



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

**INMUNOREGULACIÓN EN PNEUMONITIS  
POR HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR  
CÉLULAS NKT**

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

**LUIS ARMANDO JIMÉNEZ ALVAREZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MOISÉS SELMAN LAMA**

**COMITÉ TUTORAL: DRA. ANNIE PARDO SEMO**

**DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY**

**MÉXICO, D.F.**

**JUNIO, 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de marzo de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **JIMÉNEZ ÁLVAREZ LUIS ARMANDO** con número de cuenta **505017404** con la tesis titulada: **"INMUNOREGULACIÓN EN NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR CÉLULAS NKT."**, realizada bajo la dirección del: **DR. MOISÉS SELMAN LAMA.**

Presidente:	DRA. ANNIE PARDO SEMO
Vocal:	DR. LUIS LLORENTE PETERS
Vocal:	DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal:	DR. FELIPE VADILLO ORTEGA
Secretario:	DR. MOISÉS SELMAN LAMA
Suplente:	DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
Suplente	DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 29 de noviembre de 2010.

  
Dr. Juan Nájera Farfán  
Coordinador del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)**

**A LOS APOYOS RECIBIDOS POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON NÚMERO DE BECARIO 170161 Y A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP)**

**A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. ANNIE PARDO SEMO Y DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY**

**AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

**AL DOCTOR JOAQUÍN ZUÑIGA POR SUS IMPORTANTES  
APORTACIONES AL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO.**

**EN ESPECIAL AL DOCTOR MOISÉS SELMAN POR SU DIRECCIÓN, POR  
SUS CONSEJOS, POR SU GRAN EJEMPLO Y DEDICACIÓN AL  
DESARROLLO Y FORMACIÓN DE INVESTIGADORES.**

**A AMBOS POR ESTA GRAN OPORTUNIDAD QUE ME HAN BRINDADO.**

**GRACIAS**

# ÍNDICE

	<b>Pag</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>2. ANTECEDENTES</b>	12
<b>Inmunología del pulmón</b>	12
Sistema inmune de la mucosa	13
Macrófagos alveolares	14
Células NK y dendríticas	15
Células T CD8+ y T $\gamma\delta$	16
Células NKT	18
<b>Neumonitis por hipersensibilidad</b>	21
Agentes causales	21
Formas Clínicas	23
Características histopatológicas	24
La conexión con la fibrosis	27
Características del lavado bronquioalveolar en la NH neumonitis por hipersensibilidad	28
Epidemiología	28
Patogénesis	30
Inmunopatogénesis	33
Estudios en modelos experimentales	36

<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	39
<b>4. HIPÓTESIS</b>	39
<b>5. OBJETIVOS</b>	40
Objetivo general	40
Objetivos específicos	40
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	41
Población en estudio	41
Inducción de neumonitis por hipersensibilidad	41
Lavado bronquioalveolar (LBA)	42
Cuantificación de citocinas Th1/Th2 en LBA	42
Análisis histológico	43
Aislamiento de células de pulmón y citometría de flujo	43
Expresión de RNA mensajero de citocinas en tejido pulmonar	44
Análisis estadístico	47
<b>7. RESULTADOS</b>	48
Cuenta total y viabilidad de las células obtenidas en los LBA	48
Cuenta diferencial de las células inflamatorias obtenidas en los LBA	50
Cuantificación de citocinas Th1/Th2 en LBA	53
Inflamación pulmonar inducida por SR	55
Caracterización fenotípica de subpoblaciones celulares aisladas de pulmón	58
Desarrollo del modelo experimental en ratones BALB/c y BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup>	66
Cuenta celular total y diferencial de LBA	66

Los ratones BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup> desarrollan daño pulmonar parecido al observado en la cepa C57BL/6	68
Determinación de células NKT, NK y T $\gamma\delta$	70
Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y GATA-3 en tejido pulmonar	74
<b>8. DISCUSIÓN</b>	76
<b>9. CONCLUSIONES</b>	83
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	84
<b>11. APÉNDICE 1</b>	93

Artículo publicado

Jiménez-Alvarez L, Zuñiga J, Gaxiola M, et al. Inflammatory response and dynamics of lung T cell subsets in Th1, Th2 biased and Th2 deficient mice during the development of hypersensitivity pneumonitis. *Exp. Mol. Pathol.* 88(3):407-415, 2010.



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	<b>Pag</b>
<b>Figura 1.</b> Micrografía de pulmón de un paciente con neumonitis por hipersensibilidad	26
<b>Figura 2.</b> Modelo del desarrollo de Th1 en pulmón	35
<b>Figura 3.</b> Modelo experimental de inducción de neumonitis por hipersensibilidad	46
<b>Figura 4.</b> Número de células inflamatorias obtenidas en los LBA	49
<b>Figura 5.</b> Alteraciones morfológicas pulmonares en ratones sometidos a la inhalación de <i>S. reactivus</i>	56
<b>Figura 6.</b> Evaluación semicuantitativa de la extensión del daño pulmonar inducido por la exposición a <i>S. reactivus</i>	57
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de células NKT obtenidas de tejido pulmonar	61
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de células NK obtenidas de tejido pulmonar	62
<b>Figura 9.</b> Porcentajes de células T $\gamma\delta$ obtenidas de tejido pulmonar	63

<b>Figura 10.</b> Extensión de las lesiones pulmonares en ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup>	69
<b>Figura 11.</b> Porcentajes de células NKT, NK y T $\gamma\delta$ en ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup>	73
<b>Figura 12.</b> Expresión de IFN- $\gamma$ y GATA-3 en tejido pulmonar de ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup>	75
<b>Tabla 1.</b> Perfil celular diferencial en LBA de ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 1 semana con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	51
<b>Tabla 2.</b> Perfil celular diferencial en LBA de ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 3 semanas con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	52
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones de citocinas Th1/Th2 en LBA de ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 3 semanas con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	54
<b>Tabla 4.</b> Relación CD4/CD8 y subpoblaciones de células NK y NKT en ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 1 semana con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	64

<b>Tabla 5.</b> Relación CD4/CD8 y subpoblaciones de células NK y NKT en ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 3 semanas con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	65
<b>Tabla 6.</b> Perfil celular diferencial en LBA de ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup> , estimulados durante 3 semanas con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	67
<b>Tabla 7.</b> Relación CD4/CD8 y subpoblaciones de células NK y NKT en ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup> , estimulados durante 3 semanas con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	72

## RESUMEN

La interacción de varios mecanismos de defensa a lo largo del tracto respiratorio permite la eliminación o neutralización de partículas y/o microorganismos que son permanentemente inhalados. Estos mecanismos comprenden barreras mecánicas, secreción de anticuerpos, así como células de defensa: neutrófilos, macrófagos, células cebadas, basófilos, eosinófilos y células asesinas naturales (del inglés *natural killer* [NK]). Estos eventos son importantes para la respuesta inmune innata y para la capacidad de las células dendríticas y macrófagos de estimular la respuesta de las células T antígeno-específica. Los macrófagos alveolares y los linfocitos tienen la capacidad para producir moléculas como citocinas y factores de crecimiento con el fin de inducir o regular el proceso inflamatorio.

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad inflamatoria provocada por la exposición a una gran variedad de partículas orgánicas las cuales provocan una respuesta inmune exagerada mediada por linfocitos T. Se ha sugerido que la enfermedad está mediada principalmente por respuesta inmune tipo Th1. Sin embargo, el papel de un posible desbalance Th1/Th2 en la patogénesis y en la progresión de NH así como el papel de otras subpoblaciones del sistema inmune no se conocen con precisión.

En este trabajo se estudiaron 138 ratones de diferentes cepas [48 C57BL/6 (respuesta inmune Th1), 69 BALB/c (respuesta inmune Th2) y 21 BALB/c STAT6-/-] como modelos experimentales de NH inducida por *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR). Los ratones experimentales fueron tratados con SR y los ratones control con solución salina durante 1 y 3 semanas y posteriormente fueron sacrificados 1 y 4 días después de la última administración del antígeno. Las subpoblaciones de células T aisladas de pulmón se caracterizaron por citometría de flujo. Adicionalmente, se determinó la extensión del daño pulmonar por microscopía, las concentraciones de citocinas Th1 y Th2 en lavados bronquioalveolares (LBA) por el método de luminex-bioplex y su expresión relativa en tejido pulmonar por RT-PCR en tiempo real.

Se observó un incremento progresivo en la extensión de daño pulmonar en ratones C57BL/6 tratados con SR ( $29.0 \pm 7.4\%$  a la semana versus  $44.0 \pm 5.5\%$  a las 3 semanas;  $p < 0.05$ ) cuando se sacrificaron 4 días después de la última instilación. Por el contrario, los ratones BALB/c silvestres tratados bajo el mismo esquema mostraron una disminución del daño pulmonar ( $36.9 \pm 11.3\%$  a la semana versus  $20.0 \pm 0.0\%$  a las 3 semanas;  $p < 0.05$ ).

El análisis celular diferencial del LBA mostró un incremento de neutrófilos en el lavado bronquioalveolar de los ratones C57BL/6 y BALB/c tratados con SR. También se observó linfocitosis en los ratones BALB/c tratados con SR durante 3 semanas y sacrificados a 4 días. De manera interesante, se observó un incremento significativo de células NKT CD4+ en los ratones C57BL/6, mientras

que las células NKT DN, NK y  $T\gamma\delta$  aumentaron significativamente en ratones BALB/c tratados 3 semanas, sacrificados a 1 y 4 días.

El análisis de las concentraciones de citocinas en el LBA mostró un incremento significativo de IFN- $\gamma$  en C57BL/6 con NH ( $81.8 \pm 16.5$  pg/ml *versus*  $33.5 \pm 27.5$  pg/ml,  $p < 0.05$ ), mientras que los BALB/c mostraron un incremento de IL -4 ( $145.6 \pm 30.5$  pg/ml *versus*  $17.7 \pm 9.0$  pg/ml,  $p < 0.01$ ) tratados durante 1 semana y sacrificados un día después de la última administración de SR. Se observó un incremento significativo en las concentraciones de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c ( $72.8 \pm 25.1$  pg/ml) en comparación con ratones C57BL/6 ( $3.9 \pm 7.7$  pg / ml,  $p < 0,01$ ) tratados con SR durante 3 semanas y sacrificados 1 día después de la última administración de antígeno. Se observó un incremento en las concentraciones de citocinas Th1 y Th2 en ambas cepas expuestas a SR durante 3 semanas y sacrificados 1 día después de la última administración, las cuales regresaron a sus concentraciones basales sacrificados a los 4 días.

Los ratones BALB/c STAT6 $^{-/-}$  (deficientes de Th2) mostraron características similares a los ratones C57BL/6. Esencialmente, se observó un incremento progresivo en la extensión de daño pulmonar. De manera interesante, en ratones STAT6 $^{-/-}$  controles y experimentales se encontró un incremento en las células NK y NKT. Asimismo, se observó que los ratones STAT6 $^{-/-}$  tienen una alta expresión de IFN- $\gamma$  tanto basal como después de la estimulación con SR. Los cambios en la cuantificación relativa de IL-4 fueron indetectables en ambas cepas (silvestre y

knockout), sin embargo, la expresión de GATA-3 fue más elevada en ratones STAT6<sup>-/-</sup>.

Los resultados sugieren que las alteraciones en el balance Th1 y Th2 contribuyen al daño pulmonar asociado a NH. Adicionalmente se concluye que los ratones con una respuesta predominantemente Th2 (BALB/c) tienen una tendencia a controlar el daño pulmonar y por el contrario las cepas con un perfil Th1 (BALB/c STAT6<sup>-/-</sup> y C57BL/6) tienden a aumentar el daño y desarrollar formas más severas de la enfermedad.

## ABSTRACT

The interaction of several mechanisms of defense along the respiratory tract allows the clearance or neutralization of particles and/or microorganisms that are usually inhaled. These mechanisms include mechanical barriers, secreting antibodies as well as defense cells such as neutrophils, macrophages, mast cells, basophils, eosinophils and natural killer cells (NK). These events are important for the innate immune response and the capacity of dendritic cells and macrophages to stimulate antigen-specific T cell responses. Alveolar macrophages and lymphocytes have the capacity to produce different mediators such as cytokines and growth factors in order to induce or regulate the inflammatory process.

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is an inflammatory disease provoked by the exposure to a wide variety of organic particles and mediated by an exaggerated immune response of T-cells. It has been suggested that the disease is primarily mediated by a Th1 response. However, the role of a possible unbalance of Th1/Th2 in the pathogenesis and progression of the disease, as well as, the role of other subsets of the immune system are unclear.

In this study, we analyzed the inflammatory response and the dynamics of lung derived T cell subpopulations of 138 mice from different strains [48 C57BL/6 (Th1 response), 69 BALB/c (Th2 response) and 21 BALB/c STAT6<sup>-/-</sup>] in a HP model where mice were treated with *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) or saline during 1 and 3 weeks, and sacrificed 1 and 4 days after the last administration.



Lung isolated T cell subpopulations were analyzed by FACS and the extent of the lung damage was quantified by light microscopy. Th1 and Th2 cytokines concentrations in BAL were measured by luminex and mRNA expression of IFN- $\gamma$ , IL-4 and GATA-3 in lung tissue by RT-PCR.

C57BL/6 wt mice exhibited a significant increase in the extent of lung damage ( $29.0 \pm 7.4\%$  at 1 week versus  $44.0 \pm 5.5\%$  at 3 weeks;  $p < 0.05$ ) when sacrificed at 4 days after the last SR administration. In contrast, BALB/c wt mice, under the same treatment conditions, showed a progressive decrease in the extent of lung damage ( $36.9 \pm 11.3\%$  at 1 week *versus*  $20.0 \pm 0.0\%$  at 3 weeks;  $p < 0.05$ ).

BAL cellular analysis showed an increase in neutrophils in both C57BL/6 and BALB/c mice treated with SR, while an increase of lymphocytes was also observed in BALB/c mice under SR treatment for 3 weeks and sacrificed 4 days after last SR administration. Interestingly, an important increase of NKT CD4<sup>+</sup> was noticed in C57BL/6 mice, whereas a significant increase in NKT DN, NK and T $\gamma\delta$  subpopulations were observed in BALB/c mice under SR treatment for 3 weeks and sacrificed at 1 and 4 days after last SR administration. The analysis of cytokine concentrations in BAL showed a significant increase of IFN- $\gamma$  in C57BL/6 with HP ( $81.8 \pm 16.5$  pg/ml versus  $33.5 \pm 27.5$  pg/ml;  $p < 0.05$ ), whereas BALB/c exhibited an increase of IL-4 in ( $145.6 \pm 30.5$  pg/ml versus  $17.7 \pm 9.0$  pg/ml;  $p < 0.01$ ) treated for 1 week and sacrificed 1 day after last SR administration. A significant increase of IFN- $\gamma$  concentrations in BALB/c mice ( $72.8 \pm 25.1$  pg/ml) in comparison with C57BL/6 mice ( $3.9 \pm 7.7$  pg/ml;  $p < 0.01$ ) under SR treatment for 3 weeks and

sacrificed 1 day after last antigen administration was observed. An increase in Th1 and Th2 cytokines concentrations was observed in both strains exposed to SR for 3 weeks and sacrificed 1 day after last administration, but return to basal concentrations in mice sacrificed at 4 days.

The BALB/c STAT6<sup>-/-</sup> mice showed similar features that observed in C57BL/6 mice, that is, a progressive increase of lung damage. Interestingly, STAT6 deficient mice both controls and experimental showed an increase in NK and NKT cells. Increase of IFN- $\gamma$  expression in BAL of BALB/c treated with SR was observed whereas in Th2-deficient mice the expression remains constantly high. IL-4 expressions were undetectable in both BALB/c WT and knockout mice. However, expression of GATA-3 was higher in STAT6<sup>-/-</sup> mice.

This results demonstrate that alterations in Th1 and Th2 balance contribute to the lung damage associated to HP. Additionally, it was concluded that Th2 biased mice (BALB/c) have a tendency to control the extent of the lung damage whereas Th1 biased mice (BALB/c STAT6<sup>-/-</sup> and C57BL/6) have a trend to increase the damage and develop more severe forms of disease.

## 1. INTRODUCCION

El pulmón es un órgano involucrado directamente con el intercambio gaseoso y posee estrategias de defensa ante el posible desarrollo de infecciones y otras agresiones. Los mecanismos de defensa actúan protegiendo las vías aéreas a través del reflejo tusígeno, eliminación mucociliar y las propiedades antimicrobianas de la superficie de la mucosa.

Los avances en el estudio de los mecanismos moleculares y celulares de la respuesta inmune, han permitido entender más acerca de los procesos regulatorios y efectores de la inmunidad innata y adquirida. En este contexto, un avance importante fue la descripción de los receptores tipo Toll o TLR (del inglés *Toll like receptor*), los cuales promueven una respuesta rápida ante una gran variedad de agentes patógenos. Adicionalmente la identificación de receptores inhibitorios MHC-clase I específicos en células NK, receptores de activación y correceptores que reconocen los ligandos que se expresan en las células blanco, ha permitido conocer los mecanismos de regulación de la función de las células NK, así como su capacidad para discriminar entre células normales y aquellas potencialmente dañinas (Moretta et al., 2001). Actualmente se sabe que la inmunidad innata y adaptativa no son mecanismos independientes y que en realidad están estrechamente relacionados. En este contexto, la inmunidad innata no solamente precede a la adaptativa, sino que además de la eficacia de sus

mecanismos de respuesta, ejerce un control importante en el tipo y calidad de las respuestas que llevan a cabo los linfocitos T y B.

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) o alveolitis alérgica extrínseca es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar que resulta de una respuesta inmune exagerada provocada por la inhalación de una gran variedad de antígenos que afecta a bronquiolos, alvéolos y espacio intersticial. Los agentes causales incluyen proteínas de aves y mamíferos, hongos, bacterias y algunos compuestos químicos de bajo peso molecular. Una de las principales causas de NH en México es la exposición a proteínas de aves como palomas, pichones, pericos y canarios entre otros, que produce lo que se conoce como el pulmón de los cuidadores de aves (Selman, 2004; Laccase et al., 2003).

Existen diferentes formas clínicas de NH: aguda, subaguda y crónica, las cuales dependen entre otros factores de la intensidad de exposición al antígeno y del tipo de respuesta inmune (Selman, 2004; Laccase et al., 2003). Debido a la gran variabilidad de presentaciones y de curso clínico se han propuesto otras clasificaciones, por ejemplo, la que divide a la enfermedad en activa intermitente no progresiva, aguda intermitente progresiva y crónica tanto progresiva como no progresiva, (Selman et al., 1993). Sin embargo, la clasificación más utilizada es la de presentación aguda, subaguda y crónica.

Aunque la patogénesis de NH no se conoce con precisión, se considera que está mediada principalmente por linfocitos T y existen evidencias que indican

que diferentes subpoblaciones de estas células desempeñan un papel importante en el desarrollo y curso clínico de la enfermedad (Barrera et al., 2008; Yamasaki et al., 1999; Pardo et al., 2000; Denis 1995). Adicionalmente, datos derivados de la enfermedad humana y modelos experimentales sugieren que las citocinas tipo Th1 (del inglés, *T-helper 1*) también contribuyen a la patogénesis de NH (Schuyler et al., 1997; Gudmundsson and Hunninghake, 1997; Butler et al., 2002).

Sin embargo, el desarrollo de formas crónicas de NH y la progresión a fibrosis pulmonar parece estar asociada a una polarización tipo Th2 (del inglés, *T-helper-2*). Así por ejemplo, los linfocitos aislados LBA de pacientes con NH subaguda estimulados *in vitro* con antígeno específico producen cantidades altas de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y bajas de interleucina-4 (IL-4) en relación con los linfocitos de pacientes con NH crónica (Barrera et al., 2008). Estudios en ratones con NH inducida por la exposición a *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) han demostrado que la respuesta inflamatoria es principalmente mediada por IFN- $\gamma$  y posiblemente interleucina-12 (IL-12) (Gudmundsson and Hunninghake, 1997; Gudmundsson et al., 1998; Pan et al., 2000). En contraste, los ratones tipo Th2 muestran una respuesta inflamatoria moderada después de la exposición a SR en comparación con una respuesta más severa en cepas Th1, como la C57BL/6 (Schuyler et al., 1997; Ghadirian and Denis 1992). Es importante mencionar que la regulación de estos mecanismos inflamatorios se deben en buena medida a la sobre-expresión de IL-4 y GATA-3 [(*Trans-acting T-cell-specific transcription factor*, por sus siglas en inglés) (Matsuno et al., 2007)].

Por otro lado, estudios recientes han sugerido un efecto protector de las células NKT (*Natural Killer T*, por sus siglas en inglés), particularmente las productoras de IL-4, en el desarrollo de NH en modelos experimentales (Hwang et al., 2006). Las células NKT constituyen una población de leucocitos que poseen características de linfocitos T y células NK (*Natural Killer T*, por sus siglas en inglés; Godfrey, 2000). Estas células reconocen antígenos presentados por una molécula semejante al MHC, el CD1d (Thomas, 2003; Godfrey, 2004).

Sin embargo, en un estudio reciente de análisis de citocinas en pulmón cuantificadas a diferentes tiempos de exposición a SR no se observó una polarización clara hacia una respuesta Th1 o Th2 (Simonian et al., 2009). Adicionalmente, en los modelos animales de NH se ha planteado que los neutrófilos son una fuente importante de IFN- $\gamma$  (Nance et al., 2005) por lo que los cambios en la celularidad que infiltra el pulmón de ratones con NH puede influir de manera determinante con el desarrollo de una respuesta inflamatoria. A la fecha no se conocen con claridad los mecanismos que influyen en el mantenimiento de un adecuado balance Th1/Th2 y su impacto en la patogénesis y progresión clínica de la NH.

El objetivo de este trabajo fue analizar la dinámica de la respuesta inflamatoria y de las diversas subpoblaciones de linfocitos T en cepas de ratones con diferentes características de polarización de la respuesta Th1 [(C57BL/6, BALB/c y BALB/c STAT6<sup>-/-</sup>, (*signal transducer and activator of transcription 6 -/-*, por sus siglas en inglés)] expuestas a la inhalación de SR.

## 2. ANTECEDENTES

### Inmunología en el pulmón

El sistema inmune, tanto innato como el adquirido tiene la capacidad de distinguir lo propio y lo extraño. La capacidad para detectar de manera eficiente la presencia de patógenos es fundamental para la defensa del huésped. Una de las principales diferencias entre la respuesta innata y la adquirida radica en los mecanismos y receptores que utilizan para el reconocimiento.

Los receptores de la respuesta innata identifican estructuras moleculares llamados patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen associated molecular patterns* [PAMPs]); ejemplos: glucanos, lipopolisacárido, peptiglicano, ácido lipoteicoico, mananos, DNA bacteriano, RNA de doble cadena, entre otros. Se ha sugerido que estos mecanismos son primitivos desde el punto de vista evolutivo, que también se encuentra en plantas y animales (Hoffman et al., 1999). La inmunidad innata está directamente relacionada con la respuesta inflamatoria, la cual es mediada en primer término por macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y células cebadas.

