplotipo MICA\*010/HLA-B\*15 mostró una tendencia al incremento en pacientes con FPI, aunque no alcanzó significancia estadística (f.g. = 0.12 en pacientes con FPI y 0.05 en controles sanos,  $P_c=0.13$ ,  $OR=2.3$ , el 95 %  $CI=0.81-6.58$ ) (**Tabla 8**), lo que podría deberse al número limitado de sujetos analizados para HLA-B

**Tabla 8.** Frecuencia haplotípica de MICA/HLA-B, en pacientes y grupo control., solo los haplotipos que mostraron frecuencias por arriba de 0.02 se muestran.

| Genotipo<br>MICA/HLA-B | FPI         |      | Ctrol.       |      | OR   | PC   | IC          |
|------------------------|-------------|------|--------------|------|------|------|-------------|
|                        | n = 45 (90) |      | n = 70 (140) |      |      |      |             |
|                        | n           | fh   | n            | fh   |      |      |             |
| *00201/*35             | 17          | 0.18 | 27           | 0.19 | 0.97 | 0.92 | 0.47- 2.01  |
| *010/*15               | 11          | 0.12 | 8            | 0.05 | 2.3  | 0.13 | 0.81 - 6.58 |
| *00201/*39             | 10          | 0.11 | 11           | 0.07 | 1.47 | 0.54 | 0.53 - 3.99 |
| *010/*40               | 5           | 0.05 | 10           | 0.07 | 0.76 | 0.83 | 0.20 - 2.56 |
| *010/*35               | 2           | 0.02 | 7            | 0.05 | 0.43 | 0.48 | 0.04 - 2.35 |

Abreviaturas: IC intervalo de confianza; fg frecuencia génica; ND no detectado; OR odds ratio; pC p corregida; A = Alta afinidad, B = Baja afinidad.

#### 17.4 MICA soluble en plasma de pacientes FPI y controles

Se analizaron los niveles de MICA soluble en el plasma de 95 pacientes con FPI y 84 controles sanos. La mayoría de individuos sanos mostró niveles de MICA soluble prácticamente indetectables (por debajo de 1 pg/mL). La proteína soluble se encontró en el 35 % de los pacientes con FPI [mediana: 0 (0-1191, 9 pg/ml)], y en el 12 % de los sujetos controles [mediana: 0 (0-136, 7 pg/ml)]. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0.0007$ ; prueba exacta de Fisher). Además, la detección de la proteína fue asociada con un OR de 3.76 ( $IC\ 95\% = 1.71 - 8.25$ ).

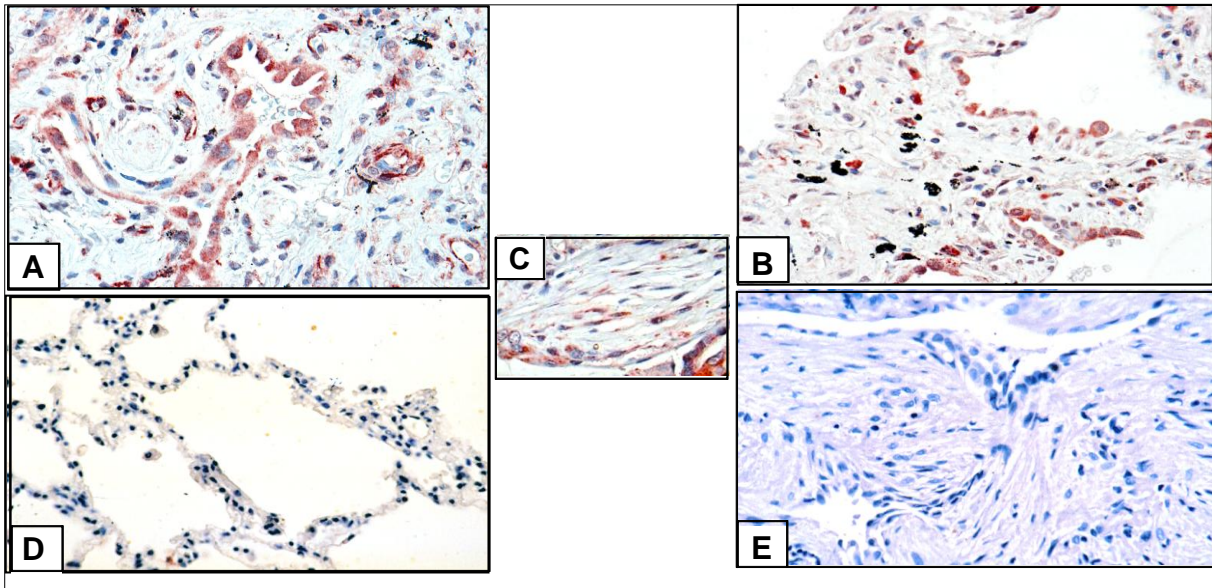


### **17.5 Inmunolocalización de MICA en tejidos pulmonares**

Para evaluar la expresión de MICA en el tejido, analizamos secciones de tejidos pulmonares de pacientes con FPI, y pulmones sin patología. Asimismo, secciones de tejido con cáncer de próstata fueron utilizados como un control positivo para la expresión de MICA. Como se observa en la **figura 15**, MICA se localizó principalmente en células epiteliales alveolares y fibroblastos los cuales exhibieron una intensa tinción intracitoplásmica en los tejidos de FPI. En contraste, la tinción inmunohistoquímica para MICA fue negativa en las secciones de pulmón normal así como en muestras de tejido pulmonar incubadas con sueros no inmunes.

### **17.6 Determinación de NKG2D en células de LBA**

Tomando en consideración que la función de MICA está estrechamente relacionada con la expresión del receptor de activación NKG2D en diferentes células del sistema inmune, se investigó la expresión de éste en células obtenidas del LBA de pacientes con FPI (n=6), pacientes con neumonitis por hipersensibilidad (NH) (n=3) y controles sanos (n=3). Las células de pacientes con NH se utilizaron porque esta enfermedad representa un padecimiento inflamatorio, con un fuerte componente inmunológico que puede progresar a la fibrosis.