Los receptores que actúan en los mecanismos adaptativos usualmente tienen una enorme variabilidad y que implica el re-arreglo de ciertos segmentos de genes, mecanismo que proporciona una capacidad de reconocimiento específico de antígenos. Otra característica fundamental de la respuesta adaptativa es el

desarrollo de memoria inmunológica ante un reto específico como una infección o la exposición de antígenos específicos derivados de patógenos y otras estructuras orgánicas. Finalmente es importante mencionar que las células centrales en el desarrollo de una eficiente respuesta adaptativa son los linfocitos T y B.

### Sistema inmune de la mucosa

El pulmón y el intestino son órganos que estructuralmente tienen grandes extensiones de mucosa en la cual se encuentran muchas estructuras del sistema inmune. En estos tejidos una capa de células epiteliales separa el interior del exterior del cuerpo y es aquí es donde ocurre una integración de la respuesta inmune en diferentes sitios anatómicos de la mucosa, particularmente con respecto a la respuesta por inmunoglobulina A (Brandzaeg and Pabst, 2004). Existen linfocitos locales asociados al pulmón, algunos promueven funciones altamente especializadas, mientras que otros desempeñan funciones comunes en diversos sitios de la mucosa pulmonar. En el pulmón, los ganglios linfáticos mediastinales que drenan el tracto respiratorio inferior son los principales sitios de activación de linfocitos T. También es posible desarrollar tejido linfoide de *novo* como consecuencia de una infección o inflamación. Un ejemplo de ello es el tejido bronquial pulmonar asociado a tejido linfoide inducido por una infección viral respiratoria (Drayton et al., 2002; Delventhal et al 1992). Dichas estructuras parecen ser los sitios donde se inicia o mantiene la respuesta inmune. Una vez



activados en los órganos linfoides secundarios, los linfocitos T son capaces de dejar dichos sitios inductivos y migrar a tejidos no linfoides. Esos linfocitos entran a los tejidos no linfoides durante una respuesta inmune primaria, convirtiéndose en las células efectoras de dicha respuesta.

Por otro lado, el microambiente en el que se lleva a cabo la presentación de antígenos parece ser exclusivo de cada sitio efector. En el pulmón, las células T efectoras se localizan principalmente en el parénquima pulmonar y en las vías aéreas, el cual contiene una estructura de unidades alvéolo-capilares donde se realiza el intercambio gaseoso y está constituido por una capa de células epiteliales y endoteliales, además de un intersticio compuesto por tejido conjuntivo y fibroblastos que contienen también células T, células presentadoras de antígeno y otros tipos celulares de origen hematopoyético. Las células T presentes en el parénquima o lámina propia pulmonar expresan fenotipos efectores o de memoria, similares a aquéllos descritos en el intestino. Por último, en el tracto respiratorio, los mecanismos de defensa participan a diferentes niveles e incluyen defensa mecánica y los propios de la inmunidad innata y adquirida (Masopust et al., 2004).

### Macrófagos alveolares

Los macrófagos alveolares (MA) son células especializadas que desempeñan un papel fundamental en procesos como homeostasis, respuesta a agentes externos (partículas orgánicas o inorgánicas) y a patógenos, re-

modelación tisular mediante la producción de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas que estimulan la proliferación de fibroblastos, la síntesis de moléculas de matriz extracelular, la producción de colágena y metaloproteasas de matriz y la infiltración de células inflamatorias al pulmón. Otra función importante de los MA es mantener la homeostasis del surfactante pulmonar.

Una de sus principales características funcionales de estas células es que poseen plasticidad fenotípica, la cual puede variar dependiendo de su estado de diferenciación y del microambiente pulmonar. Adicionalmente, expresan diferentes TLR para el reconocimiento de estructuras asociadas a patógenos. Los MA son células efectoras fundamentales en el control de infecciones pulmonares (Droemann et al., 2003; Muijsers et al., 2001).

### Células NK y dendríticas

La interacción de las células NK con las células dendríticas tiene un papel importante, tanto en la inmunidad innata como adaptativa en respuesta a patógenos. En procesos inflamatorios, la unión de los receptores TLR que expresan las células NK y dendríticas inducen la activación y adquisición de propiedades funcionales necesarias para controlar y, posiblemente, eliminar de manera rápida microorganismos patógenos por mecanismos efectores innatos. Este programa de maduración de células dendríticas mediado por las NK está regulado por citocinas producidas durante las etapas tempranas de la respuesta

inflamatoria (como IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4). Ambos tipos celulares continúan dichas interacciones en los órganos linfoides donde determinan en buena medida la activación de células T (Sivori et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Pisegna et al., 2004).

### Células T CD8 y T $\gamma\delta$

Otra población celular que desempeña un papel importante en la inmunidad innata son los linfocitos T  $\gamma\delta$ . El concepto que se tiene de esta subpoblación celular como "primera línea de defensa", "célula reguladora" o "puente entre la inmunidad innata y adquirida", ha dejado claro su importancia dentro de la respuesta inmune. Las células T  $\gamma\delta$  maduras se dividen en distintos subtipos funcionales, los que parecen tener múltiples actividades en la inmunidad innata. En la inmunidad pulmonar, las células T  $\gamma\delta$  intraepiteliales participan en la reparación del tejido pulmonar dañado y su capacidad como presentadoras de antígeno.

Estudios realizados en modelos murinos de infección con *Listeria monocytogenes* revelaron que las células T  $\gamma\delta$  controlan el desarrollo de la respuesta inflamatoria. En su ausencia, las lesiones al tejido persisten por un período más largo de tiempo y son más severas (Skeen et al., 2005). También se ha demostrado que los monocitos que responden al proceso inflamatorio maduran una vez que han llegado al sitio de la lesión, proceso que se ve alterado en

ausencia de las células T  $\gamma\delta$ . Se ha sugerido que estas células no sólo tienen un papel importante en el reclutamiento de monocitos, sino también en la respuesta inflamatoria que acompaña la lesión del tejido.

Adicionalmente se ha demostrado que las células T  $\gamma\delta$  intraepiteliales de piel son capaces de reconocer e inducir la proliferación de queratinocitos por medio de la secreción de un factor de crecimiento después del daño tisular, lo que favorece la re-epitelización del tejido (Jameson et al., 2005).

Un estudio reciente mostró la capacidad altamente efectiva de la subpoblación de células  $\gamma\delta V\gamma 9+V\delta 2+$  para presentar antígenos. A diferencia de las células dendríticas, las células T  $\gamma\delta$  necesitan ser activadas antes de capturar el antígeno. Las células T  $\gamma\delta$  activadas expresan de manera transitoria el receptor de quimiocinas CCR7, lo que potencialmente permite relocalizarlas en los ganglios linfáticos de modo similar a las células dendríticas. En este estado de activación la expresión de moléculas MHC de clase II y moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 o CD86, se incrementa en las células T  $\gamma\delta$ , induciendo respuestas primarias de células T CD4+  $\alpha\beta$  a antígenos que requieren o no procesamiento. Las células T  $\gamma\delta$  activadas también inducen la proliferación y diferenciación de células T CD8+  $\alpha\beta$  en células citotóxicas (Brandes et al., 2005).

## Células NKT

Las células NKT constituyen una población de leucocitos que poseen características de linfocitos T y células NK (Godfrey, 2000). Sin embargo, se han definido como: Linfocitos T semejantes a células NK (Godfrey, 2004). Estas células reconocen glucolípidos [por ejemplo: alfa-galactosilceramida, [ $\alpha$ -GalCer]] presentados por una molécula semejante al MHC, el CD1d (Thomas, 2003).

En humanos, expresan una cadena invariante del TCR que consiste en una cadena  $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$  asociada con  $V\beta 11$ . A éstas se les denomina *células  $V\alpha 24i$  NKT* (Thomas, 2003). En ratón expresan una cadena invariante del TCR que consiste en una cadena  $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$  asociada con  $V\beta 8.2$ ,  $V\beta 7$ ,  $V\beta 2$ . A éstas se les denomina *células  $V\alpha 14i$  NKT* (Thomas, 2003). Expresan marcadores de células NK: por ejemplo NK1.1 para ratón y su homólogo CD161 en humanos. También expresan receptores como: DX5, CD16, CD56, CD122, CD95L y Ly49 entre otros (Johnston, 2003).

Se le atribuyen funciones de citotoxicidad, donde la citolisis está mediada por granzimas, perforinas, granulicina y el ligando de Fas. El mecanismo de lisis por perforinas acopladas a granzimas se inicia por el reconocimiento de la célula blanco (por ejemplo, ausencia de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I), seguida de la fusión de las membranas y por último la liberación de los gránulos que polimerizan la membrana de la célula blanco para dar paso a la entrada de granzimas las cuales activan caspasas inductoras de apoptosis (Lieberman, 2003; Johnston et al., 2003; Chatenoud, 2002); y

regulación, a través de la producción de citocinas tanto Th1 como Th2 (Lieberman, 2003; Chatenoud, 2002). En este contexto, desempeñan un papel importante en el control de infecciones microbianas, tumores, inducción de tolerancia y supresión de procesos autoinmunes (Johnston, 2003). Las células NKT han sido detectadas en numerosos tejidos aunque en proporciones diferentes. En condiciones normales se han reportado 30-50% en hígado, 20-30% en médula ósea, 10-20% en timo, 3.0% en bazo, 4.0% en sangre, 0.3% en nódulos linfáticos y 7.0 % en pulmón (Godfrey, 2000). Sin embargo, al menos en relación a pulmón, existen resultados contradictorios que muestran proporciones del 0.5-0.7% (Kawakami et al., 2001).

Diversos grupos han reportado una gran heterogeneidad de las células NKT  $V\alpha 24i$  en cuanto a su expresión de CD4/CD8 y en su capacidad para la producción de citocinas. En general las células NKT se caracterizan por su rápida y alta producción de IFN- $\gamma$  e IL-4. Las células CD4<sup>+</sup>  $V\alpha 24i$  son productoras eficientes de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*, por sus siglas en inglés), perfil Th-0; mientras que las células CD4<sup>-</sup>  $V\alpha 24i$ , así como las DN son productoras de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y las CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , perfil Th1. En contraste, ambas subpoblaciones (CD4<sup>+</sup> /CD4<sup>-</sup>) producen altas concentraciones de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Estos datos sugieren que las células CD4<sup>+</sup>  $V\alpha 24i$  pueden dirigir respuestas tanto Th1 como Th2, mientras que las CD4<sup>-</sup>  $V\alpha 24i$  NKT inducen preferentemente una respuesta tipo Th1. Esto sugiere un posible mecanismo para separar

respuestas inmunorregulatorias inducidas por las células V $\alpha$ 24i NKT mediante el reclutamiento diferencial de las CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup> V $\alpha$ 24i, lo cual puede afectar la dirección de la respuesta inmune. Sin embargo, aún no se conocen las razones por las cuales estas subpoblaciones pueden producir uno u otro patrón de citocinas (Thomas, 2003; Akbari, 2003; Nakamura, 2003; Godfrey, 2004).

Como se mencionó anteriormente la NH está mediada por una respuesta inmune de tipo Th1. Se ha descrito que las células NKT regulan la respuesta inmunitaria modulando el balance Th1/Th2. Por lo tanto, se ha sugerido que las células NKT desempeñan un papel crítico en el desarrollo de la NH. En un estudio reciente se analizó la distribución de subpoblaciones de células NKT en pacientes con sarcoidosis y en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y se observó un incremento significativo en la frecuencia de células NKT en lavados bronquioalveolares de pacientes con NH. Estudios en ratones deficientes de células NKT con NH se ha observado que la transferencia pasiva de células NKT productoras de IL-4 promueve una disminución significativa del daño pulmonar. Esto sugiere que las células NKT podrían estar involucradas en la patogénesis de la enfermedad por la modulación del balance Th1/Th2 (Hwang et al., 2006; Korosec et al., 2007).

## **Neumonitis por hipersensibilidad**

La neumonitis por hipersensibilidad, también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por la inhalación a una gran variedad de antígenos y que afecta a bronquiolos, alvéolos y espacio intersticial. La respuesta inflamatoria está mediada principalmente por una reacción inmune exagerada que parece ocurrir en un huésped susceptible. Aunque los mecanismos de susceptibilidad no se conocen con precisión (Selman, 2004; 1998; 1997), se ha demostrado en población mexicana que parte de la predisposición genética para desarrollar esta enfermedad se encuentra relacionada con el complejo principal de histocompatibilidad (CPH), polimorfismos del TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor-alpha*, por sus siglas en inglés) y polimorfismos en el proteosoma (PSMB8 KQ), molécula encargada del procesamiento de antígenos (Selman et al., 1987, Camarena et al., 2001; 2010).

### Agentes causales

Los agentes etiológicos se pueden clasificar en tres categorías: microorganismos (bacterias, hongos y amebas), proteínas animales y compuestos químicos de bajo peso molecular (ej. isocianatos y anhídridos ácidos). Entre los microorganismos, las bacterias termofílicas desempeñan un papel importante en el desarrollo del pulmón del granjero y la bagazosis entre otras NH.



Se ha descrito una gran variedad de partículas menores a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro lo que les permite alcanzar los espacios alveolares e inducir NH; entre ellas se encuentran esporas de hongos como *Aspergillus fumigatus*, bacterias termofílicas como *Thermoactinomyces faeni* y proteínas de origen animal como las proteínas de aves. Dentro de las propiedades que pueden influir en la patogenicidad de estas partículas se encuentra la dificultad para ser digeridas por los macrófagos alveolares, su capacidad para activar la vía alterna del complemento, su acción como adyuvante y su actividad enzimática (Selman, 1998; 1997; Hasleton et al., 1996; Girard et al., 2010). Otra fuente importante son algunos compuestos químicos de bajo peso molecular como los di-isocianatos de difenilmetano y di-isocianatos de tolueno, estos tienen la capacidad de unirse a proteínas humanas, tal como albúmina, los cuales actúan como haptenos (Selman, 2004; Hara et al., 2009).

En México, la causa más frecuente de NH se relaciona con la exposición a antígenos aviarios, en especial provenientes de palomas, pichones, canarios y pericos australianos. Se ha sugerido que las inmunoglobulinas aviarias, en especial IgA, así como la mucina intestinal podrían ser las principales proteínas sensibilizadoras (Selman, 1998; 1997; Pérez et al., 1993; 1996).

## Formas clínicas

Se han descrito diversas formas clínicas de NH, siendo la clasificación más aceptada en: aguda, subaguda y crónica. 1) La forma aguda se produce generalmente después de la exposición a grandes cantidades del antígeno en un corto período de tiempo. Los síntomas y signos clínicos aparecen al cabo de 4 a 8 horas de la inhalación y se caracterizan por disnea intensa, fiebre, y tos que desaparecen en pocos días si no hay nuevo contacto. Esta forma clínica puede ser difícil de identificar ya que los síntomas pueden confundirse con una infección aguda bacteriana o viral. 2) La forma subaguda generalmente ocurre después de exposiciones continuas a pequeñas cantidades del agente causal. Los síntomas aparecen de forma insidiosa durante unas semanas y consisten en malestar general, astenia, pérdida de peso, tos seca, pero a veces también productiva, y disnea que puede llegar a ser severa con cianosis e incluso requerir hospitalización. Es importante destacar que la forma subaguda puede evolucionar a la forma crónica si el paciente sigue teniendo contacto con el antígeno. 3) La forma crónica se caracteriza por disnea de esfuerzo progresiva, tos, fatiga y pérdida de peso, con ausencia de episodios agudos. En general ocurre en individuos que se encuentran expuestos de manera crónica a la inhalación de pequeñas cantidades de antígenos, como por ejemplo, aquellos que tienen en sus hogares aves de ornato. En esta fase, la enfermedad es clínicamente indistinguible de la de una fibrosis pulmonar de cualquier otra etiología. En este estadio la eliminación de la exposición al agente causal puede producir la

estabilización o una discreta mejoría sintomática, pero la mayoría progresa y fallece de la enfermedad en un promedio de 5 a 10 años después del diagnóstico (Pérez-Padilla et al., 1993; Ohtani et al., 2003; Vourlekis et al., 2004).

La NH provocada por exposición a proteínas de aves que se observa en México se caracteriza por formas clínicas subagudas o crónicas y afecta predominantemente a mujeres entre la segunda y sexta década de vida (Pérez et al., 1993; Ramírez et al., 1998).

### Características histopatológicas

El patrón patológico característico de la NH es la presencia de inflamación intersticial compuesta fundamentalmente de linfocitos, células plasmáticas, monocitos y macrófagos, así como células gigantes multinucleadas y granulomas pobremente formados. En el intersticio, las células que predominan son los linfocitos, mientras que en los espacios alveolares se observan muchos macrófagos espumosos. La presencia de granulomas pequeños, poco compactos y pobremente diferenciados se considera un rasgo característico de la NH (**Figura 1**; Selman, 2004; 1997; Pérez-Padilla, 1993).

Se han descrito varias alteraciones bronquiolares que incluyen bronquiolitis obliterante proliferativa en el caso de la enfermedad del granjero (Reyes et al., 1982), inflamación peribronquiolar/fibrosis con hipertrofia de músculo liso y estrechamiento extrínseco de las vías aéreas menores en la enfermedad de los

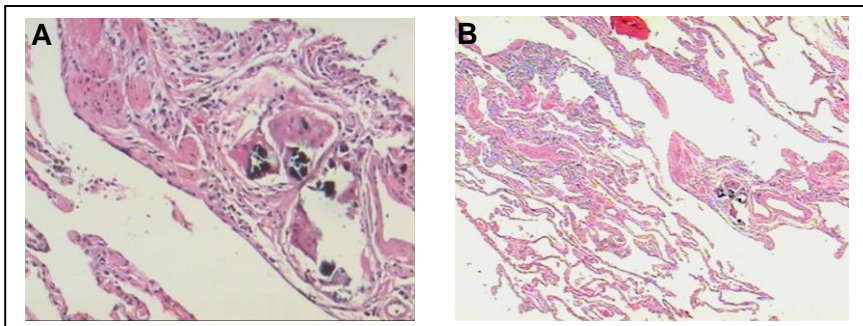
cuidadores de paloma (Pérez-Padilla et al., 1996) y menos frecuente, lesiones tipo bronquiolitis obliterante con neumonía organizada (BOOP; Ohtani et al., 2005).

Alrededor del 20 al 30% de los pacientes con NH subaguda o crónica, muestran un patrón histológico diferente, incluyendo neumonitis intersticial no específica (NSIP, por sus siglas en inglés; Vourlekis et al., 2002), o neumonía organizada criptogénica. En el caso de la forma histológica tipo NSIP muestran lesiones inflamatorias o fibróticas temporal y geográficamente uniformes sin la característica bronquiocéntrica de la NH típica. En pacientes con otros patrones histológicos (por ejemplo NSIP, BOOP, etc.), es extremadamente importante corroborar la causa etiológica y hacer un diagnóstico específico.

La etapa crónica se caracteriza por grados variables de fibrosis intersticial; sobrepuesta a cambios subagudos como infiltración intersticial de linfocitos y ocasionalmente granulomas pobremente formados (Ohtani et al., 2005; Pérez-Padilla et al., 1993; Hayakawa et al., 2002).

Recientemente, se han descrito tres patrones de fibrosis en la NH crónica: 1) fibrosis periférica con un patrón de parches con distorsión de la arquitectura pulmonar y focos de fibroblastos parecidos microscópicamente a la neumonía intersticial usual; 2) fibrosis intersticial homogénea parecida a la NSIP; y 3) fibrosis peribronquiolar. En estos casos, la presencia de células gigantes, los granulomas pobremente formados, los cuerpos de Schaumann o las características inflamatorias de la NH subaguda son esenciales en el diagnóstico de la NH.

En otro estudio con pacientes con la enfermedad crónica de los cuidadores de paloma, se encontró que la mitad de ellos tenían cambios morfológicos compatibles con NSIP celular o fibrótica mientras que otros mostraban un patrón de lesiones parecido a la neumonía intersticial usual caracterizado por cambios fibróticos heterogéneos y temporales aparentes (Ohtani et al., 2005).



**Figura 1. Micrografía de pulmón de un paciente con neumonitis por hipersensibilidad.** Se observa una lesión granulomatosa (panel A, 40X) e inflamación intersticial mononuclear difusa (panel B, 10X).

## La conexión con la fibrosis

Es bien conocido que alrededor del 30-40% de los pacientes con episodios subagudos repetidos o NH crónica evolucionan hacia una fibrosis intersticial difusa con destrucción del parénquima pulmonar (Selman et al., 2003). Sin embargo, la secuencia de los mecanismos moleculares implicados en la resolución de la alveolitis y la regeneración tisular o bien la remodelación extracelular anormal y el progreso hacia la fibrosis, no ha sido elucidada.

El infiltrado de células mononucleares de una inflamación no resuelta puede activar a los fibroblastos a proliferar y secretar componentes de la matriz extracelular. Se ha observado que el incremento de linfocitos T CD4+ puede estar relacionado con el desarrollo de fibrosis (Reyes et al., 1982). De manera interesante, los ratones a los que se les reconstituyeron las células T CD4+ muestran una marcada disminución de la fibrosis subepitelial en las vías aéreas (Foster et al., 2002). Del mismo modo, la sobre regulación de la endotelina-1 en el pulmón resulta en el progreso de la fibrosis pulmonar y el reclutamiento de células inflamatorias predominantemente CD4+ (Hoche et al., 2000). Sin embargo, debido a la heterogeneidad de células T y de sus múltiples funciones reguladoras durante la estimulación antigénica, aún permanecen muchas interrogantes respecto a su posible conexión con la respuesta fibrótica. En este contexto, una mejor comprensión de los mecanismos que dirigen la respuesta de las células T en la fibrosis puede sin duda resultar importante para la identificación de blancos moleculares potencialmente terapéuticos.

## Características del lavado bronquioalveolar en la NH

El perfil celular del LBA para los pacientes con NH se caracteriza por un aumento en el número absoluto y porcentual de los linfocitos T, con un predominio de la subpoblación CD8+ en los casos agudos y de CD4+ en los casos subagudos y crónicos, con un desequilibrio en la relación CD4/CD8. El aumento en la subpoblación de linfocitos T CD4 se ha asociado a la progresión de la NH hacia fibrosis. También se ha descrito un aumento significativo en el porcentaje de células cebadas, así como la presencia de células NK. En números absolutos, los macrófagos alveolares por lo general se encuentran en concentraciones normales o ligeramente elevadas, aunque su porcentaje en relación a las otras células inflamatorias disminuye dado el enorme incremento en el número de linfocitos T. En pacientes con NH aguda y en etapas tempranas de la enfermedad se observa un incremento de neutrófilos y un aumento modesto de células plasmáticas y mastocitos (Selman, 2004; Hasleton, 1996).