**Figura 15.** Expresión de MICA en secciones de tejido de dos diferentes pacientes con FPI. Se observa una fuerte tinción en células epiteliales (A y B) y fibroblastos (C). Los pulmones normales no mostraron tinción (D). Panel E: Tejido pulmonar de FPI incubado con suero no inmune como control negativo (E)

Nuestros resultados mostraron que el porcentaje total de las células de LBA que expresan el marcador NKG2D es considerablemente menor en los pacientes con FPI comparado con los pacientes con NH y controles sanos.

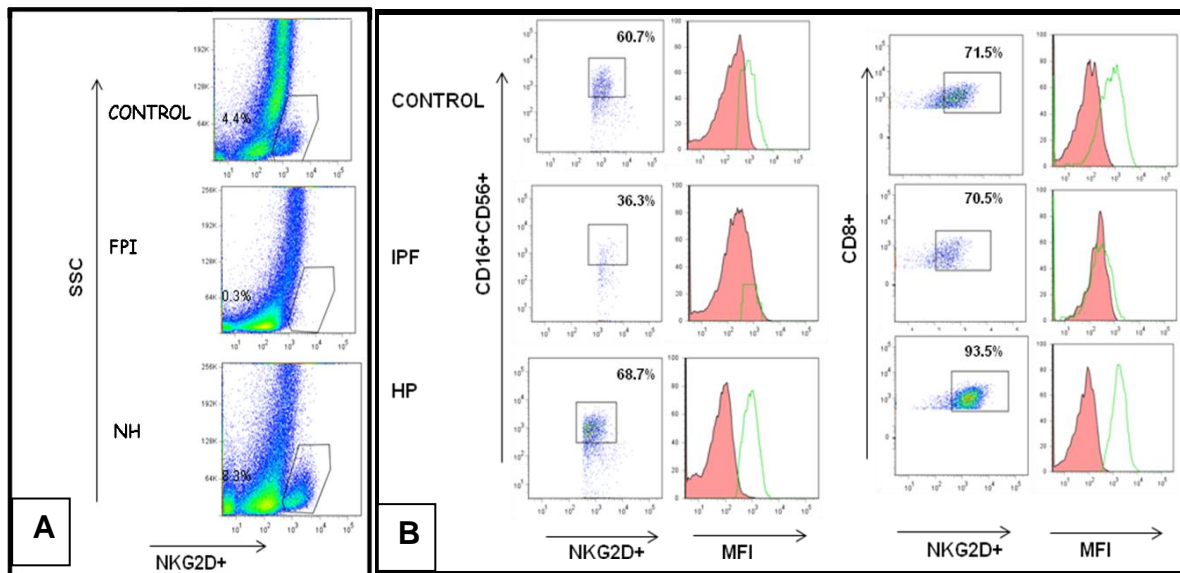
El análisis de las subpoblaciones de células T, mostró una disminución significativa de la expresión de NKG2D en las células T  $\gamma\delta$  y células NK, con una distribución similar en las células T CD8 (**Tabla 9**).

La intensidad de la fluorescencia también se observó disminuida en las células de LBA de pacientes con FPI en comparación con los sujetos sanos y los pacientes con NH, lo que nos indica que el número de receptores por célula también se encuentra disminuido en los pacientes con FPI (**Figura 16**).

**Tabla 9.** Expresión de NKG2D sobre las células obtenidas de LBA.

|                                | NKG2D<br>en células<br>totales de<br>de LBA* | NKG2D/CD8+ | NKG2D/NK    | NKG2D/ $\gamma\delta$ | NKG2D<br>CD4+ |
|--------------------------------|--|------------|-------------|-----------------------|---------------|
| <b>Control (n = 3)</b>         | 4.0 ± 0.4                                    | 71.1 ± 4.8 | 66.1 ± 5.9  | 37 ± 5.7              | 0.6 ± 0.2     |
| <b>FPI<sup>♣</sup> (n = 6)</b> | 0.7 ±<br>0.6**                               | 71.3 ± 13  | 39.1 ± 9.5* | 11.4 ± 3.8**          | 4.0 ± 4.7     |
| <b>NH<sup>⊥</sup> (n = 3)</b>  | 7.3 ± 1.8                                    | 84.9 ± 10  | 68.2 ± 10   | 28.3 ± 8.7            | 3.2 ± 2.1     |

\* Lavado Bronquioalveolar; <sup>♣</sup> Fibrosis Pulmonar Idiopática; <sup>⊥</sup> Neumonitis por hipersensibilidad; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



**Figura 16.** (A) Los pacientes con FPI muestran una disminución en el porcentaje células totales de LBA que expresan NKG2D; se muestra un ejemplo representativo de 5 experimentos. Los números indican el porcentaje de células en cada ventana,. (B) Expresión de NKG2D en células NK y CD8+ de pacientes con FPI, NH y controles sanos. Las células T del LBA fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3, CD8, CD16, CD56 y NKG2D, para su análisis multiparamétrico en el citómetro de flujo; los números indican el porcentaje de células en cada ventana. Los histogramas a color representan los controles de isotipo mientras que los histogramas sin color representan el anticuerpo indicado (NKG2D).

## **18. Discusión**

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad progresiva e irreversible asociada con una alta morbilidad y mortalidad. Los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la FPI no se conocen con precisión, pero la enfermedad se considera un padecimiento complejo, esto es, el resultado final de la interacción entre factores ambientales y variantes en uno o varios genes. Entre los primeros destacan el tabaquismo y la exposición a polvos de madera, metales y ganado vacuno que diversos estudios epidemiológicos han encontrado como probables factores de riesgo (59).

En lo que se refiere a la susceptibilidad genética, los posibles genes implicados no se conocen, aunque estudios de casos y controles han revelado que algunos polimorfismos de citocinas, proteínas del surfactante y de la enzima MMP-1 muestran una cierta asociación (54, 55).

En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio en la búsqueda de relación entre los locus de la región MHC y FPI se identificaron algunos polimorfismos de predisposición asociados a esta enfermedad (16). Entre los locus genéticos que podrían constituir un eslabón potencial entre la regulación genética y los componentes ambientales de la respuesta inmune, y que se encuentra estrechamente relacionado a MHC, se halla MICA lo que lo hace un gene candidato atractivo para ser evaluado (134).