## Epidemiología

Aunque no existen datos precisos acerca de la prevalencia de la NH se le considera una de las causas más frecuentes de enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID). En un estudio se encontró que alrededor del 30% de 661 enfermos con EPID tenían NH y la mayoría de ellos era por exposición a aves (Lacasse et al., 2003). Las dos formas más frecuentes de NH son el pulmón del granjero y el

de los cuidadores de aves. El pulmón del granjero afecta al 0.4-7% de todos los granjeros (Salvaggio, 1995). Por otro lado, algunos estudios antiguos señalan que la prevalencia de NH en individuos que inhalan proteínas aviarias oscila entre 20 a 40 por 100,000 sujetos en riesgo (Christensen et al., 1975; Hendrick et al., 1978). Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad en personas expuestas a aves en casa, forma muy común de exposición en México, se desconoce.

Es importante destacar, que alrededor del 40-50% de los pacientes con enfermedad crónica desarrollan fibrosis pulmonar con una mortalidad estimada del 30% a los 5 años y una supervivencia media de 10-12 años (Pérez-Padilla et al., 1993; Simonian et al., 2009). En México, la NH afecta predominantemente a mujeres con una proporción de 9:1 con respecto al sexo masculino (Pérez et al., 1993; Hill et al., 2004). En los últimos 20 años más del 90% de los casos de NH atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) han sido mujeres.

El padecimiento parece ser frecuente y aunque la magnitud del problema en el país no se conoce con precisión, en el INER se atienden en promedio 70 a 80 casos nuevos por año, y se reciben solicitudes de interconsulta adicional de un número similar de pacientes. De manera relevante, los pacientes con NH aguda o subaguda generalmente responden al manejo terapéutico mientras que los pacientes con NH en su forma crónica, evolucionan frecuentemente con una destrucción irreversible del pulmón por fibrosis.



## Patogénesis

El origen de la neumonitis por hipersensibilidad (NH) está asociado a una amplia variedad de antígenos relacionados con el estilo de vida y características ocupacionales, sin embargo únicamente un pequeño porcentaje de las personas expuestas desarrollan la enfermedad. Esta observación sugiere que para que se facilite el desarrollo de NH deben ocurrir dos eventos de manera sincronizada: la inhalación del factor inductor, esto es el antígeno causal y la presencia de uno o más factores promotores, estos están relacionados con la susceptibilidad genética y factores ambientales.

Los posibles genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad han sido muy poco explorados, y se han enfocado fundamentalmente al complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y a algunas citocinas. En este contexto, diversos alelos y haplotipos del CPH clase II se han relacionado con la susceptibilidad hacia la NH (HLA-DRB1\*1305/HLA-DQB1\*0501) o bien con la resistencia de la misma (HLA-DRB1\*0802) en pacientes mexicanos con neumonitis inducida por antígeno aviario (Camarena et al., 2001).

Se han estudiado también los polimorfismos del promotor del TNF- $\alpha$  así como en el intron 1 del gen del TNF- $\beta$  en pacientes con NH (Christensen et al., 1975). El alelo TNF- $\alpha$  2, que es un genotipo asociado con el incremento de la expresión del TNF- $\alpha$ , se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes con la enfermedad del granjero comparado con sujetos control o pacientes con la

enfermedad de los cuidadores de paloma. Sin embargo, un estudio más reciente no confirma esta asociación, así como tampoco alguna otra con genes de citocinas incluyendo a la interleucina-10 [(IL-10), (-592C/A, -819C/T, -1082G/A)], el factor de crecimiento transformante beta 1 [(TGF- $\beta$ 1; *Transforming Growth Factor beta*, por sus siglas en inglés; (-509C/T, +869T/C)] e interleucina-6 [(IL-6) (-634C/G)] en pacientes con la enfermedad de los cuidadores de paloma (Schaaf et al., 2001; Kondoh et al., 2006).

Al menos dos factores de tipo ambiental pueden contribuir al desarrollo de la NH como factores promotores: las infecciones virales, y la exposición a otro agente agresor. Modelos experimentales de NH en animales que han sido retados con el virus sincicial respiratorio o con el virus de Sendai presentan una respuesta inflamatoria más severa secundaria a la exposición a *Saccharopolyspora rectivirgula*, la cual puede persistir tiempo después de que la infección viral ha cedido (Cormier et al. 1996; Gudmundsson et al., 1999). Estudios en humanos han revelado que los virus respiratorios comunes, principalmente el virus de la influenza tipo A, se encuentra frecuentemente en las vías respiratorias bajas en pacientes con NH (Dakhama et al., 1999).

Las razones por las cuales las infecciones virales pueden potenciar el desarrollo de la NH se desconocen, sin embargo pueden estar relacionadas con la disfunción mucociliar inducida por el virus, con un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras por macrófagos alveolares y en la secreción de

quimiocinas que a su vez aumentan el reclutamiento de linfocitos en el pulmón (Israël-Assayag et al., 1999; Allen et al., 1975).

La exposición a un segundo agente patógeno puede también tener un papel importante como un factor promotor. En un estudio antiguo que abarcó a dos familias con varios miembros afectados por la enfermedad, se observó que ambas familias utilizaban un isómero gamma de hexaclorobenceno para erradicar plagas de ácaros en aves infestadas antes de desarrollar la enfermedad (Allen et al., 1975). Recientemente, se ha sugerido que la exposición a pesticidas principalmente órganocloruros y carbamatos, pueden ser un factor potencial para la enfermedad del granjero (Hoppin et al., 2007).

Algunos procesos propios del hospedero pueden también contribuir como un factor de riesgo a desarrollar NH. El reconocimiento de células fetales en tejidos y en la sangre materna (microquimerismo fetal), después del embarazo ha abierto un nuevo campo de investigación. A pesar de que las implicaciones del microquimerismo en patología humana son controvertidas, se ha sugerido que algunas enfermedades autoinmunes que ocurren comúnmente en mujeres en etapa reproductiva o posterior a ella, pueden ser en realidad enfermedades autoinmunes (Lapaire et al., 2007; Bustos et al., 2007). Un estudio reciente realizado en nuestro Instituto proporcionó evidencia del incremento en la frecuencia de células microquiméricas en pacientes con NH y su presencia en pulmones (Bustos et al., 2007). Las células microquiméricas eran principalmente macrófagos y linfocitos CD4+ (linfocitos T cooperadores) y CD8+ (linfocitos T citotóxicos), lo que

corroboró que éstas pertenecen a diversos linajes celulares relacionados con la respuesta inmune, lo que sugiere que pueden participar en la reacción exagerada que caracteriza a esta enfermedad. Sin embargo, el papel específico de estas células fetales microquiméricas en NH se desconoce, a pesar de que parece incrementar la severidad de la enfermedad.

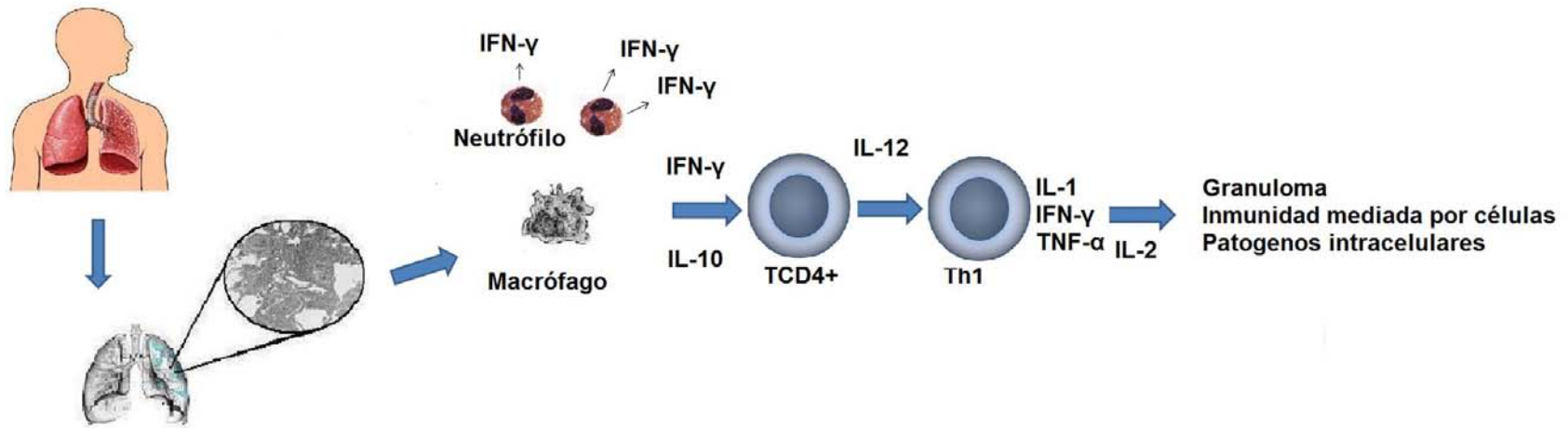
### Inmunopatogénesis

Evidencias experimentales, apoyan la noción de que la forma aguda de NH es provocada por una reacción de hipersensibilidad de tipo III caracterizada por la formación de complejos antígeno-anticuerpo, mientras que las formas subagudas y crónicas son mediadas por una hipersensibilidad de tipo IV mediada por linfocitos T (Selman, 1998; Selman et al., 1993; Hasleton, 1996). Como se mencionó, la NH subaguda o crónica puede progresar provocando una respuesta fibrosante progresiva que destruye el parénquima pulmonar y en este contexto, aproximadamente el 40-50% de los pacientes con la enfermedad crónica desarrollan una enfermedad incapacitante e irreversible, lo cual provoca la muerte de la mayoría de los casos en un lapso cercano a 5 años (Pérez et al., 1993; Selman et al., 2003; Feng, 2009).

La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por la formación de inmunocomplejos antígeno-IgG que activan la cascada del complemento, liberando C5 que a su vez induce la activación de macrófagos. Una vez activados,

los macrófagos secretan una variedad de citocinas y quimiocinas que atraen al área de la lesión neutrófilos y posteriormente linfocitos y monocitos. En las formas subagudas y crónicas se ha observado que algunas de estas quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ ; *Macrophage Inflammatory Proteins*, por sus siglas en inglés, IL-12) promueven la diferenciación de linfocitos CD4+ Th0 a Th1, los cuales liberan IFN- $\gamma$ , considerado esencial en la formación de granulomas por parte de macrófagos. Por otro lado, la IL-6 promueve la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas y la maduración de las células CD8+ a citotóxicas (Patel et al., 2001).

Estudios previos han sugerido que el tabaquismo confiere protección a desarrollar NH, lo que parece estar relacionado con un efecto inmunosupresor del humo del cigarrillo (Furuiye, 2007). En macrófagos alveolares de pacientes fumadores se ha observado una disminución de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 comparados con pacientes con NH activa. Algunos componentes como la nicotina inhiben la expresión y liberación de citocinas como TNF- $\alpha$ , MIP1- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  y de óxido nítrico. Por otra parte, aunque la enfermedad es significativamente menos frecuente en sujetos fumadores, cuando éstos la desarrollan es habitualmente crónica y progresiva (Selman, 2004; Furuiye, 2007). Como se mencionó anteriormente, en las formas subagudas y crónicas la respuesta mediada por linfocitos T desempeña un papel crucial en el desarrollo de NH, principalmente por su capacidad de producir citocinas tipo Th1 (**Figura 2**).



**Figura 2. Modelo del desarrollo de Th1 en pulmón.** Las células T CD4 vírgenes son activadas por células presentadoras de antígeno (CPA) y el microambiente de citocinas determina el tipo de respuesta inmune.

## Estudios en modelos experimentales

En modelos de ratones C57BL/6 (respuesta de predominio Th1) expuestos a *S. rectivigula* se ha observado la presencia de infiltrados mononucleares (constituidos principalmente por células T, B y macrófagos) y depósito de colágena en pulmón, semejante a lo que se observa en humanos. Los ratones atímicos desarrollan una NH menos severa, pero la transferencia de células T CD4+ de memoria desencadena un proceso inflamatorio (Butler et al., 2002; Simonian et al., 2009). No obstante de que citocinas de tipo Th1 y Th2 están implicadas en la inflamación pulmonar desarrollada en ratones expuestos a SR, se han detectado bajas cantidades de IFN- $\gamma$  (Th1) e interleucina-5 (IL-5; Th2) y altas concentraciones de interleucina-17A (IL-17A) e interleucina-22 (IL-22; Th17), expresadas por células T CD4+.

Ratones expuestos a SR deficientes de IL-17 o su receptor muestran una disminución de la inflamación pulmonar, lo cual indica que las citocinas Th17 son críticas en el desarrollo de infiltrados mononucleares (Cua et al., 2003). Así mismo, los ratones C57BL/6 con NH por *B. subtilis* desarrollan infiltrados mononucleares compuestos por células T CD4+, T CD8+, células B, macrófagos y neutrófilos. En este modelo de NH se ha observado un aumento en la población de células T  $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 6/V $\delta$ 1) y en su ausencia, los ratones presentan mayor inflamación y desarrollan fibrosis pulmonar. Esto sugiere que las células T  $\gamma\delta$  pueden tener un efecto protector (Simonian et al., 2006). En este trabajo se

expusieron ratones transgénicos  $V\gamma 6/V\delta 1$  a *B. subtilis* y se encontró en pulmón una disminución del contenido de colágena comparado con el ratón C57BL/6 silvestre. Adicionalmente, en ratones silvestres expuestos a *B. subtilis* se observó incremento en la concentración de IL-17A la que estuvo expresada principalmente en células T  $V\gamma 6/V\delta 1$ , lo cual sugiere un papel importante de las células T  $\gamma\delta$  que expresan IL-17A en la eliminación de la bacteria, en la prevención de la inflamación excesiva y en el desarrollo de fibrosis pulmonar. Por el contrario, en modelos de ratones expuestos a *C. neoformans*, o *P. carinii* o *B. Pertussis* se observa un incremento de células T  $\gamma\delta$  y en ausencia de ellas el patógeno es eliminado rápidamente del pulmón. Por lo tanto el papel de las citocinas asociadas con una respuesta Th17 y las células T  $\gamma\delta$  en la patogénesis de las enfermedades pulmonares es aún contradictorio (Roark et al., 2009).

Por otro lado, se ha descrito recientemente que el TLR6 desempeña un papel fundamental en el desarrollo y la gravedad de NH a través de la inducción en la producción de IL-17. En ratones TLR6<sup>-/-</sup> expuestos a SR muestran una disminución en la inflamación pulmonar y una disminución de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, IL-17A, interleucina-21 (IL-21) e interleucina-23 (IL-23) comparado con el ratón silvestre (Fong et al., 2010).

En ratones deficientes de células T regulatorias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) tratados con SR se ha observado una NH más severa con elevadas cantidades de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ . Por otro lado, los ratones silvestres muestran una reducción en la



producción de IFN- $\gamma$  debida a la producción de IL-10 por las células T regulatorias (Park et al., 2009).

Durante la NH en ratones CD1d<sup>-/-</sup> se ha detectado una alta producción de IFN- $\gamma$  en el pulmón, producido principalmente por neutrófilos. La transferencia adoptiva de células NKT a ratones IL-4<sup>-/-</sup> no atenúan la gravedad de las lesiones pulmonares en NH, mientras que en ratones silvestres y en ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> las células NKT suprimen la progresión de NH (Hwang et al., 2006).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad relativamente frecuente cuyos mecanismos patogénicos no se conocen con precisión. Las células T desempeñan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, pero se ignoran los mecanismos regulatorios, la dinámica de la respuesta inflamatoria y la relevancia del balance Th1/Th2 en la patogénesis y la progresión del daño pulmonar. Un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que participan en el desarrollo de esta enfermedad permitirá en el futuro mejores aproximaciones terapéuticas.

### **4. HIPÓTESIS**

Existen diferencias en la dinámica de la respuesta inflamatoria (celular y en la producción de mediadores inflamatorios) entre las cepas de ratones, C57BL/6 (Th1) y BALB/c (Th2), que determinan el desarrollo y progresión del daño pulmonar en NH.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la dinámica de la respuesta inflamatoria (extensión del daño pulmonar, cinética de las subpoblaciones de células T y la producción de mediadores inflamatorios) en un modelo experimental de NH inducida por SR en dos cepas de ratón que difieren en la respuesta Th (C57BL/6 y BALB/c).

### Objetivos específicos

- a) Desarrollar un modelo experimental de NH inducida por SR en cepas de ratones con diferentes perfiles inflamatorios (C57BL/6 y BALB/c).
- b) Caracterizar secuencialmente la dinámica del daño pulmonar y la respuesta inflamatoria.
- c) Caracterizar y cuantificar los cambios en las subpoblaciones de células T (T  $\gamma\delta$ , TCD4, TCD8, NKT) y NK y correlacionarlos con el daño pulmonar.
- d) Cuantificar el patrón de expresión y secreción de citocinas Th1/Th2.
- e) Mediante el uso de ratones BALB/c deficientes de STAT6, evaluar el efecto de la deficiencia de la respuesta Th2 en el desarrollo de la NH.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### Población de estudio

Se estudiaron ratones de 6 a 8 semanas de edad hembras BALB/c, C57BL/6 (Harlan Sprague Dawley, México) y ratones deficientes de STAT6 (Stat6<sup>tm1Gru/Stat6<sup>tm1Gru</sup></sup> homocigoto) con fondo BALB/c; esta mutación provoca un defecto en la generación de células Th2 (Bar Harbor, Maine). Los ratones fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos, en condiciones normales de alimento y agua en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER, México). Los ratones fueron tratados de acuerdo a los lineamientos del Comité Institucional Científico y de Bioética para el cuidado y manejo de animales de laboratorio y en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### Inducción de neumonitis por hipersensibilidad

La NH fue inducida con *Saccharopolyspora rectivirgula* (gentilmente donada por el Dr. Yvon Cormier; Laval University, Quebec City, Canada). Se utilizaron ratones silvestres C57BL/6 (n = 48), BALB/c (n = 69) y el knockout (KO) STAT6<sup>-/-</sup> (n = 21) los cuales recibieron, previa anestesia con éter dietílico, 100 µg de SR en 50 µl de solución salina (0.9%) por instilación intranasal. Esta dosis se repitió por tres días consecutivos, durante una y tres semanas. Los ratones se sacrificaron uno o cuatro días después de la última administración de SR. Los animales control

recibieron 50  $\mu$ l de solución salina (0.9%) bajo las mismas condiciones de tratamiento y sacrificio que las de los ratones experimentales tratados con SR. Los ratones KO STAT6<sup>-/-</sup> se expusieron a SR por tres semanas y se sacrificaron a uno y cuatro días después de la última administración (**Figura 3**).

#### Lavado bronquioalveolar (LBA)

Se introdujo una cánula en la tráquea de los ratones y los pulmones fueron lavados con 0.5 ml de solución salina (0.9%) por triplicado. El LBA se centrifugó a 1500 rpm por 10 min a 4 °C; se recuperó un volumen promedio de sobrenadante de 800  $\mu$ l tanto en los ratones que recibieron SR como de los controles tratados con solución salina el cual se congeló a -80 °C. Las células totales de LBA se contaron en una cámara de Neubauer con azul de tripano (cuenta viable) y posteriormente se tiñeron con azul de toluidina para la cuenta diferencial usando un estándar morfológico para neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos.

#### Cuantificación de citocinas Th1/Th2 en LBA

Las concentraciones de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , IL-12), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) y GM-CSF se determinaron en los sobrenadantes de LBA por un inmunoensayo múltiple con el equipo Bioplex-Luminex 200 (Bio-Rad. Laboratories, Inc., CA). En una placa comercial de 96 pozos previamente húmeda se agregaron perlas recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para las diferentes citocinas.

Posteriormente, se añadieron los estándares y 50 µl de cada muestra. Después de 30 min de incubación se agregó el anticuerpo de detección y posteriormente estreptavidina-ficoeritrina. Finalmente, se realizó la lectura de la placa con la medición de la intensidad media de fluorescencia. Se elaboraron curvas estándar para cada una de las citocinas con un intervalo de sensibilidad de 5 pg/ml a 20,000 pg/ml. Los resultados fueron analizados en un equipo Bioplex 200, Logistic 5PL versión 4.1 (BioRad).

#### Análisis histológico

El pulmón derecho se perfundió y fijó con formaldehído al 10% amortiguado con fosfato de sodio monobásico y dibásico a pH 7.0. El pulmón fue embebido en parafina, cortado en secciones de 5 µm y teñido con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómica de Masson. Las secciones fueron evaluadas por microscopía de luz y se determinó la extensión y severidad de la inflamación y la formación de granulomas (Pardo, et al., 2003).

#### Aislamiento de células de pulmón y citometría de flujo

El pulmón izquierdo se sometió a una digestión enzimática con colagenasa (*Clostridium histolyticum*, tipo VIII; Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 20 min y posteriormente se disgregó el tejido y se hizo pasar por un colador celular (40 µm; BD Falcon). Finalmente, se separaron las células mononucleares por un gradiente de densidad con Percoll TM (1.130 g/ml; GE Healthcare) al 75 y 40%, se contaron

células viables con azul de tripano y se dividieron en tubos, cada uno de ellos con 250,000 células. Las células fueron teñidas con anticuerpos monoclonales conjugados: anti-CD3-APC, anti-CD4-APC-Cy7, anti-CD8-PE-Cy5, anti-NK/NKT-PE, anti-TCR $\beta$ -PE-Cy5, y anti-T $\gamma\delta$ -PE. Para evitar la unión inespecífica por regiones Fc se agregó un anticuerpo monoclonal purificado: anti-CD16/CD32 2.4G2 (BD PharMingen, San Diego, CA). Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 300  $\mu$ l de paraformaldehído 0.5%, se adquirieron 50 000 eventos y se analizaron en un citómetro de flujo FACSAria, mediante el programa FACSDiva versión 6.1 (BD Biosciences, San Jose, CA).

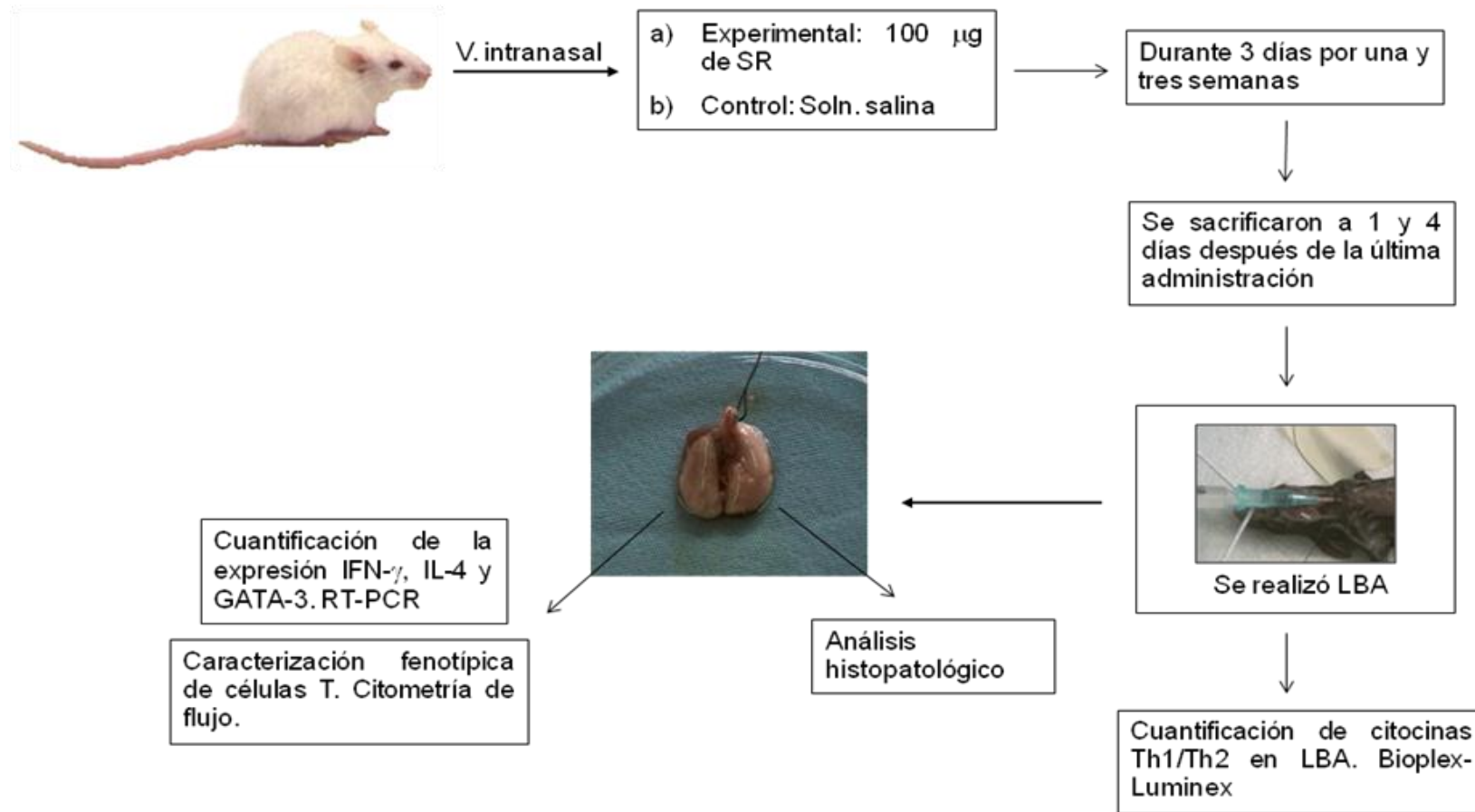
#### Expresión de RNA mensajero de citocinas en tejido pulmonar

Se midieron las expresiones de RNA mensajero (RNAm) de IFN- $\gamma$ , IL-4 y GATA-3 por RT-PCR en tiempo real de un solo paso, empleando sondas TaqMan, a partir de 200 ng de RNA total, obtenido de tejido pulmonar y siguiendo las indicaciones del equipo comercial *RNAeasy Kit*, recomendado por el fabricante (Qiagen).

La reacción de RT-PCR se realizó en un termociclador para PCR en tiempo real modelo 7500 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: transcripción reversa a 48°C por 30 minutos, activación para la AmpliTaq a 95°C por 10 min, desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento y extensión a 60°C por 1 minuto, durante 40 ciclos. Los valores umbrales  $C_T$  fueron analizados por el método comparativo  $\Delta\Delta C_T$ . Los datos fueron analizados con el programa

SDS (Applied Biosystems). Para el análisis estadístico los valores se normalizaron utilizando como referencia los valores de expresión del gen endógeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Applied Biosystems) y presentados como el cambio relativo en comparación con la muestra no tratada (calibrador) en la cuantificación relativa (unidades RQ).





**Figura 3. Modelo experimental de inducción de neumonitis por hipersensibilidad.** Caracterización histopatológica y funcional de la respuesta inmune en ratones tratados con SR. Como se describe en material y métodos.

### Análisis estadístico

Los valores se expresan en dispersiones y medias  $\pm$  desviaciones estándar. Para la comparación entre cada grupo experimental los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos aplicando la prueba de U de Mann-Whitney, programa SPSS versión 15 y GraphPad Prism versión 5.

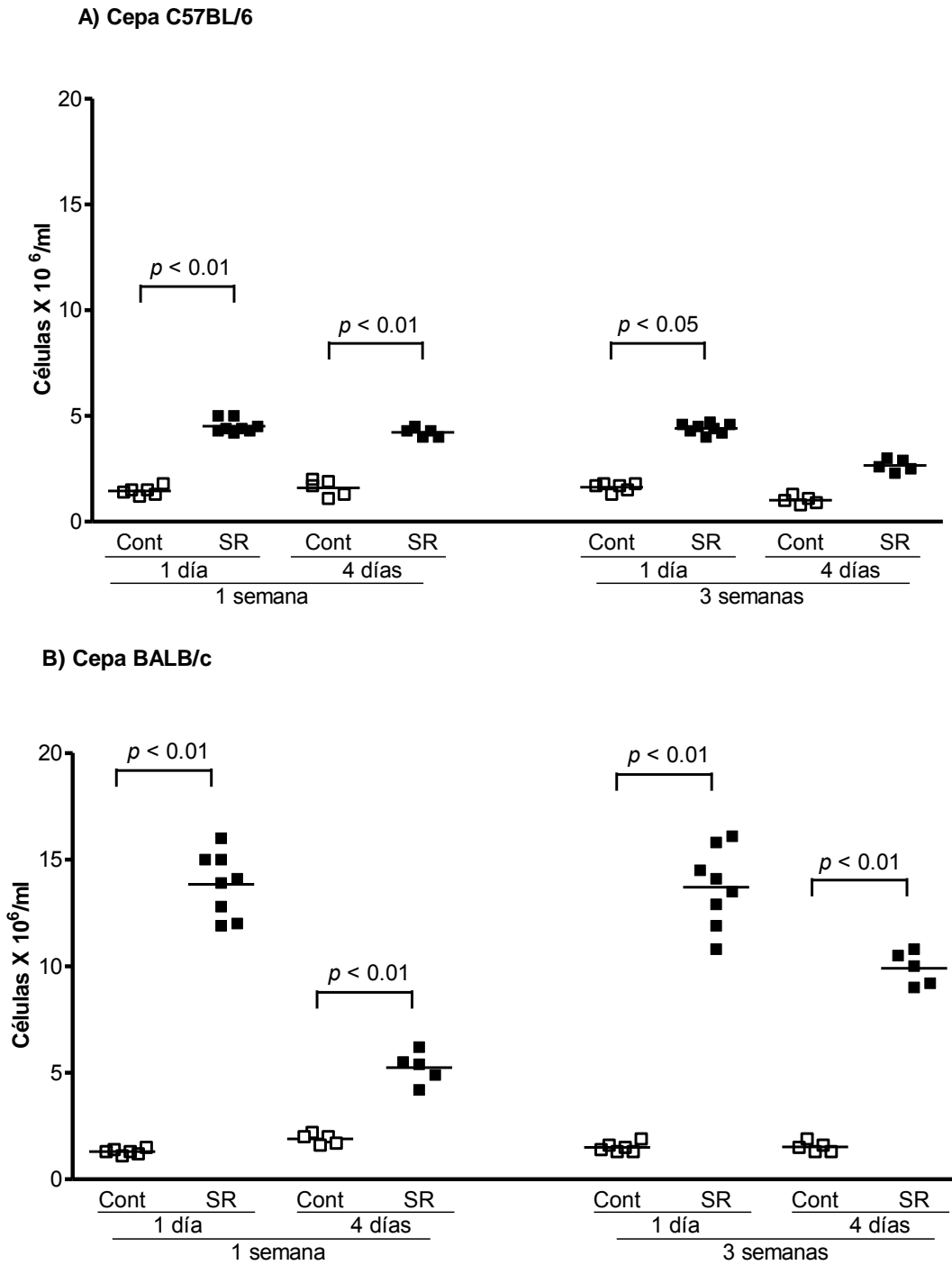
## 7. RESULTADOS

### Cuenta total y viabilidad de las células obtenidas en los LBA

La exposición a los antígenos de SR indujo un incremento en el número total de células inflamatorias en los LBA obtenidos de los ratones silvestres C57BL/6 y BALB/c. En general el incremento fue más marcado en la cepa BALB/c que en la C57BL/6.

Después de una semana de tratamiento con SR, y sacrificio un día después de la última instilación, los ratones BALB/c tuvieron un promedio de células recuperadas de  $13.8 \pm 1.5 \times 10^6$  células/ml en relación con  $4.5 \pm 0.4 \times 10^6$  células/ml obtenidos en los ratones C57BL/6 ( $p < 0.01$ ). A las 3 semanas de tratamiento y sacrificio 1 día después de la última administración los resultados fueron muy similares BALB/c  $13.7 \pm 1.8 \times 10^6$  células/ml; C57BL/6:  $4.4 \pm 0.2 \times 10^6$  células/ml. Como puede observarse en la **Figura 4**, no se detectó un incremento en el número de células en los ratones control tratados con solución salina.

En términos generales, los ratones sacrificados 4 días después de la última instilación presentaron una disminución del número de células inflamatorias en comparación con los resultados obtenidos cuando se sacrificaron 1 día después (**figura 4**).



**Figura 4. Número de células inflamatorias obtenidas en los LBA. A) C57BL/6; B) BALB/c.** La exposición a SR en ambas cepas induce un incremento significativo en el número total de células inflamatorias en los LBA. Cada símbolo representa un animal y los datos son expresados en medias y dispersiones. Cont = control y SR = *Saccharopolyspora rectivirgula*.

## Cuenta diferencial de las células inflamatorias obtenidas en los LBA

La cuenta celular diferencial de LBA reveló un incremento en el número de neutrófilos en ratones C57BL/6 ( $56.9 \pm 24.3\%$  vs  $2.5 \pm 3.4\%$ ;  $p < 0.05$ ) y BALB/c ( $30.3 \pm 25.3\%$  vs  $2.8 \pm 1.1\%$ ;  $p < 0.05$ ) tratados con SR durante una semana y sacrificados un día después de la última administración (**Tabla 1**). Esta respuesta neutrofílica desapareció en los ratones de ambas cepas cuando se sacrificaron 4 días después de la última instilación.

Un resultado similar (respuesta neutrofílica) se apreció en los ratones expuestos a SR por 3 semanas, a lo que se agregó un aumento significativo de linfocitos en los ratones BALB/c cuando se sacrificaron 4 días después de la última instilación ( $31.6 \pm 5.9\%$  ratones tratados vs  $10.7 \pm 1.8\%$  en ratones control;  $p < 0.01$ ) y en los C57BL/6 cuando se sacrificaron 1 día después (**Tabla 2**). El aumento en el porcentaje de los neutrófilos y linfocitos en ambas cepas de ratones fue principalmente a expensas del decremento del porcentaje de macrófagos.

**Tabla 1.** Perfil celular diferencial en LBA de ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 1 semana con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

	Cepa C57BL/6				Cepa BALB/c			
	1 dd		4 dd		1 dd		4 dd	
	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5
Macrófagos (%)	92.0±5.3	31.4±22.0*	94.4±4.7	91.8±6.9	85.8±9.1	59.3±22.6**	96.2±3.7	89.0±8.0
Neutrófilos (%)	2.5±3.4	56.9±24.3*	1.4±1.7	2.2±2.2	2.8±1.1	30.3±25.3*	1.0±0.8	2.0±1.4
Eosinófilos (%)	0.0±0.0	0.1±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.5	0.1±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0
Linfocitos (%)	5.5±5.9	11.6±8.9	4.2±4.3	6.0±4.9	10.8±7.3	10.3±8.4	2.7±3.0	9.0±7.3

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

**Tabla 2.** Perfil celular diferencial en LBA de ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 3 semanas con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

	Cepa C57BL/6				Cepa BALB/c			
	1 dd		4 dd		1 dd		4 dd	
	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5
Macrófagos (%)	96.3±2.7	75.0±10.7*	97.0±2.7	86.0±10.7	90.8±9.1	30.2±18.6*	88.2±1.8	66.8±6.1*
Neutrófilos (%)	1.0±2.0	12.6±10.1*	0.8±0.4	1.6±1.5	0.5±0.8	60.4±24.4*	0.2±0.4	1.6±1.1
Eosinófilos (%)	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Linfocitos (%)	2.3±0.5	12.4±4.2**	2.2±2.6	12.4±10.0	8.3±8.2	9.4±7.0	10.7±1.8	31.6±5.9*

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$

## Cuantificación de citocinas Th1/Th2 en LBA

En los ratones C57BL/6 tratados durante 1 semana, se observó un incremento significativo en el concentraciones de IFN- $\gamma$   $81.8 \pm 16.5$  pg/ml mientras que en los ratones BALB/c fueron significativamente menores  $33.5 \pm 27.5$  pg/ml;  $p < 0.05$ . Como se esperaba se detectaron concentraciones importantes de IL-4 en los ratones de las cepa BALB/c expuestos a SR  $145.6 \pm 30.5$  pg/ml en relación con los ratones de la cepa C57BL/6  $17.7 \pm 9.0$  pg/ml;  $p < 0.01$ .

En ratones C57BL/6 expuestos a SR durante 3 semanas y sacrificados a 1 día se observó un aumento significativo de IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-10, así como una disminución de IFN- $\gamma$ ; mientras que en los ratones BALB/c se apreció un aumento significativo de IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10, y en los animales sacrificados 4 días después de la última instilación con el antígeno, todas las citocinas regresaron a sus concentraciones basales (**Tabla 3**).



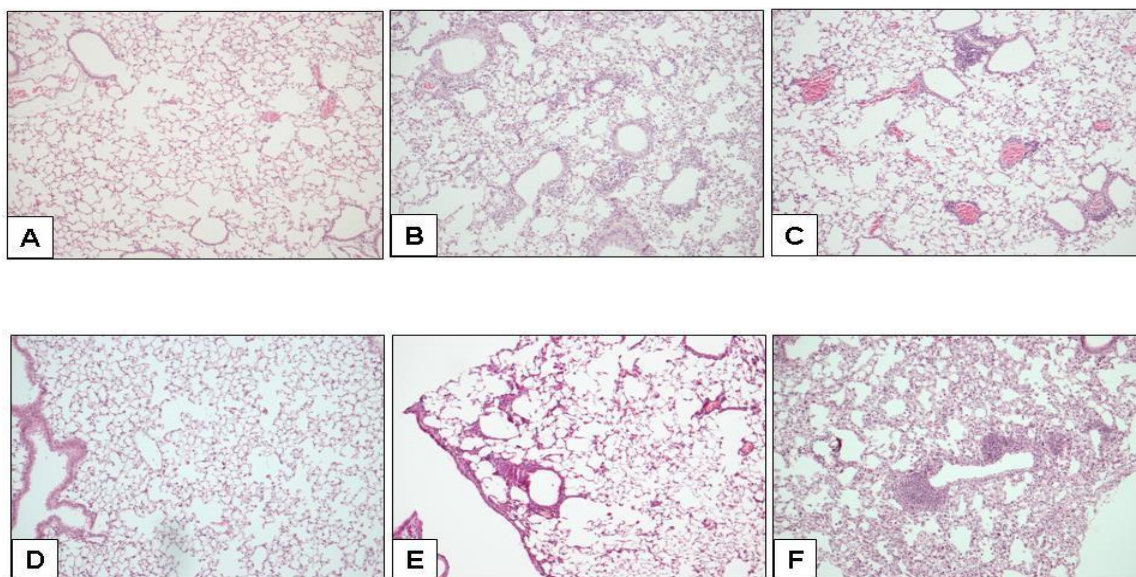
**Tabla 3.** Concentraciones de citocinas Th1/Th2 en LBA de ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 3 semanas con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

Citocina pg/ml	Cepa C57BL/6			Cepa BALB/c		
	Control n = 6	SR 1 día n = 8	SR 4 días n = 5	Control n = 6	SR 1 día n = 8	SR 4 días n = 5
IL-12	6.8±3.7	23.8±8.9*	5.9±4.2	4.8±3.8	30.1±12.5*	3.7±2.8
GM-CSF	12.0±3.3	22.2±11.5*	1.0±0.0	1.0±0.0	40.5±14.3*	1.0±0.0
IFN- $\gamma$	33.3±29.9	3.9±7.7*	9.9±15.4*	7.6±11.4	72.8±25.1*	1.0±0.0
TNF- $\alpha$	87.5±12.8	476.1±552.8*	56.9±33.4	207.8±138.9	667.4±621.5*	56.9±40.7
IL-2	1.8±2.4	21.4±20.2*	0.1±0.0	0.3±0.3	17.0±11.6*	0.5±0.4
IL-4	9.9±8.9	21.9±12.6*	1.2±0.3	1.0±0.0	21.9±10.1*	4.0±0.9
IL-5	51.4±39.8	64.7±23.0	7.1±3.6*	10.8±1.8	85.4±53.2*	12.2±4.9
IL-10	26.2±0.7	91.6±45.4*	23.9±6.9	50.5±31.4	108.9±37.6*	18.7±25.1

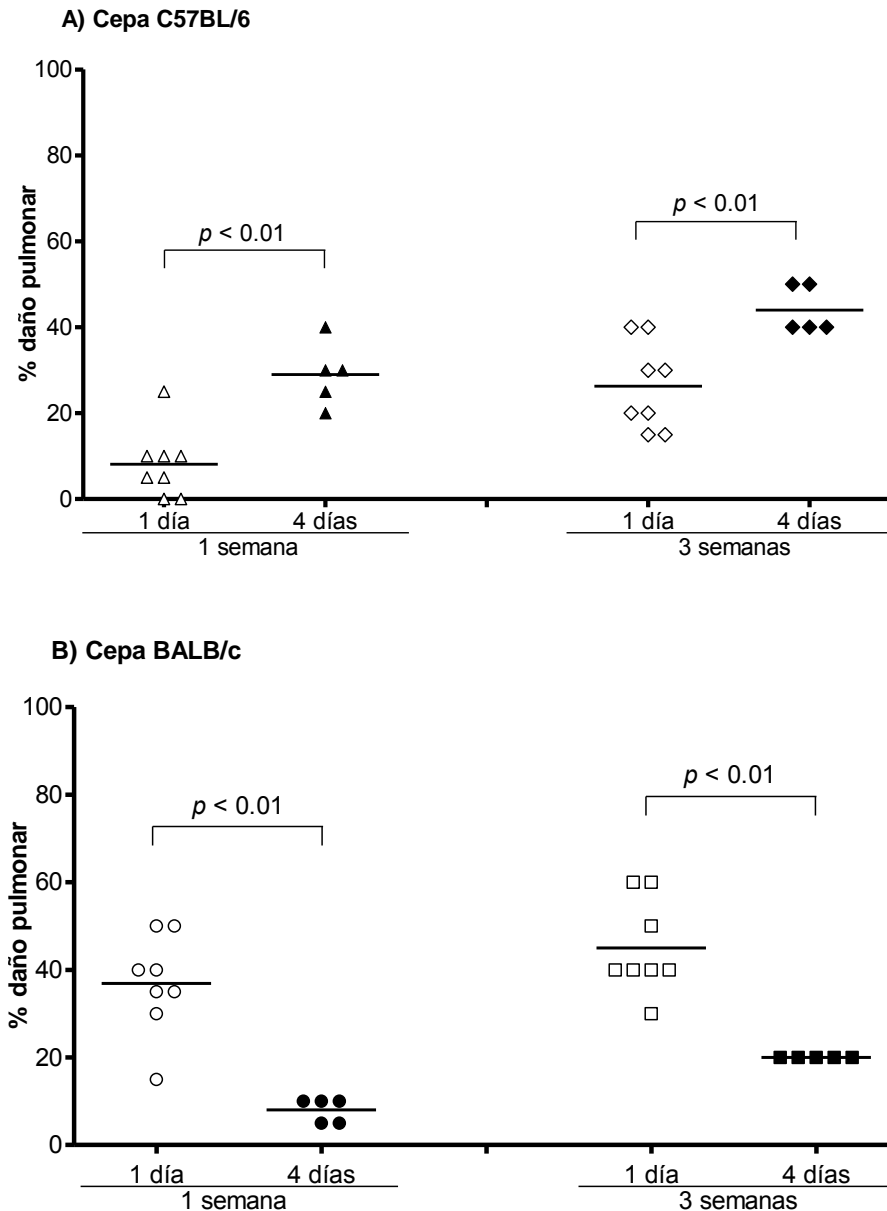
\* $p < 0.05$

## Inflamación pulmonar inducida por SR

En ambas cepas se observó infiltrado inflamatorio en el parénquima pulmonar con la formación de lesiones granulomatosas después de la instilación de SR. En general, la inflamación se caracterizó por la presencia de un infiltrado celular predominantemente polimorfonuclear en ratones sacrificados a 1 día y una mezcla de células polimorfonucleares y mononucleares (principalmente linfocitos) en ratones sacrificados 4 días después de la última instilación (**Figura 5**). Sin embargo, el análisis semi-cuantitativo de las lesiones histológicas reveló diferencias importantes en la extensión de daño pulmonar en las cepas de ratones C57BL/6 y BALB/c (**Figura 6**). Los ratones C57BL/6 mostraron un incremento en la extensión de las lesiones cuando fueron sacrificados 4 días después de la última instilación comparado con los animales sacrificados 1 día después. Así, en los ratones instilados 1 semana la extensión de las lesiones se incrementó de  $8.1 \pm 8.0\%$  a  $29.0 \pm 7.4\%$  ( $p < 0.01$ ) y en los tratados 3 semanas, de  $26.3 \pm 10.3\%$  a  $44.0 \pm 5.5\%$  ( $p < 0.01$ ). En contraste, los ratones BALB/c mostraron una marcada disminución en la extensión de daño pulmonar cuando los animales fueron sacrificados 4 días después, tanto a 1 semana ( $36.9 \pm 11.3\%$  vs  $8.0 \pm 2.7\%$ ;  $p < 0.01$ ) como a 3 semanas ( $45.0 \pm 10.7\%$  vs  $20.0 \pm 0.0\%$ ,  $p < 0.01$ ). Estos resultados indican que los ratones de la cepa BALB/c (Th2) tienden a resolver el daño pulmonar inducido por el antígeno SR mientras que los ratones C57BL/6 muestran una progresión de la lesión pulmonar (**Figura 6**).



**Figura 5. Alteraciones morfológicas pulmonares en ratones sometidos a la inhalación de *S. rectivirgula*.** **A)** Ratón BALB/c tratado con solución salina; **B)** Ratón BALB/c tratado con *S. rectivirgula* durante 3 semanas y sacrificado 1 día después de la última administración del antígeno; **C)** Ratón BALB/c tratado con *S. rectivirgula* durante 3 semanas y sacrificados 4 días después de la última exposición; **D)** Ratón C57BL/6 tratado con solución salina; **E)** Ratón C57BL/6 tratado con *S. rectivirgula* durante 3 semanas y sacrificado 1 día después de la última administración del antígeno; **F)** Ratón C57BL/6 tratado con *S. rectivirgula* durante 3 semanas y sacrificado 4 días después de la última exposición. Secciones histológicas representativas teñidas con hematoxilina-eosina, 10X.