Es importante destacar que la proteína MICA no esta implicada en la presentación de antígenos, pero desempeña un papel importante en la respuesta inmune al

unirse a su inmunoreceptor NKG2D el cual provee señales de estimulación para la activación directa de los mecanismos de citotoxicidad en las células NK, y señales de coestimulación para las células T CD8+ y  $\gamma\delta$ . La unión de MICA a NKG2D estimula los mecanismos de citotoxicidad lo que causa la muerte de células dañadas.

En este contexto, uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar el polimorfismo del gen MICA localizado en la región de clase I (entre los locus HLA-B y BAT) en una cohorte de pacientes con FPI. Asimismo, quisimos examinar la localización de la proteína MICA en los pulmones de pacientes con este padecimiento, y determinar sus niveles circulantes. Por último, y dado que la función de MICA está estrechamente relacionada con la expresión de NKG2D analizamos el porcentaje de células pulmonares obtenidas por lavado bronquioalveolar que presentaban este receptor.

Nuestros resultados revelaron que MICA se expresa en pulmones con FPI, tanto en células epiteliales alveolares como células mesenquimatosas que forman los focos de fibroblastos/miofibroblastos. Este podría ser un mecanismo de defensa importante ya que las células epiteliales alveolares anormalmente activadas son responsables de la producción de la mayor parte de los mediadores profibroticos en este padecimiento (20). De manera similar, la persistencia de focos de fibroblastos/miofibroblastos parece ser un proceso patológico clave que conduce a la acumulación anormal e irreversible de la matriz extracelular en el pulmón (135). De esta manera, tanto las células epiteliales aberrantemente activadas, como los fibroblastos deberían ser el objetivo de lisis celular mediada por citotoxicidad.

En cuanto al polimorfismo del gen MICA encontramos que la frecuencia del alelo MICA\*001 y el genotipo MICA\*001/\*00201 fue considerablemente mayor en los pacientes con FPI sugiriendo que estas variantes pudieran predisponer a la enfermedad. Sin embargo, es importante señalar que estas diferencias se observaron en un alelo y un genotipo que tienen bajas frecuencias en nuestra población. Asimismo, algunos genotipos no fueron detectados (sobre todo en pacientes FPI) lo que podría ser debido a una baja representación o una verdadera ausencia de ciertos alelos y genotipos de MICA en nuestra población.

Con el fin de indagar si esta asociación de algunos alelos MICA con la FPI eran debido al desequilibrio con el locus HLA-B, tipificamos aproximadamente la mitad de pacientes que habían sido previamente tipificados para MICA y controles sanos con lo cual establecimos que la asociación descrita con los alelos de MICA, es independiente de HLA-B a pesar del desequilibrio que existe entre estos dos locus.

Así mismo, buscando una correlación funcional entre los alelos de MICA y el receptor NKG2D, agrupamos y analizamos en los grupos de estudio los alelos de MICA según la presencia de valina o metionina en la posición 129 del dominio  $\alpha 2$  (polimorfismo una A por una G dentro del exón 3 en la posición 454), los cuales se han asociado con una alta o baja afinidad para su unión con el receptor NKG2D (133); Sin embargo, no encontramos diferencias entre las frecuencias de estas variantes de MICA entre los pacientes con FPI y los controles sanos.

No obstante, es conveniente señalar que existen numerosos polimorfismos dentro de los exones 2, 3 y 4 del gen MICA, donde se codifican los tres dominios extracelulares de la molécula (136). Estos polimorfismos también pueden condicionar un grado diferente de afinidad en su unión con NKG2D (137) o su expresión anormal (138). Además, los polimorfismos de MICA pueden influir no sólo en su afinidad de unión a NKG2D sino también la liberación de la forma soluble de MICA de la superficie celular la cual puede inhibir la actividad de NKG2D (139).

En este contexto, una observación relevante en el estudio fue que nuestros pacientes con FPI mostraron un porcentaje menor de células pulmonares que tienen el receptor NKG2D así como una disminución significativa del número de receptores por la célula. Esta disminución puede estar al menos parcialmente relacionada con la presencia de MICA soluble, ya que se encontró que el 35% de los pacientes con FPI tienen niveles detectables de MICA soluble en plasma, contra solo el 15% de nuestros controles. Este fenómeno es relevante debido a que parece ser un importante mecanismo de evasión inmunológica en cáncer y lo mismo podría estar ocurriendo en FPI.

En cáncer se ha encontrado que MICA soluble es reconocida por el receptor NKG2D, posteriormente es endocitada y degradada junto con el receptor y con este proceso se interfiere el mecanismo inmunológico normal que se espera se lleve a cabo en la eliminación de células neoplásicas y que en el caso de la FPI podrían ser las células epiteliales y fibroblastos anormalmente activados.

Así, este fenómeno pudiera explicar al menos parcialmente la persistencia de las células epiteliales anormales así como de los focos de fibroblastos, que a pesar de que expresan MICA y deberían ser eliminadas no ocurre así. Estos procesos han sido asociados con la inexorable progresión de la enfermedad (135).

Por otro lado, existen estudios que indican que el TGF- $\beta$ 1, un potente mediador fibrogénico, puede suprimir la actividad lítica de las células NK inhibiendo la expresión del receptor NKG2D (140). La FPI se caracteriza por niveles aumentados de TGF- $\beta$ 1 en pulmón (141), sugiriendo que este mediador puede estar implicado en la expresión disminuida de este receptor que observamos en las células inmunes pulmonares de nuestros pacientes. Además, se ha sugerido recientemente que la expresión sostenida de MICA y TGF- $\beta$  podría conducir a la modulación de NKG2D con la inhibición subsecuente de los mecanismos de citotoxicidad dependientes de NKG2D (125).

Asimismo, un reporte reciente mostró que las especies reactivas de oxígeno tienen un papel importante en la disminución de la expresión del receptor de activación NKG2D sobre las células NK (142). Dado que el estrés oxidativo es un proceso patológico importante en la FPI, el incremento local de radicales libres de oxígeno podrían también participar en las alteraciones observadas con el receptor en este estudio (143).

En el resumen, este es el primer estudio que demuestra que algunos polimorfismos del gene de MICA así como un incremento en la expresión de MICA, asociada con la disminución del receptor NKG2D están presentes en



pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. El efecto puede estar relacionado con la disfunción de células T y asesinas naturales (NK) en el microambiente pulmonar con la consiguiente evasión de los mecanismos de defensa inmunes innatos por parte de las células epiteliales anormalmente activadas y/o fibroblastos. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para revelar el papel preciso de estas anomalías en la patogénesis de la enfermedad.

## **19. Conclusiones**

Nuestros resultados revelaron que MICA se expresa en células epiteliales alveolares y en células mesenquimatosas que forman los focos de fibroblastos/miofibroblastos.

La frecuencia del alelo MICA\*001 y el genotipo MICA\*001/\*00201 fue considerablemente mayor en los pacientes con FPI sugiriendo que estas variantes pudieran predisponer a la enfermedad.

La asociación descrita con MICA, es independiente de HLA-B a pesar del desequilibrio que existe entre estos dos locus.

No se encontraron diferencias entre las frecuencias de las variantes de MICA con afinidad alta o baja para NKG2D entre pacientes con FPI y los controles sanos.

No existen diferencias en la frecuencias alélicas de pacientes y controles en la variante que condiciona a que la proteína sea soluble (MICA\*00801). Los pacientes con IPF mostraron un porcentaje menor de células pulmonares que tienen el receptor NKG2D así como una disminución significativa del número de receptores por célula.

## 20. Bibliografía

- 1.- American Thoracic Society/European Respiratory Society. (2002). International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*; 166: 277–304
- 2.- Selman M., King Jr. Talmadge E. and Pardo A. (2001). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med*; 134: 136-151
- 3.- Pardo A. and Selman M. (2002). Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in Bioscience*; 7: 1743-1761
- 4.- Pardo A., Selman M. (2002). Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*; 34; 1534-8
- 5.- Hamman L, Rich AR. (1933). Clinical pathologic conference. *Int Clin*;1: 196-231
- 6.- Hamman L, Rich AR. (1935). Fulminating diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Trans Am Clin Climatol Assoc*; 51: 154-163
- 7.- Hamman L, Rich AR. (1944). Acute diffuse interstitial fibrosis of lungs. *Bull Johns Hopkins Hosp*; 74: 177-212
- 8.- Homolka J. (1987). Idiopathic pulmonary fibrosis: a historical review. *CMAJ*; 137: 1003-1005
- 9.- Hodgson U. (2006). Idiopathic pulmonary fibrosis-from epidemiology to gene mapping. Academic dissertation ISBN 952-91-9839-6 (print) ISBN 952-10-2879-3 University of Helsinki
- 10.- Meltzer E.B. and Noble P.W. (2008). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 26 (3):8
- 11.- Verleden G.M., du Bois R.M., Bouros D., Drentz M., Millar A., Müller-Quernheim J., Semenzato G., Johnson S., Sourvinos G., Olivieri D., Pietinalhozz A., Xaubet A. (2001). Genetic predisposition and pathogenetic mechanisms of interstitial lung diseases of unknown origin. *Eur Respir J*; 18: Suppl. 32: 17s–29s
- 12.- Nadrous H.F., Myers J.L., Decker P.A. and Ryu J.H. (2005). Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Patients Younger Than 50 Years. *Mayo Clin Proc*; 80: 37-40
- 13.- Raghu G., Weycker D., Edelsberg J., Bradford W.Z., Oster G. (2006). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 174: 810-816

- 14.- Olson A.L., Swigris J.J., Lezotte D.C., Norris J.M., Wilson C.G. and Brown K.K. (2007). Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med* ; 176: 277-284
- 15.- Loyd J.E. (2003). Pulmonary fibrosis in families. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 29: Suppl. 3, s47–s50
- 16.- Falfán-Valencia R., Camarena A., Juárez A., Becerril C., Montaña M., Cisneros J., Mendoza F., Granados J., Pardo A., Selman M. (2005). Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet*; 118: 235-244
- 17.- Taskar V.S, Coultas D.B. (2006). Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc*; 3: 293-298
- 18.- Steele M.P., Speer M.C., Loyd J.E., Brown K.K., Herron A., Slifer S.H., Burch L.H., Wahidi MM., Phillips J.A., 3rd, Sporn T.A., Mc Adams H.P., Schwarz M.I., Schwartz D.A., (2005). Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*; 172: 1146-1152.
- 19.- Andersson-Sjöland A., de Alba C.G., Nihlberg K., Becerril C., Ramírez R., Pardo A., Westergren-Thorsson G., Selman M. (2008). Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*; 40: 2129-2140
- 20.- Selman M. and Pardo A. (2006). Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis From Innocent Targets to Serial Killers. *Proc Am Thorac Soc*; 3: 364–372
- 21.- Pardo A., Selman M., Kaminski N. (2008). Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*; 40: 1141–1155
- 22.- Selman M., Pardo A. (2002). Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res*; 3 (1): 3
- 23.- Uhal B.D., Joshi I, Hughes W.F., Ramos C., Pardo A., Selman M. (1998). Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol*; 275: 1192-1199
- 24.- Selman M., Pardo A., Barrera L., Estrada A., Watson S.R., Wilson K., Aziz N. (2006). Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*; 173: 188–198
- 25.- Clark, E. A., & Ledbetter, J. A. (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature* 367, 425–428.

- 26.- Mason, D. W. (1987). Subpopulations of T lymphocytes. *Immunol Lett* 14, 269– 270.
- 27- Romagnani S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today*; 12: 256–7
- 28.- Mosmann T.R., Coffman R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Adv Immunol*; 46: 111-47
- 29.- Abbas A., Murphy K., Sher A. (1996). Funcional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*; 383: 787-793
- 30.- Constant S, Bottomly K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol*; 15: 297-322
- 31.- O'Garra A. (1998). Cytokines induce the development of funcionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*; 8: 275-283
- 32.- Romagnani Sergio. (1994). Lymphokine production by human T cell in disease states. *Annu.Rev. Immunol*; 12: 227-57
- 33.- Thannickal V., Toews G.B., White E.S., Lynch III J.P., and Martinez F.J. (2004). Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu. Rev. Med*; 55: 395-417
- 34.- Wallace W.A., Howie S.E., (1999). Immunoreactive interleukin 4 and interferon-gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol*; 187: 475-480
- 35.- Emura M., Nagai S., Takeuchi M., Kitaichi M., Izumi T. (1990). In vitro production of B cell growth factor and B cell differentiation factor by peripheral blood mononuclear cells and bronchoalveolar lavage T lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*; 82: 133–139.
- 36.- Fertin C., Nicolas J.F., Gillery P., Kalis B., Banchereau J., Maquart F.X. (1991). Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol*; 37: 823-829
- 37.- Belperio J.A., Dy M., Burdick M.D., Xue Y.Y., Li K., Elias J.A., Keane M.P. (2002). Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 27: 419-427