**Figura 6. Evaluación semicuantitativa de la extensión del daño pulmonar inducido por la exposición a SR. A) C57BL/6; B) BALB/c.** Los ratones fueron tratados con *S. reactiva* o solución salina durante 1 y 3 semanas, y sacrificados a 1 y 4 días después de la última exposición al antígeno. No se observaron lesiones en ratones tratados con solución salina (datos no representados en los gráficos). Se observa un incremento en el porcentaje de daño pulmonar en ratones C57BL/6 sacrificados a los 4 días, mientras que los ratones BALB/c muestran una disminución. Cada símbolo representa un animal y los datos son expresados en medias y dispersiones.

## Caracterización fenotípica de subpoblaciones celulares aisladas de pulmón

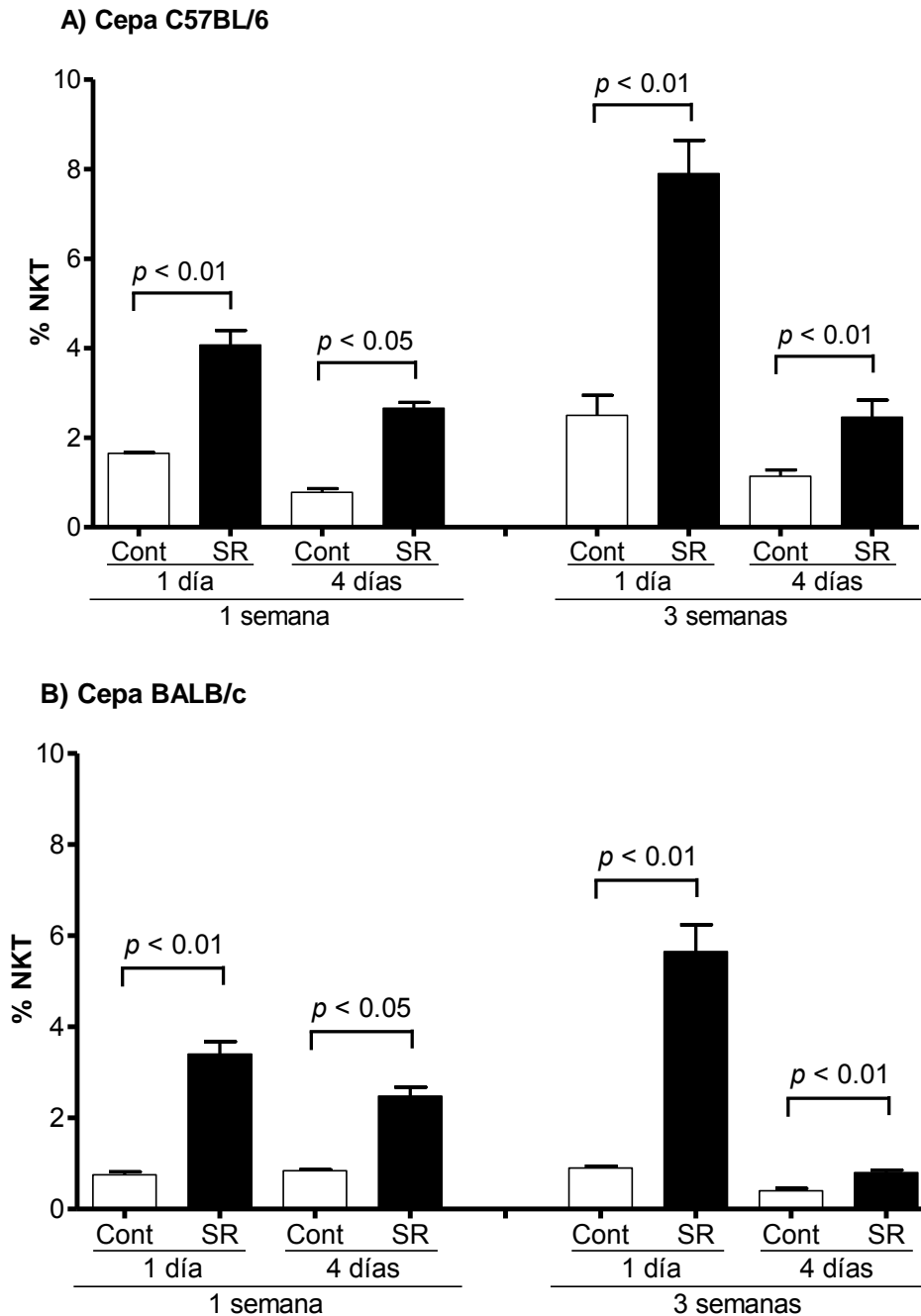
Las células pulmonares totales de ratones C57BL/6 y BALB/c tratados con SR y con solución salina (controles) fueron aisladas por digestión enzimática con colagenasa y se caracterizaron usando diferentes anticuerpos monoclonales, CD3, CD4, CD8, TCR  $\alpha\beta$ , TCR  $\gamma\delta$ , NK/NKT para su análisis por citometría de flujo. En los ratones control, la relación CD4/CD8 fue siempre mayor en la cepa BALB/c comparada con la C57BL/6. No se observaron cambios en la relación CD4/CD8 en ninguna de las dos cepas tratados 1 semana y sacrificados a 1 y 4 días después de la última administración de SR. En contraste, en los ratones expuestos a SR por 3 semanas y sacrificados 1 día después de la última administración, se encontró un incremento significativo en la relación CD4/CD8 en ambas cepas C57BL/6 = 5.6 y BALB/c = 11.3 (**Tablas 4 y 5**). La relación continuó significativamente incrementada en los ratones C57BL/6 sacrificados 4 días después.

Los porcentajes de células NKT pulmonares se muestran en la **Figura 7** y en las **Tablas 4 y 5**. Se observó un incremento significativo de las células NKT tanto en los ratones C57BL/6 como en los BALB/c tratados por 1 semana y sacrificados 1 y 4 días después de la última exposición al antígeno, aunque con una tendencia a la disminución a los 4 días. El mismo comportamiento se observó en los animales tratados durante 3 semanas, aunque en este caso, los porcentajes de células NKT en los ratones BALB/c tendieron a normalizarse (**Figura 7**). Sin embargo, se apreciaron algunas diferencias en la distribución de las subpoblaciones de células NKT (**Tabla 4**). Los ratones C57BL/6 tratados por 1 semana y sacrificados a 1 día, mostraron un incremento de células NKT DN comparado con ratones control ( $26.2 \pm 1.5\%$  vs  $47.7 \pm 2.7\%$ ;  $p < 0.01$ ). Lo mismo se observó en los ratones de la cepa BALB/c ( $9.0 \pm 1.3\%$  vs  $35.5 \pm 4.0\%$ ;  $p < 0.01$ ). En ambas cepas se conservó esta diferencia cuando los animales fueron sacrificados a los 4 días post-instilación de SR. En cambio, a las 3 semanas y 1 día los ratones C57BL/6 mostraron un incremento de células NKT CD4+ en relación con ratones control ( $54.9 \pm 7.0\%$  vs  $83.6 \pm 6.9\%$ ;  $p < 0.01$ ), lo mismo se observó a los 4 días ( $59.8 \pm 4.6\%$  vs  $75.5 \pm 7.8\%$ ;  $p < 0.01$ ). Por otro lado, la subpoblación de células NKT CD8+ disminuyó en los ratones C57BL/6 y BALB/c tratados durante 3 semanas y sacrificados 1 día en relación con controles como se observa en la **Tabla 5**.

En relación a las células NK, en ambas cepas se observó un incremento de esta subpoblación cuando recibieron SR por una semana y fueron sacrificados ya

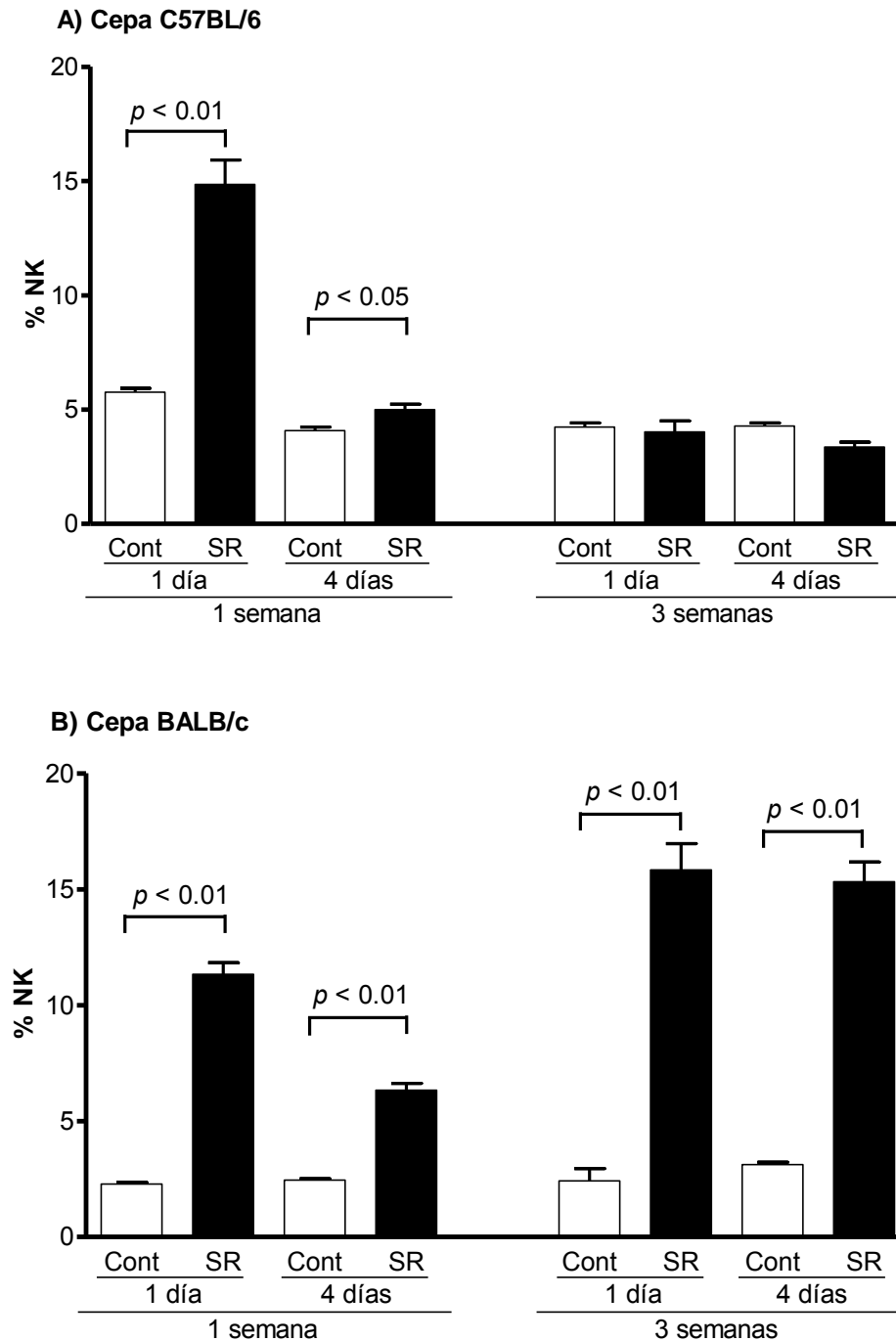
sea a 1 ó 4 días post-instilación (**Figura 8 y Tabla 4**). Los ratones C57BL/6 que recibieron 3 semanas el antígeno, no mostraron ninguna diferencia en el porcentaje de células NK en comparación con sus respectivos controles. Por el contrario, los ratones BALB/c tratados por 3 semanas y sacrificados 1 día ( $2.3 \pm 0.2\%$  vs  $15.8 \pm 2.6\%$ ;  $p < 0.01$ ) o 4 días ( $3.1 \pm 0.1\%$  vs  $15.1 \pm 0.6\%$ ;  $p < 0.01$ ) después de la última administración del antígeno conservaron el aumento de las células NK observado en la semana 1 (**Figura 9**).

Finalmente, se observó un incremento significativo de los linfocitos  $T\gamma\delta$  en ambas cepas de ratón cuando fueron tratadas con SR. La distribución de las células  $T\gamma\delta$  en las dos cepas de ratón C57BL/6 y BALB/c se muestran en las **Figura 9**.

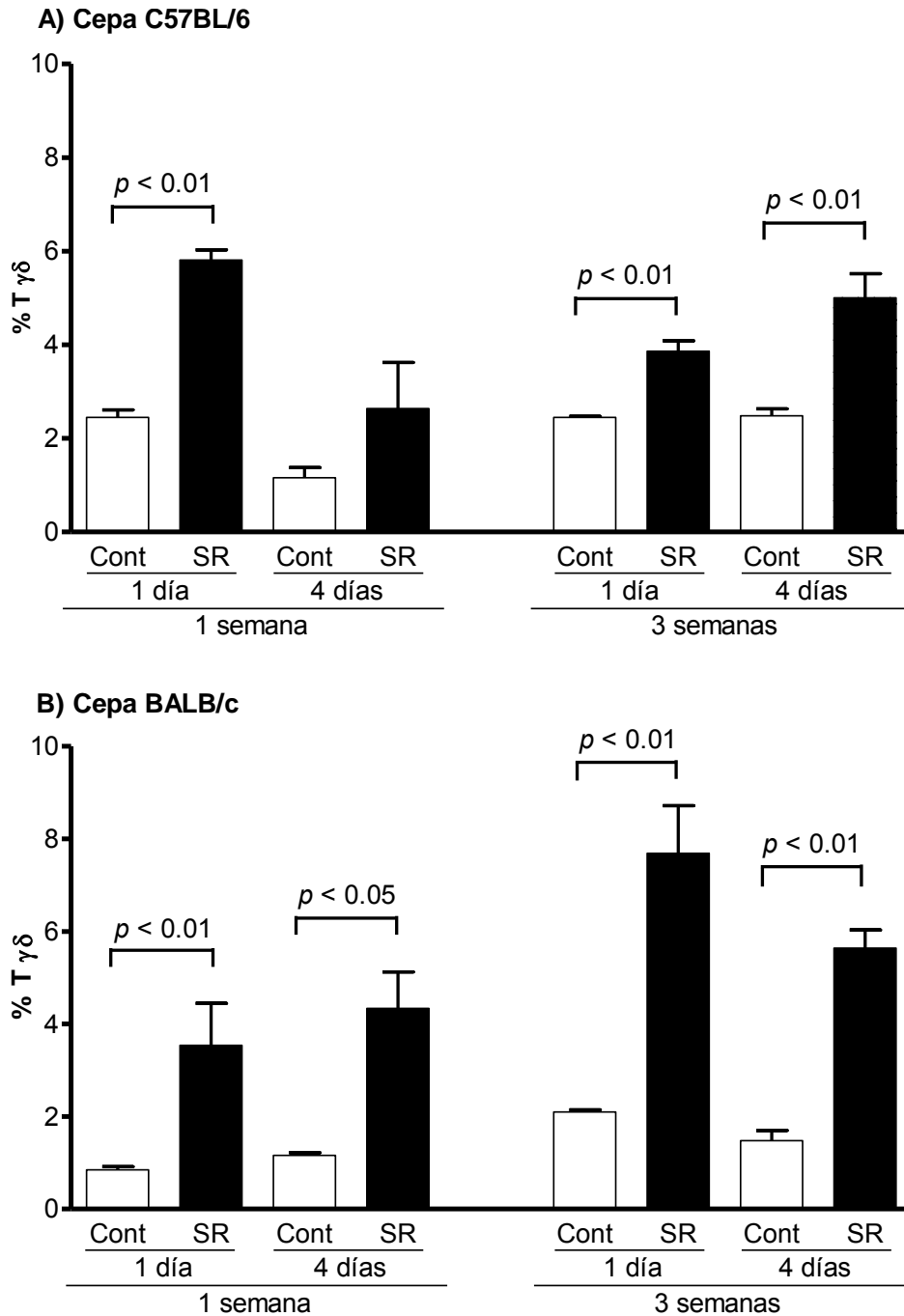


**Figura 7. Porcentaje de células NKT obtenidas de tejido pulmonar. A)** C57BL/6; **B)** BALB/c. Los ratones fueron expuestos a solución salina y *S. reactivigula* durante 1 y 3 semanas y sacrificados a 1 y 4 días después de la última exposición al antígeno. Las células totales fueron aisladas del pulmón izquierdo por digestión enzimática, teñidas y analizadas por citometría de flujo. Los datos son expresados en medias y desviaciones estándar.





**Figura 8. Porcentaje de células NK obtenidas de tejido pulmonar. A) C57BL/6; B) BALB/c.** Los ratones fueron expuestos a solución salina y *S. rectivirgula* durante 1 y 3 semanas y sacrificados a 1 y 4 días después de la última exposición al antígeno. Las células totales fueron aisladas del pulmón izquierdo por digestión enzimática, teñidas y analizadas por citometría de flujo. Los datos son expresados en medias y desviaciones estándar.



**Figura 9. Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  obtenidas de tejido pulmonar. A)** C57BL/6; **B)** BALB/c. Los ratones fueron expuestos a solución salina y S. rectivirgula durante 1 y 3 semanas y sacrificados a 1 y 4 días después de la última exposición al antígeno. Las células totales fueron aisladas del pulmón izquierdo por digestión enzimática, teñidas y analizadas por citometría de flujo. Los datos son expresados en medias y desviaciones estándar.

**Tabla 4.** Relación CD4/CD8 y subpoblaciones de células NK y NKT en ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 1 semana con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

Subpoblación celular	Cepa C57BL/6				Cepa BALB/c			
	1 día		4 días		1 día		4 días	
	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5
CD4/CD8	1.9	1.1	2.1	2.1	3.8	3.3	3.0	3.0
NK (%)	5.8±0.3	14.9±2.9*	4.1±0.3	5.0±0.5*	2.3±0.2	11.3±1.4*	2.5±0.2	6.3±0.8*
NKT (%)	1.7±0.1	4.1±0.9*	0.8±0.2	2.7±0.3*	0.8±0.2	3.4±0.8*	0.8±0.1	2.5±0.4*
NKT CD4+ (%)	39.6±1.6	21.1±3.6	56.6±6.9	57.2±4.4	69.9±0.5	49.5± 5.2*	69.1±4.5	39.4±7.2*
NKT CD8+ (%)	34.2±1.5	31.2±3.1	11.0±5.5	16.4±3.2	21.1±0.9	15.0±4.6*	22.2±4.1	16.3±3.9*
NKT DN (%)	26.2±1.5	47.7±2.7*	6.9±1.3	18.0±3.0*	9.0±1.3	35.5±4.0*	8.5±1.1	18.7±3.2*

\* $p < 0.01$

**Tabla 5.** Relación CD4/CD8 y subpoblaciones de células NK y NKT en ratones C57BL/6 y BALB/c, estimulados durante 3 semanas con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

Subpoblación celular	Cepa C57BL/6				Cepa BALB/c			
	1 día		4 días		1 día		4 días	
	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5	Control n = 6	SR n = 8	Control n = 5	SR n = 5
CD4/CD8	1.8	5.6*	1.8	3.7**	3.6	11.3*	2.9	3.4
NK (%)	4.2±0.6	4.0±1.8	4.3±0.2	3.4±0.7	2.3±0.2	15.8±2.6*	3.1±0.1	15.1±0.6*
NKT (%)	2.5±1.1	7.9±2.1*	1.1±0.3	2.5±0.9**	0.9±0.1	5.8±1.7*	0.4±0.1	0.8±0.1**
NKT CD4+ (%)	54.9±7.0	83.6±6.9*	59.8±4.6	75.5±7.8*	60.8±6.0	64.3±4.7	20.0±1.1	34.3±2.9
NKT CD8+ (%)	31.7±5.8	4.5±5.9*	17.2±8.0	8.5±5.0	20.4±4.9	5.2±3.7*	47.7±2.8	36.7±9.5
NKT DN (%)	13.4±4.7	11.9±4.9	21.6±5.4	9.0±3.4*	18.8±3.9	30.5±2.7*	32.2±2.5	30.0±9.0

\* $p < 0.01$ , \*\* $p = 0.05$

## Desarrollo del modelo experimental en ratones BALB/c y BALB/c STAT6 -/-

Estos experimentos se realizaron con 3 semanas de exposición a *S. rectivirgula* y los animales fueron sacrificados 1 y 4 días después de la última exposición al antígeno.

### Cuenta celular total y diferencial de LBA

Los ratones BALB/c STAT6 -/- mostraron un menor número de células inflamatorias en los LBA en comparación con los BALB/c silvestres tanto después de recibir solución salina como el antígeno SR. La exposición al antígeno produjo en ambos un aumento significativo en el número de estas células (**Tabla 6**). Adicionalmente, Los ratones BALB/c STAT6 -/- sacrificados a 1 día mostraron un incremento moderado de neutrófilos ( $1.0 \pm 1.2\%$  vs  $9.5 \pm 5.7\%$ ,  $p < 0.01$ ) comparado con el aumento altamente significativo que mostró la cepa silvestre ( $2.0 \pm 1.5\%$  vs  $55.0 \pm 11.9\%$ ,  $p < 0.01$ ). Asimismo, la cepa silvestre mostró un incremento en el porcentaje de linfocitos cuando se sacrificaron a los 4 días ( $10.2 \pm 5.0\%$  vs  $42.5 \pm 3.6\%$ ,  $p = 0.05$ ; **Tabla 6**), mientras que el ratón KO no mostró diferencias ( $1.7 \pm 2.1\%$  vs  $4.2 \pm 4.1\%$ ,  $p = n. s.$ ).