- 38.- Blease K., Jakubzick C., Westwick J., Lukacs N., Kunkel S.L., Hogaboam C.M. (2001). Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol*; 166: 5219-5224.
- 39.- Lanone S., Zheng T., Zhu Z., Liu W., Lee C.G., Ma B., Chen Q., Homer R.J., Wang J., Rabach L.A., Rabach M.E., J. Shipley M.I., Shapiro S.D., Senior R.M., and Elias J.A. (2002). Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J. Clin. Invest*; 110: 463-474
- 40.- Xu Y.D., Hua J, Mui A., O'Connor R., Grotendorst G., Khalil N. (2003). Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 285: 527-539.
- 41.- Khalil N., O'Connor R.N., Flanders K.C., Unruh H. (1996). TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 14: 131-138
- 42.- Horan GS, Wood S, Ona V, Li DJ, Lukashev ME, Weinreb PH, Simon KJ, Hahm K, Allaire NE, Rinaldi NJ, Goyal J, Feghali-Bostwick CA, Matteson EL, O'Hara C, Lafyatis R, Davis GS, Huang X, Sheppard D, Violette SM. (2008). Partial inhibition of integrin alpha(v)beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*; 177: 56-65
- 43.- Grutters J.C. and du Bois R.M. (2005). Genetics of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J*; 25: 915-927
- 44.- Lee H.L., Ryu J.H., Wittmer M.H., Hartman T.E., Lymp J.F., Tazelaar H.D., Limper A.H. (2005). Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest*; 127: 2034-2041
- 45.- Rosas I.O., Ren P., Avila N.A., Chow C.K., Franks T.J., Travis W.D., McCoy J.P. Jr., May R.M., Wu H.P., Nguyen D.M., Arcos-Burgos M., Mac Donald S.D., Gochuico B.R. (2007). Early interstitial lung disease in familial pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 176: 698-705
- 46.- Whitsett J.A., Bachurski C.J., Barnes K.C., Bunn P.A., Jr., Case L.M., Cook D.N., Crooks D., Duncan W. M., Dwyer-Nield L., Elston R.C., Fessler M.B., Franklin W.A., Friedman N., Garcia J.G. N., Geraci M.W., Glasgow C., Glasser S.W., Hardie W.D., Henning L.M., Johnson G.L., Kawkitinarong K., Keith R.L., Korfhagen T.R., Leikauf G.D., Liggett S.B., Malcolm K.C., Malkinson A.M., Mariani T.J., McDowell S.A., McGraw D.W., Medvedovic M., Moss J., Nogee L.M., Nonas S., Pacheco-Rodriguez G., Palmer L.J., Peters D.G., Prows D.R., Redline S.,

Regev A., Sartor M.A., Schwartz D.A., Silverman E.K., Steagall W.K., Stearman R.S., Taveira-DaSilva A., Tichelaar J.W., Tomlinson C.R., Tsukada K., Weaver T.E., Wert S.E., Wesselkamper S.C., Worthen G.S., Xu Y., Zerbe L., Zhang Y., Zhang Y., Choi A.M. K. and Kaminski N. (2004). Functional Genomics of Lung Disease Genes and Gene Polymorphisms Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*; 31: S1-S81

47.- Allam J.S. and Limper A.H. (2006). Idiopathic pulmonary fibrosis: is it a familial disease?. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*; 12: 312–317

48.- Garcia C.K., Wright W.E., and Shay J.W. (2007). Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging. *Nucleic Acids Research*; 35: 7406-16

49.- Tsakiri K.D., Cronkhite J.T., Kuan P.J., Xing C., Raghu G., Weissler J.C., Rosenblatt R.L., Shay J.W., and Garcia C.K. (2007). Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *PNAS*; 104: 7552-7

50.- Alder J.K., Chen J.J.L., Lancaster L., Danoff S., Su Shu-chih, Cogan J.D., Vulto I., Xie M., Qi X., Tudor R.M., Phillips J.A., Lansdorp P.M., Loyd J.E., and Armanios M.Y. (2008). Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *PNAS*; 105: 13051–13056

51.- Cronkhite J.T, Xing C., Raghu G., Chin K.M., Torres F., Rosenblatt R.L., Garcia C.K. (2008). Telomere Shortening in Familial and Sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 178: 729-737

52.- Thomas, A.Q., Lane K., Phillips J 3rd., Prince M., Markin C., Speer M., Schwartz D.A., Gaddipati R., Marney A., Johnson J., Roberts R., Haines J., Stahlman M., and Loyd J.E.. (2002). Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165; 1322-1328

53.- Pantelidis P., Veeraraghavan S. and du Bois R.M. (2002). Surfactant gene polymorphisms and interstitial lung diseases. *Respir Res*; 3: 14

54.- Selman M, Lin HM, Montañó M, Jenkins AL, Estrada A, Lin Z, Wang G, Di Angelo SL, Guo X, Umstead TM, Lang CM, Pardo A, Phelps DS, Floros J. (2003). Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet*; 113: 542-550

- 55.- Checa M, Ruiz V, Montaña M, Velázquez-Cruz R, Selman M, Pardo A. (2008). MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet*; 124: 465-472
- 56.- Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering R.C., Bruford E.A., Khodiyar V.K., Lush M. J., Povey S., Talbot Jr C.C., Wright M.W., Wain H.M., Trowsdale J., Ziegler A. and Beck S. (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews genetics*; 5: 889-899
- 57.- Gruen J., Weissman S.M. (1997) Evolving Views of the Major Histocompatibility Complex. *Blood*; 90: 4252-4265
- 58.- Shiina T., Inoko H., Kulski J.K. (2004). Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *Tissue Antigens*; 64: 631–649
- 59.- Skov S., Pedersen M.T, Andresen L., Straten P.T., Woetmann A., and Ødum N. (2005). Cancer Cells Become Susceptible to Natural Killer Cell Killing after Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Due to Glycogen Synthase Kinase-3–Dependent Expression of MHC Class I–Related Chain A and B. *Cancer Res*; 65:11136-45
- 60.- Xie T., Rowen L., Aguado B., Ahearn M.E., Madan A., Qin S., Campbell R. D., and Hood L. (2003) Analysis of the Gene-Dense Major Histocompatibility Complex Class III Region and Its Comparison to Mouse. *Genome Res*; 13: 2621-2636
- 61.- Bahram S, Bresnahan M, Gerahty DE, Spies T. (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *PNAS*; 91: 6259-6263
- 62.- Leelayuwat C, Townend D.C., Degli-Esposti M.A., Abraham L.J., Dawkins R.L. (1994). New polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics*; 40: 339-51
- 63.- Wongsena W., Sconocchia G., Cho H.S., Chang C.-C., Wang X., Klumkrathok K., Ferrone S. & Leelayuwat C. (2008). Production and characterization of monoclonal antibodies against major histocompatibility complex class I chain-related gene A. *Tissue Antigens*; 72: 431–440
- 64.- Hui J., Palmer L. J., Jamesw A. L., Muszk A. W. and Beilbyz J. P. (2006). AluYMICB dimorphism within the class I region of the major histocompatibility complex is associated with asthma and airflow obstruction in the Busselton population. *Clinical and Experimental Allergy*; 36: 728-734



- 65.- Chung-Ji L., Yann-Jin L., Kuo-Wei C., Yi-Ning S., Hsin-Fu L., Ching-Wen D. (2004). Polymorphism of the MICA gene and risk for oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med*; 33: 1-6
- 66.- Mendoza-Rincon J., Arguello J.R, Perez-Rodriguez M., Whinnie A.M., Marsh Steve G.E., Fischer G., Madrigal J.A. (1999). Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing. *Immunogenetics*; 49: 471-478
- 67.- Lucas D., Campillo J.A., López-Hernández R., Martínez-García P., López-Sánchez M., Botella C., Salgado G., Minguela A., Álvarez-López M.R., Muro M. (2008). Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Human Immunology*; 69: 655-660
- 68.- Tosh K., Ravikumar M., Tzenova B.J., Meisner S., Hill A., and Pitchappan R. (2006). Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Human Molecular Genetics*; 15: 2880-2887
- 69.- Glas J., Maier K., Wetzke M., Henninger M., Weiss E.H. & Folwaczny M. (2008). MICA\*055: a new allele with eight GCT repeats in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens*; 72 : 404-411
- 70.- Bahram S. (2000). MIC genes: from genetics to biology. *Adv. Immunol*; 76: 1-60
- 71.- Stephens H.A. (2001). MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?. *TRENDS in Immunology*; 22: 378-85
- 72.- Zou Y., Stastny P., Süsal C., Döhler B., and Opelz G. (2007). Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *N Engl J Med*; 357: 1293-300
- 73.- Tamaki S., Sanefuzia N., Kawakamia M., Aokia K., Imaia Y., Yamanakaa Y., Yamamotoa K., Ishitanib A., Hatakea K., Kirita T. (2008). Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *Human Immunology*; 69: 88–93
- 74.- Kim Y.J., Han M.K. and Broxmeyer H.E. (2008). 4-1BB regulates NKG2D costimulation in human cord blood CD8+ T cells. *Blood*; 111;1378-86
- 75.- Groh V, Bahram S, Bauer S, Hernan A, Beauchamp M, Spies T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *PNAS*; 93: 12445-12450

- 76.- Tinto N., Ciacci C., Calcagno G., Gennarelli D., Spampanato A., Farinaro E., Tortora R., Sacchetti L. (2008). Increased prevalence of celiac disease without gastrointestinal symptoms in adults MICA 5.1 homozygous subjects from the Campania area. *Digestive and Liver Disease*; 40; 248–252
- 77.- Holmes M.A., Li P., Petersdorf E.W., and Strong R.K. (2002). Structural Studies of Allelic Diversity of the MHC Class I Homolog MIC-B, a Stress-Inducible Ligand for the Activating Immunoreceptor NKG2D1. *The Journal of Immunology*; 169: 1395–1400
- 78.- Deng L., Mariuzza R.A. (2006). Structural basis for recognition of MHC and MHC-like ligands by natural killer cell receptors. *Semin Immunol*; 18: 156-66
- 79.- Pende D., Rivera P., Marcenaro S., Chang Chien-Chung, Biassoni R., Conte R., Kubin M., Cosman D., Ferrone S., Moretta L., and Moretta A. (2002). Major Histocompatibility Complex Class I-related Chain A and UL16-Binding Protein Expression on Tumor Cell Lines of Different Histotypes: Analysis of Tumor Susceptibility to NKG2D-dependent Natural Killer Cell Cytotoxicity. *Cancer Research*; 62: 6178-6186
- 80.- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, and Spies T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*; 285: 727-729
- 81.- Ljunggren HG and Karre K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*; 11: 237-244
- 82.- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, and Moretta L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*; 19: 197-223.
- 83.- Trinchieri G. (1990). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*; 47: 187-376
- 84.- Eisele G., Wischhusen J., Mittelbronn M., Meyermann R., Waldhauer I., Steinle A., Weller M. and Friese—Manuel A. (2006). TGF- $\beta$  and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* ; 129 : 2416-2425
- 85.- Gannage M., Buzyn A., Bogiatzi S.I., Lambert M., Soumelis V., Dal Cortivo L., Cavazzana-Calvo M., Brousse N., and Caillat. (2008). Induction of NKG2D Ligands by Gamma Radiation and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  May Participate in the Tissue Damage During Acute Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation*; 85: 911–915