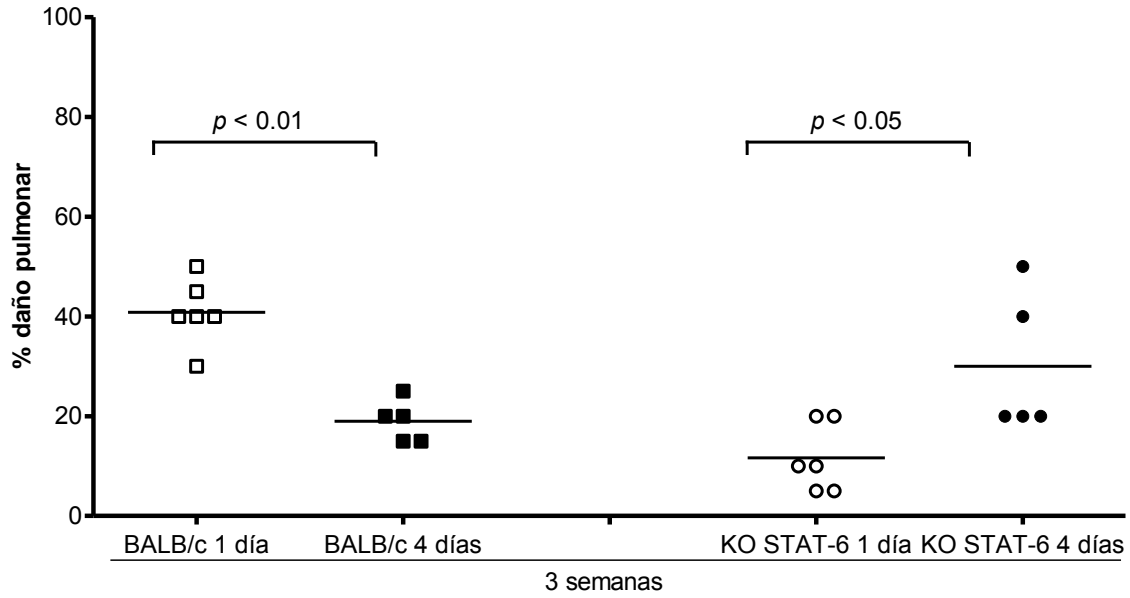
**Tabla 6.** Perfil celular diferencial en LBA de ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6<sup>-/-</sup>, estimulados durante 3 semanas con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

	Cepa BALB/c Silvestre				Cepa BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup>			
	1 día		4 días		1 día		4 días	
	Control n = 5	SR n = 6	Control n = 5	SR n = 5	Control n = 5	SR n = 6	Control n = 5	SR n = 5
Cuenta celular total (1x10 <sup>6</sup> células/ml)	1.3±0.1	13.0±0.1*	1.9±0.5	5.2±1.1*	0.7±0.0	5.2±0.8*	0.6±0.1	3.1±0.1*
Macrófagos (%)	85.0±4.9	35.0±13.3*	89.5±5.4	56.7±3.1**	97.0±3.0	82.0±2.9	97.3±2.1	87.8±4.1
Neutrófilos (%)	2.0±1.5	55.0±11.9*	0.3±0.4	0.8±0.2	1.0±1.2	9.5±5.7*	1.0±1.0	8.0±0.2*
Eosinófilos (%)	0.0±0.0	1.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Linfocitos (%)	12.0±3.5	9.0±3.5	10.2±5.0	42.5±3.6**	2.0±2.1	8.5±4.2*	1.7±2.1	4.2±4.1

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$

## Los ratones BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup> desarrollan daño pulmonar parecido al observado en la cepa C57BL/6

Para conocer un poco más acerca del papel de la polarización Th2 en ratones BALB/c en la respuesta inflamatoria, se comparó el porcentaje de extensión de daño pulmonar y las subpoblaciones de células T en ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6<sup>-/-</sup> (deficientes de células Th2) expuestos 3 semanas a SR. Se observó un incremento progresivo en la extensión de daño pulmonar en los ratones BALB/c STAT6<sup>-/-</sup> ( $13.3 \pm 11.7\%$  sacrificados a 1 día;  $30.0 \pm 14.1\%$  sacrificados a 4 días;  $p = 0.05$ ). Por el contrario, los ratones BALB/c silvestres mostraron una disminución significativa de la extensión de daño (**Figura 10**).



**Figura 10. Extensión de las lesiones pulmonares en ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6<sup>-/-</sup>.** Los animales fueron expuestos a SR durante 3 semanas y sacrificados a 1 día y 4 días después de la última administración. Los ratones BALB/c STAT6<sup>-/-</sup>, sacrificados 4 días después, mostraron un incremento en la extensión del daño pulmonar en comparación con el que se observó en los ratones sacrificados a los 4 días. No se observaron lesiones en ratones tratados con solución salina (datos no representados en los gráficos). Cada símbolo representa un animal y los datos son expresados en medias y dispersiones.



## Determinación de células NKT, NK y T $\gamma\delta$

Un hallazgo no descrito previamente fue que los ratones control BALB/c STAT6  $-/-$  muestran porcentajes de células NKT significativamente mayores ( $9.5 \pm 1.1\%$ ) comparado con los ratones control BALB/c silvestre ( $0.9 \pm 0.1\%$ ;  $p < 0.01$ ; **Tabla 7 y Figura 11**). Estos elevados porcentajes basales se mantuvieron sin cambios después de exposición a SR tanto en los sacrificados a 1 como a 4 días después de la última instilación del antígeno.

En relación a las subpoblaciones de células NKT, los ratones BALB/c STAT6 $-/-$  mostraron un aumento significativo de las células NKT CD4 $+$  tanto a 1 día ( $9.9 \pm 0.4\%$  vs  $39.1 \pm 8.1\%$ ;  $p < 0.05$ ) como a 4 días ( $12.5 \pm 7.6\%$  vs  $44.6 \pm 5.1\%$ ,  $p < 0.04$ ) y de las células NKT DN ( $6.3 \pm 1.9\%$  vs  $22.9 \pm 6.4\%$   $p < 0.01$  a 1 día y  $0.1 \pm 0.1\%$  vs  $7.9 \pm 3.4\%$  a los 4 días;  $p < 0.01$ ). El incremento de estas dos subpoblaciones se relacionó con una disminución significativa de las células NKT CD8 $+$ . Los ratones BALB/c silvestres tratados con SR mostraron cambios similares a los observados cuando se compararon con la cepa C57BL/6, esto es, un incremento de las células NKT DN y una disminución de las células NKT CD8 $+$ .

Al igual de lo que se observó con las células NKT, los ratones STAT6  $-/-$  control mostraron un aumento en los porcentajes de células NK los cuales se mantuvieron sin cambios en los animales expuestos a SR. En contraste, los ratones BALB/c silvestres tuvieron un incremento significativo cuando fueron sacrificados a 1 día ( $2.0 \pm 0.5\%$  vs  $14.6 \pm 3.2\%$ ;  $p < 0.01$ ) y a 4 días ( $2.7 \pm 0.3\%$

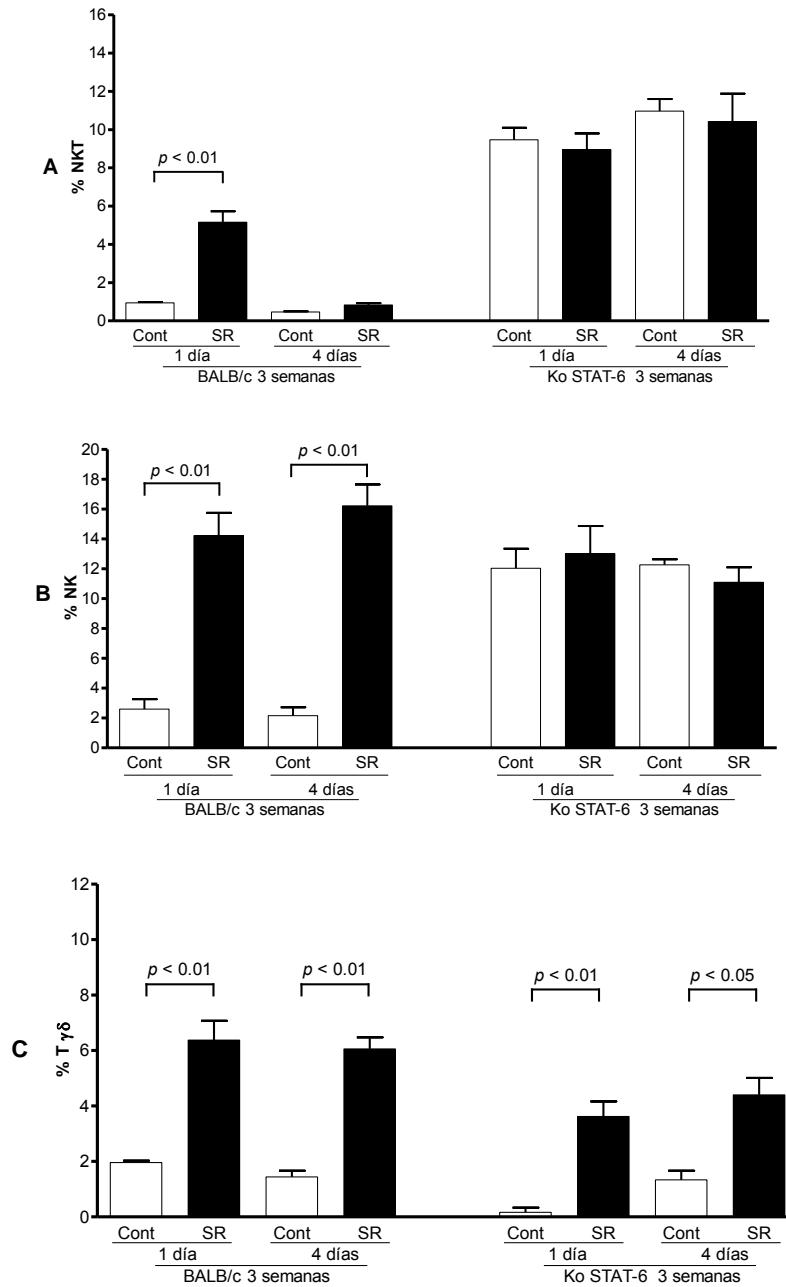
vs  $16.2 \pm 1.3\%$ ;  $p < 0.01$ ) después de la última inhalación del antígeno (**Tabla 7 y Figura 11**).

Por último, en ratones BALB/c silvestre y BALB/c deficiente de Th2 se observó un incremento de las células  $T\gamma\delta$  después de la administración de SR (**Figura 11**).

**Tabla 7.** Relación CD4/CD8 y subpoblaciones de células NK y NKT en ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup>, estimulados durante 3 semanas con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

Subpoblación celular	Cepa BALB/c Silvestre				Cepa BALB/c STAT6 <sup>-/-</sup>			
	1 día		4 días		1 día		4 días	
	Control n = 5	SR n = 6	Control n = 5	SR n = 5	Control n = 5	SR n = 6	Control n = 5	SR n = 5
CD4/CD8	3.5	9.9	3.2	4.1	7.3	9.6	4.2	6.8
NK (%)	2.0±0.5	14.6±3.2*	2.7±0.3	16.2±1.3*	11.6±2.8	13.0±2.9	11.8±2.7	10.7±3.5
NKT (%)	0.9±0.1	4.2±0.2*	0.5±0.1	0.8±0.2	9.5±1.1	9.0±2.5	11.0±1.1	10.4±3.3
NKT CD4+ (%)	54.8±1.2	51.6±1.2	20.4±0.5	33.9±0.8	9.9±0.4	39.1±8.1**	12.5±7.6	44.6±5.1**
NKT CD8+ (%)	28.3±1.1	12.4±1.8*	46.9±0.9	35.9±0.9*	83.2±1.6	24.6±3.6*	83.5±11.4	41.0±7.7**
NKT DN (%)	14.0±2.7	36.0±1.7*	30.4±1.6	27.7±2.5	6.3±1.9	22.9±6.4*	0.1±0.1	7.9±3.4*

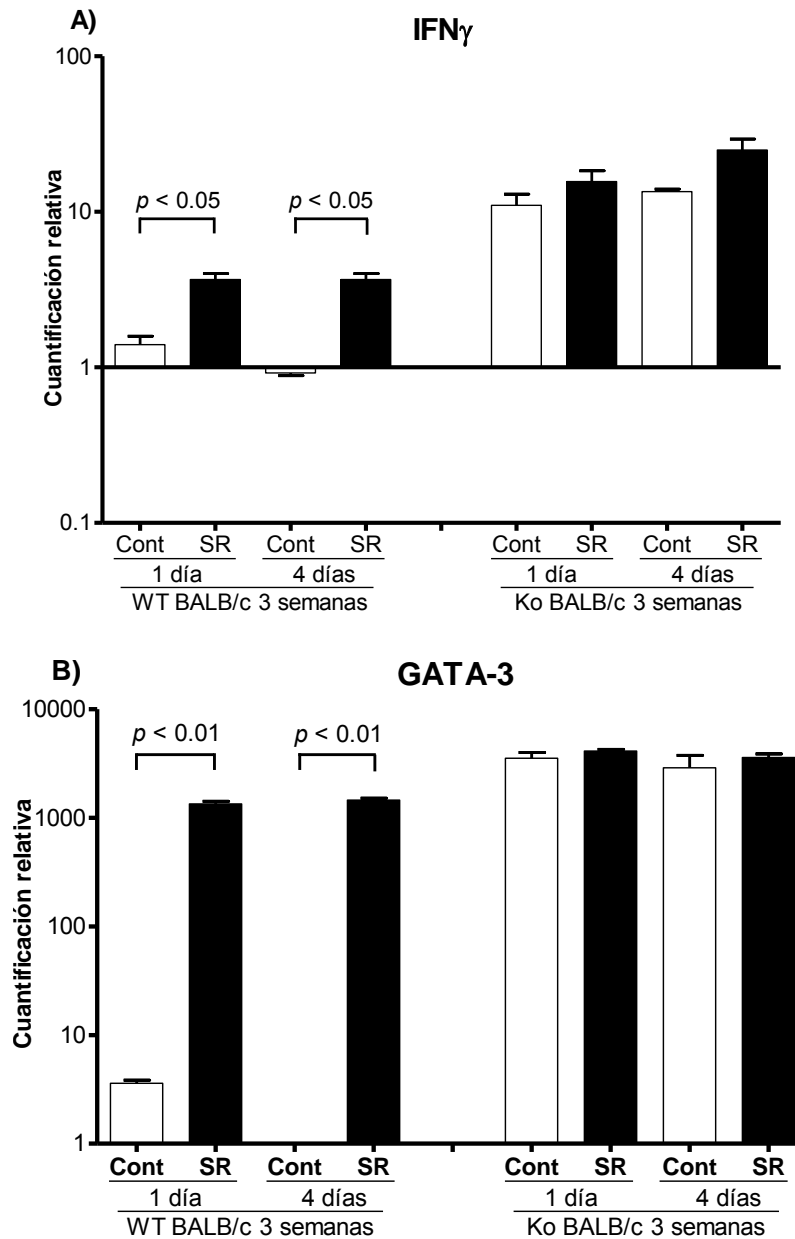
\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$



**Figura 11. Porcentajes de células NKT, NK y T $\gamma\delta$  en ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6  $-/-$ .** Los animales fueron expuestos a solución salina (control) y a *S. rectivirgula* (SR) durante 3 semanas y sacrificados a 1 y 4 días después de la última administración. Las células totales fueron obtenidas del pulmón izquierdo por digestión enzimática, teñidas y analizadas por citometría de flujo. Los datos son expresados en medias y desviaciones estándar.

## Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y GATA-3 en tejido pulmonar

La expresión de los genes de IFN- $\gamma$ , IL-4 y GATA-3 en tejido pulmonar fue evaluada por RT-PCR en tiempo real. Los ratones BALB/c STAT6  $-/-$  mostraron expresiones basales elevadas de IFN- $\gamma$  en relación con ratones BALB/c silvestres ( $1.4 \pm 0.4$  vs  $11.0 \pm 2.8$ ;  $p < 0.05$ ), sin cambios después de la instilación de SR. En cambio los ratones silvestres mostraron un incremento significativo de este mediador cuando fueron expuestos al antígeno (**Figura 12A**). La expresión de IL-4 fue indetectable en ambas cepas, mientras que los ratones STAT6  $-/-$  mostraron expresiones basales elevadas de GATA-3 en relación con ratones control de la cepa silvestre ( $3.6 \pm 0.5$  vs  $3550.0 \pm 650.5$ ;  $p < 0.05$ ) sin cambios después de la exposición al antígeno. Después del estímulo con SR los ratones BALB/c silvestres mostraron una elevación significativa de GATA-3 (**Figura 12B**).



**Figura 12. Expresión de IFN- $\gamma$  y GATA-3 en tejido pulmonar de ratones BALB/c silvestres y BALB/c STAT6 $^{-/-}$ .** Los animales fueron expuestos a solución salina (control) y a *S. rectivirgula* (SR) durante 3 semanas y fueron sacrificados a 1 y 4 días después de la última administración. La expresión fue analizada por RT-PCR en tiempo real y los valores fueron normalizados con GAPDH y presentados como cambios relativos en comparación con las muestras del calibrador no tratado. Los datos son expresados en medias y desviaciones estándar.

## 8. DISCUSIÓN

Varios estudios han propuesto que el desarrollo de NH en modelos animales y seres humanos esta mediado principalmente por una respuesta inmune tipo Th1 (Barrera et al., 2008; Yamasaki et al., 1999; Butler et al., 2002). Sin embargo, el cambio de Th1 a Th2 parece ser determinante en la progresión de la inflamación hacia NH crónica y fibrosis pulmonar (Barrera et al., 2008; Pardo et al., 2002). Se ha sugerido que en etapas tempranas del proceso inflamatorio pulmonar en NH la respuesta esta mediada principalmente por IFN- $\gamma$  y con una participación significativa de citocinas anti-inflamatorias (Th2) que pueden atenuar la inflamación. Sin embargo en etapas tardías se observa un predominio de la respuesta Th2 que contribuye a la producción de factores pro-fibróticos como TGF- $\beta$ , entre otros. No obstante, a pesar de que la NH es una enfermedad que se considera Th1, se ha descrito recientemente que los pulmones de ratones tratados con SR presentan bajas cantidades de IFN- $\gamma$  y una marcada disminución en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T (Simonian et al., 2009).

En este contexto, se decidió explorar la respuesta inflamatoria en ratones que muestran una diferente polarización Th. Los resultados mostraron diferencias importantes en la cinética del daño pulmonar entre los ratones C57BL/6 (Th1) y los ratones BALB/c (Th2). Esencialmente se observó que los ratones C57BL/6 tratados con SR durante 1 y 3 semanas muestran lesiones pulmonares progresivas mientras que en los ratones BALB/c el daño pulmonar disminuye. De

manera interesante se observó que los ratones BALB/c deficientes de Th2 (STAT6 -/-) se comportan de manera similar a los ratones C57BL/6, es decir presentan un daño pulmonar progresivo. Cabe señalar, que los ratones no tratados con SR de la cepa STAT6 -/- presentaron altas expresiones de IFN- $\gamma$  y GATA-3 en tejido pulmonar en relación con la cepa BALB/c silvestre. GATA-3 es un factor de transcripción que induce desarrollo de Th2 e inhibe la diferenciación de células Th1 y es esencial en la reacción de hipersensibilidad de las vías aéreas (Yamashita et al., 2004; Yamashita et al., 2006; Finotto et al., 2001). Se ha sugerido que la sobre-regulación de GATA-3 confiere un papel protector a desarrollar NH por el aumento de la respuesta Th2 y por la supresión de la producción de IFN- $\gamma$  (Matsuno et al., 2007); sin embargo en este trabajo no se presentó dicho efecto. En el ratón control BALB/c silvestre, se observó baja expresión de GATA-3, pero tras la exposición a SR aumentaron significativamente. En los ratones BALB/c STAT6-/- también se encontró una alta expresión de GATA-3 sin cambios entre los controles y los tratados con SR.

Con respecto a las concentraciones de citocinas en el LBA en los ratones BALB/c y C57BL/6, después de la estimulación de la respuesta inmune con los antígenos de SR se observó un perfil Th1 en la cepa C57BL/6 y un perfil Th2 en BALB/c. De manera interesante, en los ratones C57BL/6 no tratados con SR se detectaron concentraciones elevadas de IFN- $\gamma$  y sin un aumento posterior al tratamiento con SR.



Estos resultados correlacionan con hallazgos previos que demuestran que los ratones Th1 tratados con SR expresan bajas cantidades de IFN- $\gamma$  en el pulmón después de dos semanas de exposición a SR (Simonian et al; 2009). Por otra parte, se ha sugerido que las citocinas Th2 modulan la severidad de la NH en cepas de ratones DBA/2 (Butler et al; 2002). También, se ha descrito que la producción de IFN- $\gamma$  por neutrófilos, en modelos murinos de NH, es suficiente para la formación de granulomas en ausencia de células T (Nance et al., 2005).

Estudios previos han revelado que los pacientes con NH presentan diferentes subtipos de células T funcionales dependiendo de la etapa clínica de la enfermedad (Barrera et al., 2008).

En este estudio, se encontraron diferencias interesantes en la distribución de subpoblaciones de células NK, T (NKT y T $\gamma\delta$ ) entre los ratones con NH de las cepas C57BL/6, BALB/c silvestre y BALB/c STAT6 -/-.

Asimismo, se observó un incremento importante de células NK en ratones de ambas cepas tratados 1 semana y sacrificados a 1 y 4 días. También se encontró, un incremento de estas células en ratones BALB/c tratados a 3 semanas y sacrificados a 1 y 4 días después de la última administración del antígeno. En contraste, en la cepa C57BL/6 a las 3 semanas no se apreciaron diferencias en los porcentajes de esta subpoblación celular. Los ratones STAT6 -/- control mostraron un aumento en los porcentajes de células NK, que se mantuvieron también elevados en los animales expuestos a SR. Los ratones BALB/c silvestres tuvieron

un incremento significativo de las células NK sacrificados tanto a 1 y 4 días post-instilación de SR.

En relación con las células de NK, algunos estudios han demostrado que cuando éstas son estimuladas con IL-4 pueden provocar anomalías en la maduración de células dendríticas, posiblemente por la inducción de una respuesta Th2 y una tolerancia inmune (Marcenaro et al., 2005). Sin embargo cuando son estimuladas con IL-12 producen IFN- $\gamma$  y promueven la correcta maduración de las células dendríticas y la respuesta Th1.

Durante la infección por influenza, las células NK son reclutadas en el pulmón donde interactúan con células infectadas como células epiteliales, monocitos, células dendríticas y células T, lo cual contribuye a la protección limitando la replicación viral y promoviendo una respuesta efectiva de linfocitos T citotóxicos (Culley, 2009).

Por otro lado se ha observado en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática la reducción de NKG2D en células NK, NKT, y T  $\gamma\delta$  en LBA incrementándose la expresión de MICA (del inglés *MHC class I chain-related gene A*) soluble y TGF- $\beta$ , lo cual confiere susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, así como una alta expresión de MICA en células epiteliales y fibroblastos en el pulmón; también se observa un incremento significativo en la frecuencia del alelo MICA\*001 y la disminución en la frecuencia de MICA\*004, lo cual sugiere que dichos ligandos de

células NK desempeñan un papel importante en la regulación de la progresión de la enfermedad (Aquino-Galvez, 2009).

Las células NK confieren un efecto protector contra fibrosis; en modelos de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, la falta de reclutamiento de células NK, reduce la producción de IFN- $\gamma$  en el pulmón y la fibrosis incrementa, sin embargo se ha observado que el tratamiento exógeno de IFN- $\gamma$  confiere un efecto terapéutico, demostrando la importancia de las células NK productoras de IFN- $\gamma$  en la regulación de fibrosis pulmonar.

Estudios han sugerido la utilización de IFN- $\gamma$  en la terapéutica en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, pero en un ensayo reciente no se encontró ninguna ventaja clínica de este tratamiento (Culley, 2009).

En los ratones C57BL/6 como BALB/c expuestos 1 y 3 semanas al antígeno mostraron un incremento significativo en las células NKT. En los ratones control BALB/c STAT6  $-/-$  los porcentajes de células NKT fueron mayores comparado con los ratones control BALB/c silvestre y estos porcentajes se mantuvieron sin cambios aún en los animales expuestos a SR tanto en los sacrificados a 1 y 4 días después de la exposición al antígeno. Se puede inferir que las modificaciones en estas subpoblaciones celulares pueden explicar, al menos parcialmente, la diferencia en la respuesta inflamatoria a la *Saccharopolyspora rectivirgula* que se observaron entre las dos cepas de ratón.