- 86.- Wu J., Groh V., and Spies T. (2002). T Cell Antigen Receptor Engagement and Specificity in the Recognition of Stress-Inducible MHC Class I-Related Chains by Human Epithelial T Cells. *The Journal of Immunology*; 169: 1236-1240
- 87.- Yahamoto K., Fujiyama Y., Andoh A., Bamba T., Okabe H. (2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochimica et Biophysica Acta*; 1526: 10-12
- 88.- Seliger B., Abken H., Ferrone S. (2003). HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends in immunology*; 24: 82-87
- 89.- Wu J.D., Higgins L.M., Steinle A., Cosman D., Haugk K., and R Stephen. (2004) Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer Plymate. *J. Clin. Invest*; 114: 560–568.
- 90.- Mizuki N., Meguro A., Tohnai I., Gül A., Ohno S., and Mizuki N. (2007). Association of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A and HLA-B Alleles with Behçet's Disease in Turkey; *Jpn J Ophthalmol*; 51: 431-6
- 91.- Oliveira L.A., Ribas F., Bicalho M.G., Tsuneto L.T. and Petzl-Erler M.L. (2008). High frequencies of alleles MICA\*020 and MICA\*027 in Amerindians and evidence of positive selection on exon 3. *Genes Immun*; 9: 697-705
- 92.- Berzina L, Shtauvere-Brameus A, Rumba I, Sanjeevi C.B. (2002). Microsatellite allele A5.1 of MHC class I chain-related gene A is associated with latent autoimmune diabetes in adults in Latvia. *Ann NY Acad Sci*; 958: 353–356
- 93.- Bilbao J.R., Martín-Pagola A., Pérez De Nanclares G., Calvo B., Vitoria J.C., Vázquez F., Castaño L. (2003). HLADRB1 and MICA in autoimmunity: common associated alleles in autoimmune disorders. *Ann NY Acad Sci*; 1005: 314-8
- 94.- Gonzalez S., Brautbar C., Martinez-Borra., Lopez-Vazquez A., Segal R., Blanco-Gelaz M.A., Enk C.D., Safriman C., Lopez-Larrea C. (2001). Polymorphism in MICA rather than HLA-B/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. *Human Immunol*; 62: 632-8.
- 95.- Park Y.S., Sanjeevi C.B., Robles D., Yu L., Rewers M., Gottlieb P.A., Fain P., Eisenbarth G.S. (2002). Additional association of intra-MHC genes, MICA and D6S273, with Addison's disease. *Tissue Antigens*; 60: 155-63
- 96.- Tay G.K, Hui J., Gaudieri S., Schmitt-Egenolf M., Martinez O.P., Leelayuwat C., Williamson J.F. Eiermann T.H., Dawkins R.L. (2000). PERB11 (MIC): a

polymorphic MHC gene is expressed in skin and single nucleotide polymorphisms are associated with psoriasis. *Clin Exp Immunol*; 119: 553-8

97.- Melum E., Karlsen T.H., Schrumpf E., Bergquist A., Thorsby E., Boberg K.M. and Lie B.A. (2008). Cholangiocarcinoma in Primary Sclerosing Cholangitis Is Associated with NKG2D Polymorphisms. *Hepatology*; 47: 8-10

98.- Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., Phillips J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*; 285: 730-732

99.- Das H., Groh V., Kuijl C., Sugita M., Morita C.T., Spies T., Bukowski J.F. (2001). MICA engagement by human Vg2Vd2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*; 15: 83-93

100.- Groh V., Bruhl A., El-Gabalawy H., Nelson J.L., Spies T. (2003). Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100: 9452-7

101.- Busche A., Goldmann T., Naumann U., Steinle A., Brandau S. (2006). Natural killer cell-mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic overexpression of major histocompatibility complex class I chain-related gene A. *Hum Gene Ther*; 17: 135-46

102.- Friese M.A., Platten M., Lutz S.Z., Naumann U., Aulwurm S., Bischof F., Buhning H.J., Dichgans J., Rammensee H.G., Steinle A., Weller M. (2003). MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res*; 63: 8996-9006

103.- Jinushi M., Hodi F.S., Dranoff G. (2006). Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103: 9190-5

104.- Smyth M.J., Swann J., Cretney E., Zerafa N., Yokoyama W.M., Hayakawa Y. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med*; 202: 583-8

105.- Wiemann K., Mittrucker H-W., Feger U., Welte S.A., Yokoyama W.M., Spies T., Rammensee H.G., Steinle A. (2005). Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol*; 175: 720-9

106.- Screpanti V., Wallin R.P., Grandien A., Ljunggren H.G. (2005). Impact of FasL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol*; 42: 495-9

- 107.- Westwood J.A., Kelly J.M., Tanner J.E., Kershaw M.H., Smyth M.J., Hayakawa Y. (2004). Novel priming of tumor-specific immunity by NKG2D-triggered NK cell-mediated tumor rejection and Th1-independent CD4+ T cell pathway. *J Immunol*; 172: 757-61
- 108.- Baetu T.M., Hiscott J. (2002). On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev*; 13: 199-207
- 109.- Waldhauer I. and Steinle A. (2006). Proteolytic Release of Soluble UL16-Binding Protein 2 from Tumor Cells. *Cancer Res*; 66: 2520-6
- 110.- Xu X., Rao G., Gaffud M.J., Ding H.G., Maki G., Klingemann H.G., Groh V., Spies T., Caillat-Zucman S., Gattuso P., Plate J., and Prinz R.A. (2006). Clinicopathological Significance of Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A and B Expression in Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 91: 2704-2712
- 111.- Spies T. (2008). Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair. *Nature Immunology*; 9: 1013-1015
- 112.- Arreygue-Garcia N.A., Daneri-Navarro A., del Toro-Arreola A., Cid-Arregui A., Gonzalez-Ramella O., Jave-Suarez L.F, Aguilar-Lemarroy A., Troyo-Sanroman R., Bravo-Cuellar A., Delgado-Rizo V., Garcia-Iglesias T., Hernandez-Flores G. and del Toro-Arreola S. (2008). Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*; 8:16
- 113.- Groh V., Wu J., Yee C., Spies T. (2002). Tumour-derived solubleMIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*; 419: 734-8
- 114.- Holdenrieder S., Stieber P., Peterfi A., Nagel D., Steinle A. and Salih H.R. (2006). Soluble MICA in malignant diseases. *Int. J. Cancer*; 118: 684-687
- 115.- Märten A., von Lilienfeld-Toal M., Beuchler M.W. and Schmidt J. (2006). Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing cd T cell cytotoxicity. *Int. J. Cancer*; 119: 2359-2365
- 116.- Salih H.R., Hans-Georg R., and Steinle A. (2002). Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *The Journal of Immunology*; 169: 4098-4102.