Por ejemplo, en estudios experimentales indican que las células NKT desempeñan un papel importante en la respuesta del huésped hacia un amplio

intervalo de infecciones respiratorias (Boyton, 2008). En particular, en investigaciones en modelos de ratón han sugerido que las células NKT contribuyen a la protección para el desarrollo de NH por la producción de citocinas tipo Th2 reflejado en una reducción en el reclutamiento de neutrófilos y en la producción de IFN- $\gamma$  (Gudmundsson et al., 1998). En este mismo sentido se ha descrito que las células NKT CD4+ productoras de IL-4 previenen la NH por la supresión de IFN- $\gamma$  (Hwang et al., 2006). También desempeñan importante papel protector en fibrosis pulmonar atenuando la inflamación pulmonar inducida por bleomicina (Kim et al., 2001). Diversas investigaciones sugieren que las células NKT CD4+ y DN (CD4-, CD8-) tienen diferentes funciones dependiendo de su respuesta Th1 y Th2. Estudios funcionales de células NKT estimuladas con  $\alpha$ -galactosilceramida han demostrado que si las células dendríticas interactúan con las células NKT CD4+ inducen una polarización Th1 y si interactúan con células NKT DN inducen una respuesta Th2 (Liu et al., 2008).

Finalmente, ambas cepas tratadas con SR mostraron un incremento significativo de las células T $\gamma\delta$  en todos los tiempos estudiados, su incremento fue más notorio a las 3 semanas en la cepa BALB/c sugiriendo que también podría participar en mecanismos de protección al daño pulmonar. En los ratones BALB/c silvestre y BALB/c deficiente de Th2 se observó un incremento de las células T $\gamma\delta$  después de la administración de SR. Este resultado sugiere una relación con el mejor control del daño pulmonar. En este contexto, diferentes estudios indican que las células NK y T  $\gamma\delta$  desempeñan un papel importante en la respuesta inmune

innata contra células infectadas y transformadas y están involucradas en la regulación de la inflamación de pulmonar.

En este sentido, se ha reportado que el reto antigénico con *B. pertussis* en ratones TCR  $\gamma\delta$  *-/-* provoca mayor inflamación pulmonar que en los animales silvestres, sugiriendo una respuesta regulatoria por parte de las células T  $\gamma\delta$  sobre la respuesta inflamatoria pulmonar temprana a la infección bacteriana (Zachariadis et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito en un modelo murino de NH que las células T  $\gamma\delta$  son productoras de IL-17, citocina que desempeña un papel central en la eliminación bacteriana y en la resolución de la inflamación, lo cual sugiere que estas células podrían desempeñar un papel importante en el control de la enfermedad (Simonian, 2009). En este modelo se propone un efecto similar, donde se observó un aumento de células T  $\gamma\delta$  y una disminución en el daño pulmonar en los ratones BALB/c (Th2) silvestres tratados durante 1 y 3 semanas con *S. reactivigula* y sacrificados 4 días después de la última administración del antígeno. Por otra parte es importante señalar que las células T  $\gamma\delta$  intra-epiteliales son importantes en la reparación del tejido por su producción de citocinas y factores de crecimiento epitelial (Holtmeier, 2003). Ensayos funcionales en ratones han demostrado que las células T  $\gamma\delta$  ejercen una función anti-fibrótica (Simonian et al., 2006). Se ha observado una disminución de las células T  $\gamma\delta$  en pacientes con NH crónica, fenómeno que no se observó en pacientes subagudos que habitualmente se recuperan (Barrera et al., 2008), lo cual sugiere un papel importante de estas células en la regulación de la inflamación en NH.

## 9. CONCLUSIONES

Los hallazgos muestran diferencias significativas en la progresión de daño pulmonar y en las subpoblaciones de células T, en ratones con respuesta inmune tipo Th1 y Th2 tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*. En este sentido, los ratones Th2 tienen una tendencia a controlar la extensión de la lesión pulmonar mientras que los ratones Th1 y los deficientes en respuesta Th2 presentan un incremento progresivo del daño pulmonar, posiblemente debido al desarrollo de un eficiente efecto anti-inflamatorio Th2. Asimismo, los resultados sugieren un cierto efecto protector de las células NKT DN, NK regulatorias y células T  $\gamma\delta$ . Sin embargo, es necesario realizar estudios funcionales de estas células para corroborar su posible papel en la respuesta inmune ante antígenos que provocan neumonitis por hipersensibilidad.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Akbari Omid, Stock P, Meyer E, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature Medicine*. 2003. 9 (5): 582-588.

Allen DH, Basten A, Williams GV, et al. Familial hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Med*. 1975. 59 (4), 505-514.

Aquino-Galvez A, Pérez-Rodríguez M, Camarena A, et al. MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Human. Genet*. 2009. 125:639-648.

Barrera L, Mendoza F, Zuñiga J, et al. Functional diversity of T cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2008. 177:44–55.

Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presenting function by human gamma/delta T cells. *Science*. 2005. 309:264-268.

Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol*. 2004. 25:570-577.

Bustos ML, Frías S, Ramos S, et al. Local and circulating microchimerism is associated with hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2007. 176 (1), 90-95.

Butler NS, Monick MM, Yarovinsky TO et al. Altered IL-4 mRNA stability correlates with Th1 and Th2 bias and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *J. Immunol*. 2002. 169:3700-3709.

Camarena A, Juárez A, Mejía M, Estrada A, Carrillo G, Zuñiga J, Navarro C, Granados J, Selman M. Major histocompatibility complex and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001. 163:1528-1533.

Camarena A, Aquino-Galvez A, Falfán-Valencia R, et al. PSMB8 (LMP7) but not PSMB (LMP2) gene polymorphisms are associated to pigeon breeder's hypersensitivity pneumonitis. *Respir. Med*. 2010. 104(6):889-894.

Camarena A, Juarez A, Mejia M, et al. Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001. 163 (7), 1528-1533.

Chatenoud Lucienne. Do NKT cells control autoimmunity?. J. Clin. Invest. 2002. 110: 747-748.

Christensen LT, Schmidt CD, Robbins L. Pigeon breeders' disease: a prevalence study and review. Clin Allergy. 1975. 5:417-430.

Christensen LT, Schmidt CD, Robbins L. Pigeon breeders' disease: a prevalence study and review. Clin. Allergy. 1975. 5:417-430.

Cormier Y, Samson N, Israel-Assayag E. Viral infection enhances the response to *Saccharopolyspora rectivirgula* in mice prechallenged with this farmer's lung antigen. Lung. 1996. 174 (6), 399-407.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature. 2003; 421:744-748.

Culley Fiona J. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. Immunology. 2009. 128:151-163.

Dakhama A, Hegele RG, Laflamme G, et al. Common respiratory viruses in lower airways of patients with acute hypersensitivity pneumonitis. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1999. 159 (4), 1316-1322.

Delventhal S, Hensel A, Petzoldt K, Pabst R. Effects of microbial stimulation on the number, size and activity of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structures in the pig. Int. J. Exp. Pathol. 1992. 73:351-357.

Denis M. Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1995. 151:164-169.

Drayton DL, Chan K, Lesslauer W, Lee J, Ying XY, Ruddle NH. Lymphocyte traffic in lymphoid organ neogenesis: differential roles of LT $\alpha$  and LT $\alpha\beta$ . Adv. Exp. Med. Biol. 2002. 512:43-48.

Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, et al. Toll like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. Histochem. Cell Biol. 2003. 119:103-108.

Feng RE, Shi JH, Xiao Y, et al. Pathologic study of diffuse pulmonary interstitial fibrosis caused by chronic hypersensitivity pneumonitis. Chin. J. Pathol. 2009. 38(2):86-90.



Fong DJ, Hoagaboam CM, Matsuno Y, et al. Toll-like receptor 6 drives interleukin-17A expression during experimental hypersensitivity pneumonitis. *Immunol.* 2010. 1-12.

Foster PS, Yang M, Herbert C, Kumar RK. CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma. *Lab. Invest.* 2002. 82(4):455-62.

Furuiye M, Miyake S, Miyazaki Y, et al. Effect of cigarette smoking on the development of murine chronic pigeon breeder's lung. The difference between a short-term and a long-term exposure. *J. Med. Dent. Sci.* 2007. 54(1):87-95.

Gaxiola M, Selman M. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993. 148:49-53.

Ghadirian E and Denis M. Murine hypersensitivity pneumonitis: interleukin-4 administration partially abrogates the disease process. *Microb. Pathog.* 1992. 2:377-382.

Girard M, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Curr. Opin Allergy Clin. Immunol.* 2010. In press.

Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 2007. 28 (1), 1-6.

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, et al. NKT cells : facts, functions and fallacies. *Review Immunol. Today.* 2000. 21 (11): 573-583.

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, et al. NKT cells: what's in a name?. *Nature Review Immunol.* 2004. 4: 231-237.

Gudmundsson G and G. Hunninghake. Interferon- $\gamma$  is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Invest.* 1997. 99:2386-2390.

Gudmundsson G, Monick MM, Hunninghake GW. IL-12 modulates expression of hypersensitivity pneumonitis, *J. Immunol.* 1998. 161:991-999.

Gudmundsson G, Monick MM, Hunninghake GW. Viral infection modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J. Immunol.* 1999. 162 (12), 7397-7401.

Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbha P, et al. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis, *Am. J. Pathol.* 2005. 167:365-379.

Hara S, Yamamoto K, Yoda A, et al. Three cases of isocyanate-induced hypersensitivity pneumonitis with different HRCT findings. *J. Jap. Respir. Society.* 2009. 47(9):839-843.

Hasleton PS Hypersensitivity pneumonitis. In: Spencer's pathology of the lung. Mc Graw-Hill. New York. 1996. 433-445.

Hayakawa H, Shirai M, Sato A, et al. Clinicopathological features of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respirology.* 2002. 7 (4), 359-364.

Hendrick DJ, Faux JA, Marshall R. Budgerigar-fancier's lung: The commonest variety of allergic alveolitis in Britain. *Br Med J.* 1978. 2:81-84.

Hill MR, Briggs L, Montano MM, Estrada A, Laurent GJ, Selman M, Pardo A. Promoter variants in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) protect against susceptibility in pigeon breeder's disease. *Thorax.* 2004. 59(7):586-590.

Hirschmann JV, Pipavath SN and Godwin JD. Hypersensitivity pneumonitis: a historical, clinical and radiologic review. *Radiographics.* 2009. 29(7):1921-1938.

Hoche B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, et al. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000. Jul; 23 (1):7-10.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999. 284:1313-1318.

Hoppin JA, Umbach DM, Kullman GJ, et al. Pesticides and other agricultural factors associated with self-reported farmer's lung among farm residents in the Agricultural Health Study. *Occup. Environ. Med.* 2007. 64 (5), 334-341.

Hwang SJ, Kim S, Park WS, Chung DH. IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-gamma-producing neutrophils. *J. Immunol.* 2006. Oct 15; 177(8):5258-5268.

Israël-Assayag E, Dakhama A, Lavigne S, et al. Expression of costimulatory molecules on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1999. 159 (6), 1830-1834.

Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Gamma/delta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J. Exp. Med.* 2005. 201:1269-1279.

Johnston B, Kim CH, Soler D, et al. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR $\alpha\beta$  NKT cell subsets. *Journal Immunol.* 2003. 171: 2960-2969.

Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, et al. Monocyte Chemottractant Protein-1-dependent Increase of V $\alpha$ 14 NKT Cells in Lungs and their Roles in Th1 Response and Host Defense in Cryptococcal Infection. *The American Association of Immunologists.* 2001. 167:6529-6532.

Kondoh K, Usui Y, Ohtani Y, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in hypersensitivity pneumonitis. *J. Med. Dent. Sci.* 2006. 53 (1), 75-83.

Korosec P, Osolnik, Kern I, Silar M, Mohorcic K, Kosnik M. Expansion of pulmonary CD8+CD56+ natural killer T-cells in hypersensitivity pneumonitis. *Chest.* 2007. Oct; 132(4):1291-1297.

Lacasse Y, Selman M, Costabel U et al. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2003. 168:952–958.

Lapaire O, Hösli I, Zanetti-Daellenbach R, et al. Impact of fetal-maternal microchimerism on women's health--a review. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2007. 20 (1), 1-5.

Lieberman J. The ABCS of Granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews.* 2003. 3 (5): 361-370.

Masopust D, Vezys V, Usherwood EJ, et al. Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin. *J. Immunol.* 2004. 172:4875-4882.

Matsuno Y, Ishii Y, Yoh K, et al. Overexpression of GATA-3 protects against the development of hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2007. 176:1015-1025.

Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. 19:197-223.

Muijsers RB, Ten Hacken NH, Van Ark I, Folkerts G, Nijkamp FP, Postma DS. L Arginine is not the limiting factor for nitric oxide synthesis by human alveolar macrophages in vitro. *J. Eur. Respir.* 2001. 18:667-671.

Nakamura T, Sonoda KH, Faunce DE, et al. CD4<sup>+</sup> NKT cells, but not conventional CD4<sup>+</sup> T cells, are required to generate efferent CD8<sup>+</sup> T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *Journal Immunol.* 2003. 171: 1266-1271.

Nance S, Cross R, Yi AK and Fitzpatrick EA. IFN- $\gamma$  production by innate immune cells is sufficient for development of hypersensitivity pneumonitis. *Eur. J. Immunol.* 2005. 35:1928–1938.

Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, et al. Chronic bird fancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax.* 2005. 60 (8), 665-671.

Ohtani Y, Saiki S, Sumi Y, et al. Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003. 90 (6), 604-610.

Pan LH, Yamauchi K, Sawai T, et al. Inhibition of binding of E- and P-selectin to sialyl-Lewis X molecule suppresses the inflammatory response in hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2000. 161:1689-1697.

Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, et al. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2000. 161:1698-1704.

Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma glutamyl transpeptidase-deficient mice, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2003. 167:925-932.

Park Y, Oh SJ and Chung DH. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells attenuate hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J. L. B.* 2009. 86:1427-1437.

Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. 108:661-670.

Paul L, Lehrman SG and Aronow WS. Hypersensitivity pneumonitis: evaluation and management. *Compr. Ther.* 2009. 35(3-4):177-187.

Pérez-Padilla R, Gaxiola M, Salas J, Mejía M, Ramos C, Selman M. Bronchiolitis in chronic pigeon breeder's disease. Morphological evidence of a spectrum of small airway lesions in hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigens. *Chest.* 1996. 110:371-377.

Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, et al. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993.148:49-53.

Pisegna S, Pirozzi G, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Palmieri G. p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood.* 2004. 104:4157-4164.

Reyes CN, Wenzel FJ, Lawton BR, et al. The pulmonary pathology of farmer's lung disease. *Chest.* 1982. 81 (2), 142-146.

Salvaggio JE. The identification of hypersensitivity pneumonitis. *Hosp. Pract.* 1995; 30: 57-62.

Schaaf BM, Seitzer U, Pravica V, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in farmer's lung patients. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2001. 163 (2), 379-382.

Schmidt KN, Leung B, Kwong M, et al. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J. Immunol.* 2004. 172:138-143.

Schuyler M, Gott K, Cherne A and Edwards B. Th1 CD4+ cells adoptively transfer experimental hypersensitivity pneumonitis, *Cell. Immunol.* 1997. 177:169-175.

Selman M. Hypersensitivity Pneumonitis. In: *Interstitial Lung Disease.* Schwarz M, and King T, eds. B.C. Decker Inc., Hamilton Ontario, 4<sup>o</sup> edition. 2003. 452-484.

Selman M, Hypersensitivity Pneumonitis. In: *interstitial lung disease.* Schwarz M, and King T, eds. B.C. Decker Inc., Hamilton Ontario, 4<sup>o</sup> edition. 2003. 452-484.

Selman M, Terán L, Mendoza A, et al. Increase of HLA-DR7 in pigeon breeder's lung in a mexican population. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1987. 44:63-68.

Selman M, Chapela R, Raghu G. Hypersensitivity pneumonitis: clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Seminars Res. Med.* 1993. 14:353-359.

Selman M. Hypersensitivity pneumonitis. In: *Interstitial lung disease.* Schwarz M, and King T, Eds. B. C. Decker Inc., Hamilton Ontario. 1998. 393-422.

Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin. Chest. Med.* 2004. 25:531-547.

Selman M. Neumonitis por hipersensibilidad. En: Neumopatías intersticiales difusas, Panamericana. México D.F. 1997. 65-87.

Selman, Pérez-Padilla R. Airflow obstruction and airway lesions in hypersensitivity pneumonitis. Clin. Chest. Med. 1993. 14:699-714.

Simonian PL, Roark CL, Born WK et al.  $\gamma\delta$  T cells and Th17 cytokines in hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. Translational Research. 2009; 154 :222-227.

Simonian PL, Roark CL, Diaz del Valle F, et al. Regulatory role of gammadelta T cells in the recruitment of CD4+ and CD8+ T cells to lung and subsequent pulmonary fibrosis. J. immunol. 2006. 177:4436-4443.

Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, et al. IL17A-expressing T cells are essential for bacterial clearance in a murine model of hypersensitivity pneumonitis. J. immunol. 2009. 182:6540-6549.

Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, et al. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. J. Immunol. 2009. 182:657-665.

Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumours and dendritic cells. Proc. Natl. Acad. 2004. 101:10116-10121.

Skeen MJ, Freeman MM, Ziegler HK. Changes in peritoneal myeloid populations and their proinflammatory cytokine expression during infection with *Listeria monocytogenes* are altered in the absence of gamma/delta T cells. J. Leukoc. Biol. 2004. 76:104-115.

Thomas SY, Hou R, Boyson JE, et al. CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. Journal Immunol. 2003. 171: 2571-2580.

Vourlekis JS, Schwarz MI, Cherniack RM, et al. The effect of pulmonary fibrosis on survival in patients with hypersensitivity pneumonitis. Am J Med 116:662-668, 2004.

Vourlekis JS, Schwarz MI, Cool CD, et al. Nonspecific interstitial pneumonitis as the sole histologic expression of hypersensitivity pneumonitis. Am. J. Med. 2002. 112 (6), 490-493.

Yamasaki H, Ando M, Brazer W, et al. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J. Immunol.* 1999. 163:3516–3523.

# APÉNDICE 1





## Inflammatory response and dynamics of lung T cell subsets in Th1, Th2 biased and Th2 deficient mice during the development of hypersensitivity pneumonitis<sup>☆</sup>

Luis Jimenez-Alvarez<sup>a</sup>, Joaquín Zúñiga<sup>a</sup>, Miguel Gaxiola<sup>a</sup>, Marco Checa<sup>a</sup>, Carina Becerril<sup>a</sup>, Felipe Mendoza<sup>a</sup>, Annie Pardo<sup>b</sup>, Moisés Selman<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Mexico D.F., Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2009  
and in revised form 4 March 2010  
Available online 16 March 2010

#### Keywords:

Hypersensitivity pneumonitis  
Extrinsic allergic alveolitis  
*Saccharopolyspora rectivirgula*  
T cells  
Th1

### ABSTRACT

It is considered that hypersensitivity pneumonitis (HP) occurs with a Th1 cell dominance; however, the role of Th1/Th2 balance is still unclear. C57BL/6 (Th1-biased), BALB/c wt (Th2-biased) and BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> (Th2 deficient) mice were treated with *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) or saline during 3 weeks, and sacrificed 1 and 4 days (early and late response) after the last administration. Lung isolated T cell subpopulations were analyzed and lung damage extent was quantified. C57BL/6 wt mice exhibited a significant increase in the extent of lung damage when sacrificed at 4 days compared with those sacrificed 1 day after the last SR administration. In contrast, BALB/c wt mice showed a progressive decrease in the extent of lung damage. A significant increase of NKT CD4<sup>+</sup> subset was found in C57BL/6 mice while NKT DN cells were increased in BALBc wt mice. Also, NK and  $\gamma\delta$  T cells were increased in BALB/c mice at 1 and 4 days. *Stat6*<sup>-/-</sup> mice behave similar to the C57BL/6 mice, showing a progressive increase in the extent of lung damage. A significant increase in the levels of Th1 and Th2 cytokines was observed in bronchoalveolar lavage from the SR-treated mice. These results confirm a predominant role of the Th1 response in HP and suggest that the control of inflammation by Th2 biased mice may be related with the increase of NKT DN cells and regulatory NK and  $\gamma\delta$  T cells.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is an inflammatory immune-mediated interstitial lung disease caused by the exposure to organic particles (Selman, 2004; Lacasse et al., 2003). Avian proteins, thermophilic bacteria and fungi are the most common antigens. The pathogenesis is uncertain but evidence indicates that different T cell populations play an important role in the development of HP and influence the clinical course of the disease (Barrera et al., 2008; Yamasaki et al., 1999; Pardo et al., 2000; Denis, 1995).

Experimental and clinical evidence suggest that the Th1 cytokines play an important role in the pathogenesis of HP (Schuyler et al., 1997; Gudmundsson and Hunninghake, 1997; Butler et al., 2002). Th2 polarization has been associated with chronic HP and progression to pulmonary fibrosis (Barrera et al., 2008). Thus, BAL lymphocytes isolated from patients with subacute HP, stimulated *in vitro* with the specific antigens, expressed and released significant levels of IFN- $\gamma$

and low levels of IL-4 compared with those with chronic HP (Barrera et al., 2008). Mice studies using *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) to induce HP have demonstrated that lung response is driven by IFN- $\gamma$  and possibly IL-12 (Gudmundsson and Hunninghake, 1997; Gudmundsson et al., 1998; Pan et al., 2000). In contrast, Th2 biased mice display less inflammatory responses after SR-derived antigen exposure compared with Th1 biased strains (Schuyler et al., 1997; Ghadirian and Denis, 1992), possibly as result of IL-4 or GATA-3 overexpression (Matsuno et al., 2007). Likewise, a protective role of IL-4 producing NKT cells in the development of HP has been described (Hwang et al., 2006). However, some contradictory results have also been reported. Thus, in a recent study, analysis of lung cytokines levels at various time points after SR exposure failed to identify a predominant Th1 or Th2 phenotype (Simonian et al., 2009). Also, some evidence indicates that the main source of IFN- $\gamma$  in the experimental models of HP, are neutrophils (Nance et al., 2005). Therefore, the role of Th1/Th2 balance in the pathogenesis of HP is still unclear.

In this study, we analyzed the inflammatory response and the dynamics of lung derived T cell subpopulations in C57BL/6 (Th1-biased) and BALB/c (Th2-biased) mice exposed to SR for 3 weeks and sacrificed 1 and 4 days after the last exposure. To further evaluate the role of the Th1/Th2 balance in the pathogenesis of lung damage, BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> mice (Th2 deficient) were also studied.

<sup>☆</sup> This work was submitted in partial fulfillment of the requirements to obtain the PhD degree for LJA at Biological Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México.

\* Corresponding author. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, "Ismael Cosío Villegas", Tlalpan 4502; CP 14080, Mexico DF, Mexico. Fax: +52 55 5665 4623.

E-mail address: [mselman@yahoo.com.mx](mailto:mselman@yahoo.com.mx) (M. Selman).