- 117.- Salih H.R., Antropius H., Gieseke F., Lutz S.Z., Kanz L., Rammensee HG, Steinle A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*; 102: 1389-96
- 118.- Watson N.F.S., Spendlove I., Madjd Z., Mc Gilvray R., Green A.R., Ellis I.O., Scholefield J.H. and Durrant L.G. (2006). Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*; 118: 1445-1452
- 119.- Reinders J., Rozemuller E.H., van der Ven K.J.W., Caillat-Zucman S., Slootweg P.J., de Weger R.A., and Tilanus M.G.J. (2006). MHC Class I Chain-Related Gene A Diversity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Human Immunology*; 67: 196-203
- 120.- Xiao P., Xue L., Che L-H., Peng J-J., Wu H-X., Li Y. and Qiao H. (2008). Expression and roles of MICA in human osteosarcoma. *Histopathology*; 52: 640-2
- 121.- Groh V., Rhineart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., and Spies T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gd T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 96: 6879-84
- 122.- Waldhauer I., Goehlsdorf D., Gieseke F., Weinschenk T., Wittenbrink M., Ludwig A., Stevanovic S., Rammensee H-G, and Steinle A. (2008) Tumor-Associated MICA Is Shed by ADAM Proteases. *Cancer Res*; 68: 6368–76
- 123.- Chen X.M., Xu X.Q., Sun K., Hallett W.H.D., Zhao J.D. & Zhang D.L. (2008). NKG2D Ligands Expression and NKG2D-Mediated Cytotoxicity in Human Laryngeal Squamous Carcinoma Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*; 67: 441-447
- 124.- Strid J., Scott J.R., Filler R.B, Lewis J.M, Kwong B.Y, Schpero W., Kaplan D. H., Hayday A.C & Girardi M. (2008). Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis. *Nat Immunol*; 9: 146-54
- 125.- Zhang C., Zhang J., Niu J., Zhang J., Tian Z. (2008). Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine*; 42: 128-136
- 126.- Azimi N., Jacobson S., Tanaka Y., Corey L., Groh V. and Spies T. (2006). Immunostimulation by induced expression of NKG2D and its MIC ligands in HTLV-1-associated neurologic disease. *Immunogenetics*; 58: 252–258

- 127.- Arguello J.R., Little A.M., Bohan E., Goldman J.M., Marsh S.G. & Madrigal J.A. (1998). High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). *Tissue Antigens*; 52: 57-66
- 128.- Pérez-Rodríguez M., Argüello J.R, Fischer G., Corell A., Cox S.T., Robinson J., Hossain E., McWhinnie A., Travers P.J, Marsh S.G.E. and Madrigal J.A. (2002). Further polymorphism of the MICA gene. *European Journal of Immunogenetics*; 29: 35-46
- 129.- Olerup O., Aldener A., Fogdell A. (1993). HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*; 41: 119-134
- 130.- Zetterquist H., Bengtsson M., Backstrom G., Egle-Jansson I., Ekdahl A.M., Grunnet N., Gustafsson I., Knutsen I., Kuhle A., Rydberg L., Spurkland A., Steffensen R., Storgards M., Szojmer E., Soderholm G., Thuresson B., Turesson H., Olerup O. (1997). Report from the HLA class II typing by PCR-SSP Multicentre Study. *Eur J Immunogenet*; 24: 191-199
- 131.- Pardo A., Barrios R., Maldonado V., Melendez J., Perez J., Ruiz V., Segura-Valdez L., Sznajder J.I., Selman M. (1998). Gelatinases A and B are up-regulated in rat lung by subacute hyperoxia: pathogenetic implication. *Am J pathol*; 153: 833-44
- 132.- Barrera L., Mendoza F., Zuñiga J., Estrada A., Zamora A.C., Melendro Emma I., Ramírez R., Pardo A., Selman M. (2008). Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*; 177: 44-55
- 133.- Muñoz-Saá I., Cambra A., Pallarés L., Espinosa G., Juan A., Pujalte F., Matamoros N., Mila J., and Julia M.R. (2005). Allelic Diversity and Affinity Variants of MICA are Imbalanced in Spanish Patients with Behcet's Disease. *Scand J Immunol*; 64: 77-82
- 134.- Amroun H., Djoudi H., Busson M., Allat R., El Sherbini SM., Sloma I., Ramasawmy R., Brun M., Dulphy N., Krishnamoorthy R., Toubert A., Charron D., Abbadi M.C., Tamouza R. (2005). Early-Onset Ankylosing Spondylitis Is Associated With a Functional MICA Polymorphism. *Human Immunology*; 66:1057-61
- 135.- Selman M., Thannickal V.J., Pardo A., Zisman D.A., Martinez F.J., Lynch J.P. (2004). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs*; 64: 405-430

- 136.- Robinson P., Stuber D., Deryckere F., Tedbury P., Lagrange M., Orfanoudakis G.(2005). Identification using phage display of peptides promoting targeting and internalization into HPV-transformed cell lines. *J Mol Recognit*; 18: 175-182
- 137.- Steinle A., Li P., Morris D.L., Groh V., Lanier L.L., Strong R.K., Spies T. (2001). Interactions of human NKG2D with ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*; 53: 279-87
- 138.- Suemizu H., Radosavljevic M., Kimura M., Sadahiro S., Yoshimura S., Bahram S., Inoko H. (2002). A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *PNAS*; 99: 2971-2976
- 139.- Tamaki S., Kawakami M., Yamanaka Y., Shimomura H., Imai Y., Ishida J.I., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., Kirita T. (2008). Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Immunol*; 130: 331-7
- 140.- Lee J.C., Lee K.M., Kim D.W., Heo D.S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol*; 172: 7335-7340
- 141.- Khalil N., Parekh T.V., O'Connor R., Antman N., Kepron W., Yehaulaeshet T., Xu Y.D., Gold L.I. (2001). Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*; 56: 907-915
- 142.- Peraldi M.N., Berrou J., Dulphy N., Seidowsky A., Haas P., Boissel N., Metivier F., Randoux C., Kossari N., Guérin A., Geffroy S., Delavaud G., Marin-Esteban V., Glotz D., Charron D., Toubert A. (2009). Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *J Immunol*; 182: 1696-1705
- 143.- Kinnula V.L., Fattman C.L., Tan R.J., Oury T.D. (2006). Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*; 172: 417-422