## Materials and methods

Wild-type C57BL/6 and BALB/c wild-type female mice were purchased from Harlan Sprague Dawley, Mexico. Also, an *Stat6*<sup>-/-</sup> knockout (KO) BALB/c female mice (homozygous *Stat6*<sup>tm1Gru/Stat6</sup><sup>tm1Gru</sup> mutation, exhibiting a striking defect in the Th2 cell lineage development) were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). All experiments were conducted according to animal experimental ethics committee guidelines and were approved by the Institutional Review Board.

### Induction of hypersensitivity pneumonitis

*Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) was kindly given by Dr. Cormier (Laval University, Quebec, Canada). HP was induced in C57BL/6 ( $n = 13$ ), BALB/c wt ( $n = 13$ ), and BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> ( $n = 11$ ) mice by intranasal administration of 100  $\mu\text{g}$  of SR resuspended in saline solution during 3 consecutive days per week during 3 weeks. A similar number of control mice treated with intranasal saline were also studied in the same conditions to the experimental mice. Experimental and control mice were sacrificed 1 and 4 days after the last antigen or saline administration as previously described (Hagood et al., 2005). All studies were performed by triplicate with a total number of ( $n = 39$ ) C57BL/6, ( $n = 39$ ) BALB/c wt and ( $n = 33$ ) BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> mice.

### Bronchoalveolar lavage (BAL)

BAL was performed three times with 0.5 ml of saline solution; the recovered volume was approximately 800  $\mu\text{l}$  without differences between SR and saline-treated mice. BAL cells were pelleted by centrifugation at 1500 rpm at 4 °C during 10 min and used for total and differential cell counting. Supernatants were frozen at -80 °C.

### Histology

Four  $\mu\text{m}$  sections were stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome, and were scored blindly for severity and extent of the lesions as previously described (Pardo et al., 2003).

### Characterization of lung T cell subsets by flow cytometry

Lung cells were isolated by enzymatic digestion with collagenase (*Clostridium histolyticum*, type VIII; Sigma-Aldrich) at 37 °C during 20 min and tissue disaggregation. Mononuclear cells were separated with Percoll density gradient. Cells were stained with anti-CD3-APC, anti-CD4-APC-Cy7, anti-CD8-PE-Cy5, anti-NK/NKT-PE, anti-TCR $\alpha\beta$ -PE-Cy5, anti- $\gamma\delta$ TCR-PE conjugated monoclonal antibodies. To prevent nonspecific binding to Fc receptors purified anti-mouse CD16/CD32 mAb 2.4G2 blocking reagent was added to the monoclonal antibody mix. After staining, all samples were resuspended in 300  $\mu\text{l}$  of 0.5% paraformaldehyde. The T cell subsets were evaluated with the acquisition of 50,000 events and analyzed with a FACSAria system using the FACSDiva software version 6.1 (BD Biosciences, San Jose, CA).

### Lung tissue cytokine mRNA expression

IFN- $\gamma$ , IL-4 and GATA-3 expression levels were measured by real time PCR using TaqMan probes. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression was used as an endogenous control (Applied Biosystems). One-step RT-PCR was performed for each target gene and GAPDH in a singleplex format using a total of 200 ng of RNA and the TaqMan one-step RT-PCR master mix reagent kit in a 7500 real time PCR system (Applied Biosystems). The cycling parameters were as follows: reverse transcription at 48 °C for

30 min, AmpliTaq activation at 95 °C for 10 min, denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing/extension at 60 °C for 1 min (cycle repeated 40 times). Triplicate cycle threshold  $C_T$  values were analyzed using the comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) method of the SDS software (Applied Biosystems). For statistical analysis the values were first normalized to the endogenous reference gene (GAPDH) and then presented as relative change in comparison to the untreated calibrator sample in relative quantification (RQ) units.

### Th1/Th2 cytokine quantification in bronchoalveolar lavage

The levels of Th1 and Th2 cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and GM-CSF were determined BAL fluids by Luminex (Bio-Rad, Laboratories, Inc., CA). Briefly, 50  $\mu\text{l}$  of BAL were incubated in presence of cytokine/chemokine specific monoclonal antibodies and the complexes were incubated with biotinylated antibodies. The reactions were detected with streptavidin-phycoerythrin. The standard curves were generated with a dynamic range between 5 and 20,000 pg/mL. The results were analyzed by using Bio-Plex v 4.1 software.

### Statistical analysis

The values are expressed in mean  $\pm$  standard deviation. Differences between groups were analyzed by the Mann-Whitney  $U$  test using the software SPSS v. 15. The  $p$  values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Lung inflammation induced by SR differs in C57BL/6 and BALB/c strains

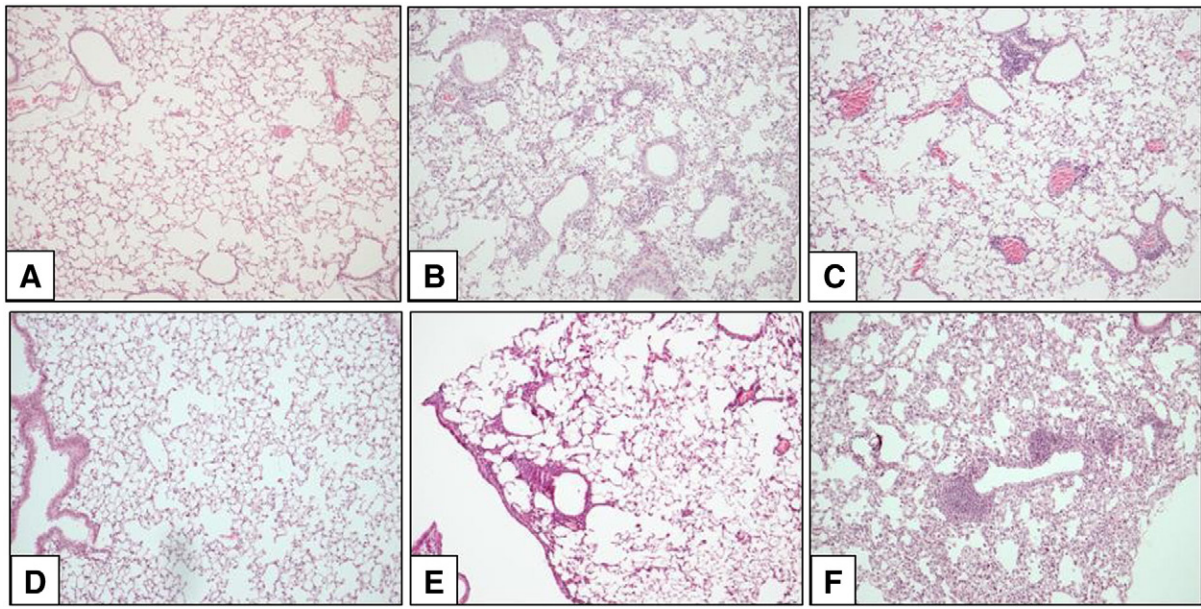
Both strains exhibited inflammatory cells infiltrates in the lung parenchyma with the formation of granulomatous lesions after SR instillation (Fig. 1). In general, inflammation was characterized by the presence of a predominantly polymorphonuclear cell infiltration in mice sacrificed at day 1, and a mixed, polymorphonuclear and mononuclear cell infiltrates in mice sacrificed 4 days after the last instillation. However, semi-quantitative analysis of lung histology revealed important differences in the extent of lung damage between C57BL/6 and BALB/c (Fig. 2). Thus, BALB/c mice exhibited a marked decrease in the extent of lung damage when sacrificed 4 days after the last SR administration compared with the animals sacrificed 1 day after (45.0  $\pm$  10.7% versus 20.0  $\pm$  0.0%,  $p = 0.002$ ). In contrast, C57BL/6 mice showed a progressive increase in the extent of the lung damage. Thus, the extent of the lesions was 26.3  $\pm$  10.3% at 1 day and increased until 44.0  $\pm$  5.5% after 4 days;  $p = 0.01$ .

### BAL cell profile

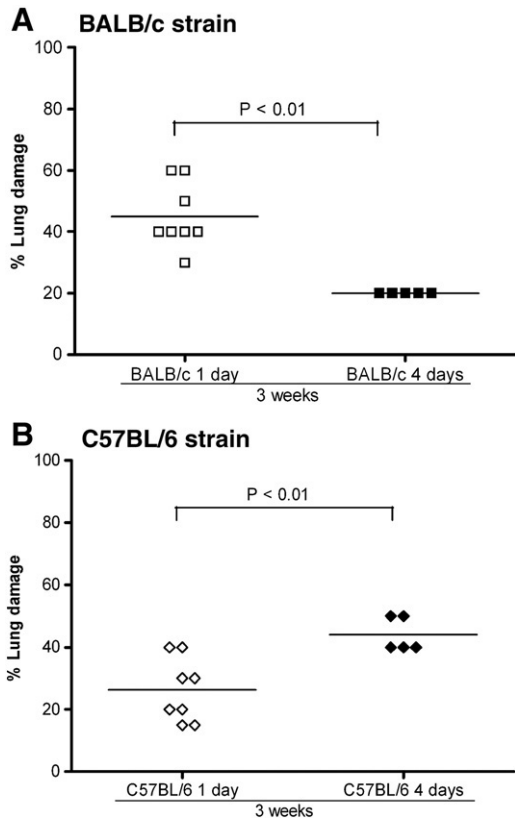
The total number of inflammatory cells was increased in both strains at 1 and 4 days, but this increase was significantly higher in the BALB/c mice. Differential cell count revealed a significant increase of neutrophils in both mice strains when sacrificed 1 day after the last SR administration (Table 1). This increase was significantly higher in the SR-treated BALB/c mice compared to the non stimulated control mice ( $p = 0.008$ ). C57BL/6 mice showed an increase of BAL lymphocytes in both (1 and 4 days) sacrifice times ( $p = 0.04$ ) while BALB/c mice showed a rise only at 4 days after the last SR exposure ( $p = 0.004$ ).

### Differences in the distribution of lung T cell subpopulations

Total lung cells were isolated by enzymatic digestion with collagenase and the T cell subpopulation were examined by flow cytometry. In saline-treated control mice, the CD4/CD8 T cell ratio (as well as the percent of lymphocytes) was always higher in the BALB/c



**Fig. 1.** Histology of lung damage following intranasal inhalation of saline or *S. rectivirgula*. (A) BALB/c mice treated with saline; (B) BALB/c mice treated with *S. rectivirgula* during 3 weeks and sacrificed 1 day after the last antigen administration; (C) BALB/c mice treated with *S. rectivirgula* during 3 weeks and sacrificed 4 days after the last exposure; (D) C57BL/6 mice treated with saline; (E): C57BL/6 mice treated with *S. rectivirgula* during 3 weeks, sacrificed 1 day after the last antigen administration; (F) C57BL/6 mice treated with *S. rectivirgula* during 3 weeks, sacrificed 4 days after the last exposure. Representative histologic sections stained with haematoxylin and eosin, 10 $\times$ .



**Fig. 2.** Semi-quantitative evaluation of the extent of lung damage. BALB/c (A) and C57BL/6 (B) were treated with *S. rectivirgula* or saline during 3 weeks and sacrificed 1 and 4 days after the last antigen exposure. Each symbol represents one animal. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. No lesions were observed in saline-treated mice. A significant decrease in the percentage of lung damage was observed in BALB/c mice when sacrificed at day 4, while a significant progression was noticed in the C57BL/6. All experiments were performed by triplicate.

compared with the C57BL/6 strain (Table 1). After SR exposure, a significant increase of the CD4/CD8 T cell ratio was found in mice from both strains sacrificed 1 day after the last SR administration, although the ratio was higher in the BALB/c mice. At 4 days the CD4/CD8 ratio decreased reaching normal values in the BALB/c mice, and remained marginally but significantly higher in the C57BL/6 mice.

Levels of NKT cells are shown in Fig. 3A and Table 2. A significant increase was observed in the SR-treated BALB/c ( $p=0.0007$ ) and C57BL/6 ( $p=0.0007$ ) mice when sacrificed at 1 day with a decrease when sacrificed at day 4. However, some differences were observed in NKT cell subsets, Table 2. C57BL/6 mice sacrificed at 1 day, showed an increase of NKT CD4+ cells ( $83.6 \pm 6.9\%$ ) compared with control mice ( $54.9 \pm 7.0\%$ ;  $p=0.0007$ ). Under the same experimental condition, an increase in NKT DN cells was noticed in BALB/c mice ( $30.5 \pm 2.7\%$  versus  $18.8 \pm 3.9$  in non-treated mice;  $p=0.0007$ ). In both strains, a decrease of NKT CD8+ cells at day 1 was also observed (BALBc:  $p=0.001$ ; C57BL/6:  $p=0.0007$ ). When mice were sacrificed at 4 days, an increase in the NKT CD4+ subset was observed in BALB/c ( $34.3 \pm 2.9\%$ ,  $p=ns$ ) and C57BL/6 ( $75.5 \pm 7.8\%$ ,  $p=0.02$ ) mice, with a significant decrease in the percentage of NKT DN cells ( $p=0.008$ ) (Table 2).

Also a significant increase of NK cells was detected in BALB/c mice at 1 day ( $15.8 \pm 2.6\%$  versus  $2.3 \pm 0.2\%$ ;  $p=0.0007$ ) and 4 days ( $15.1 \pm 0.6\%$  versus  $3.1 \pm 0.1\%$ ;  $p=0.008$ ) after the last antigen administration. By contrast, no changes were observed in the C57BL/6 strain (Fig. 3B and Table 2).

The distribution of  $\gamma\delta$  T cells in BALB/c and C57BL/6 strains are also shown in Fig. 3C and F. A significant increase of  $\gamma\delta$ T cells was observed in both BALBc and C57BL/6 mice after SR instillation, although the rise was higher in the BALB/c mice.

*Th1/Th2 cytokine levels in BAL*

A significant increase in the levels of TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, and IL-12 was observed in the BAL fluids from both C57BL/6 and BALB/c strains treated with the *Saccharopolyspora rectivirgula* during 3 weeks and sacrificed 1 day after the last exposure (Table 3). All the cytokines return to the normal levels in mice sacrificed at 4 days. Interestingly, the only difference that we found between both strains was in the



**Table 1**  
BAL cell profile in BALB/c and C57BL/6 mice after 3 weeks of exposure to *Saccharopolyspora rectivirgula*.

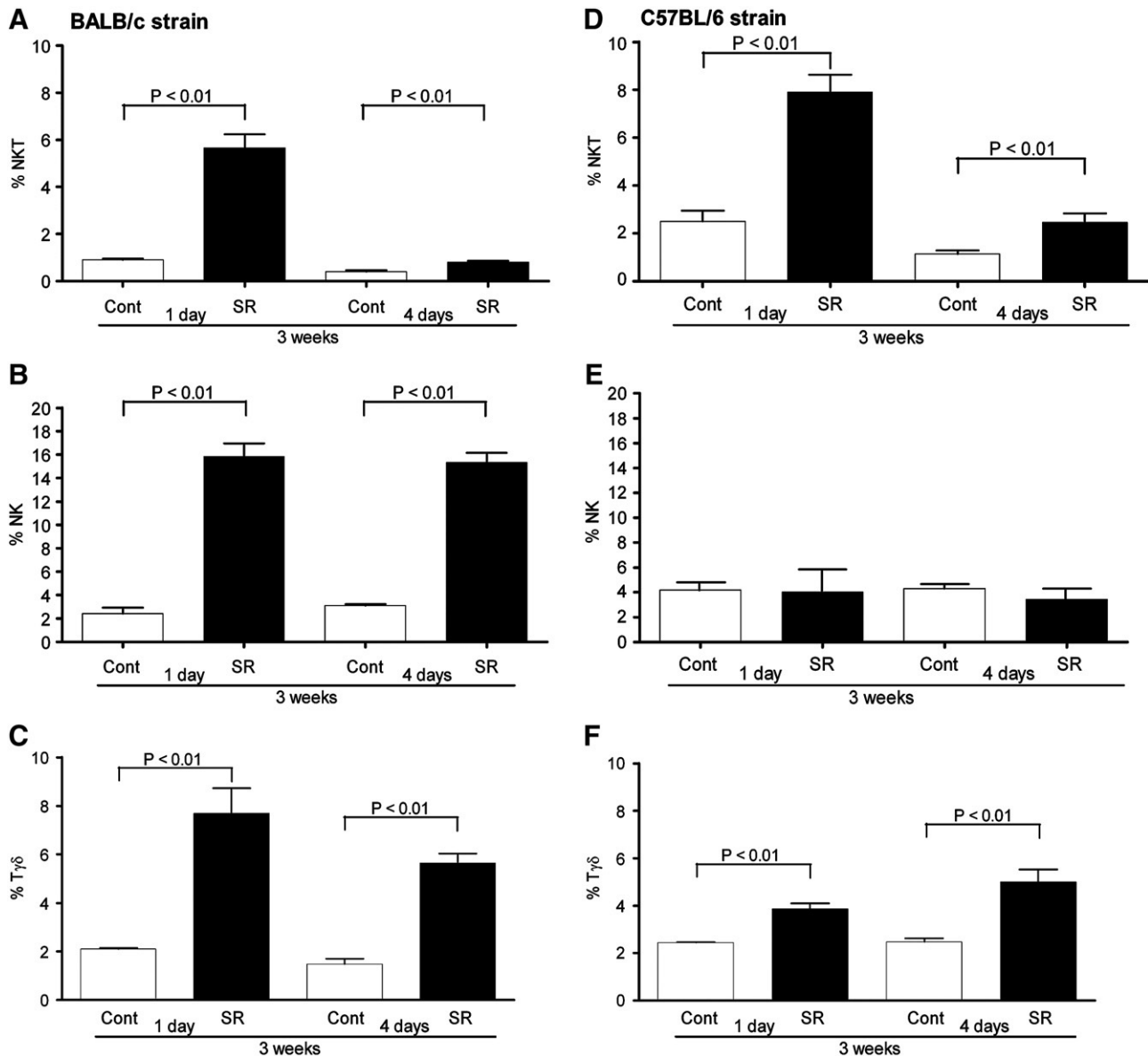
	BALB/c				C57BL/6			
	1 day		4 days		1 day		4 days	
	Control	SR	Control	SR	Control	SR	Control	SR
Total cell count ( $1 \times 10^6$ cells/ml)	1.5 $\pm$ 0.2	13.7 $\pm$ 1.8*	1.5 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 0.8*	1.6 $\pm$ 0.2	4.4 $\pm$ 0.2**	1.0 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.3
Macrophages (%)	90.8 $\pm$ 9.1	30.2 $\pm$ 18.6#	88.2 $\pm$ 1.8	66.8 $\pm$ 6.1*	96.3 $\pm$ 2.7	75.0 $\pm$ 10.7*	97.0 $\pm$ 2.7	86.0 $\pm$ 10.7
Neutrophils (%)	0.5 $\pm$ 0.8	60.4 $\pm$ 24.4#	0.2 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 2.0	12.6 $\pm$ 10.1#	0.8 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 1.5
Eosinophils (%)	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Lymphocytes (%)	8.3 $\pm$ 8.2	9.4 $\pm$ 7.0	10.7 $\pm$ 1.8	31.6 $\pm$ 5.9*	2.3 $\pm$ 0.5	12.4 $\pm$ 4.2**	2.2 $\pm$ 2.6	12.4 $\pm$ 10.0

SR: *Saccharopolyspora rectivirgula*.

\*  $p = 0.004$ .

\*\*  $p = 0.04$ .

#  $p = 0.008$ .



**Fig. 3.** Percentage of NKT, NK and  $\gamma\delta$ T cells obtained from lung tissue. BALB/c (A, B, C) and C57BL/6 (D, E, F) mice were exposed to saline or *S. rectivirgula* during 3 weeks and sacrificed 1 and 4 days after the last antigen exposure. Total cells were isolated from the left lung by enzymatic digestion, stained, and analyzed by flow cytometry. All experiments were performed by triplicate.

**Table 2**  
NK and NKT subpopulations in BALB/c and C57BL/6 mice after 3 weeks of exposure to *Saccharopolyspora rectivirgula*.

Cell subpopulation	BALB/c				C57BL/6			
	1 day		4 days		1 day		4 days	
	Control	SR	Control	SR	Control	SR	Control	SR
CD4/CD8 ratio	3.6	11.3	2.9	3.4	1.8	5.6	1.8	3.7
NK%	2.3 ± 0.2	15.8 ± 2.6*	3.1 ± 0.1	15.1 ± 0.6#	4.2 ± 0.6	4.0 ± 1.8	4.3 ± 0.2	3.4 ± 0.7
NKT%	0.9 ± 0.1	5.8 ± 1.7*	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1+	2.5 ± 1.1	7.9 ± 2.1*	1.1 ± 0.3	2.5 ± 0.9§
NKT CD4+%	60.8 ± 6.0	64.3 ± 4.7	20.0 ± 1.1	34.3 ± 2.9	54.9 ± 7.0	83.6 ± 6.9*	59.8 ± 4.6	75.5 ± 7.8§
NKT CD8+%	20.4 ± 4.9	5.2 ± 3.7**	47.7 ± 2.8	36.7 ± 9.5	31.7 ± 5.8	4.5 ± 5.9*	17.2 ± 8.0	8.5 ± 5.0
NKT DN%	18.8 ± 3.9	30.5 ± 2.7*	32.2 ± 2.5	30.0 ± 9.0	13.4 ± 4.7	11.9 ± 4.9	21.6 ± 5.4	9.0 ± 3.4#

SR: *Saccharopolyspora rectivirgula*.

NK: natural killer.

NKT: natural killer T cells.

\*  $p = 0.0007$ .

\*\*  $p = 0.001$ .

#  $p = 0.008$ .

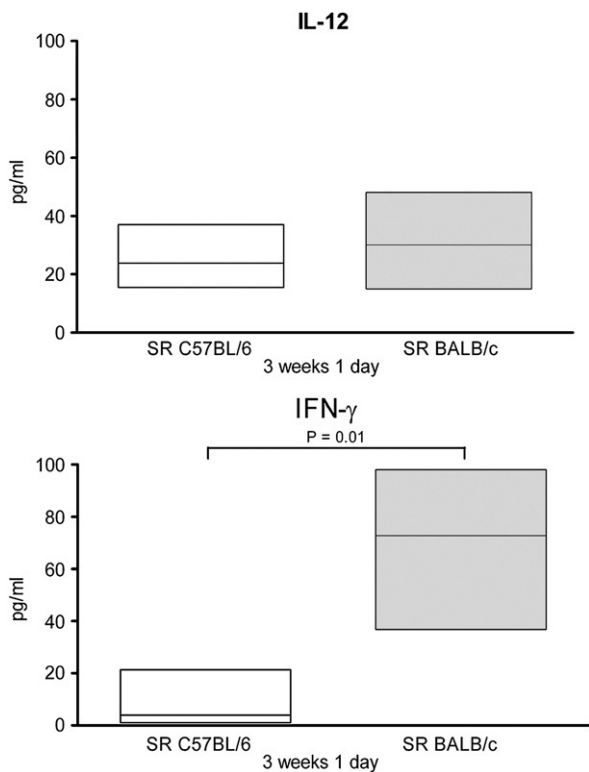
+  $p = 0.04$ .

§  $p = 0.02$ .

**Table 3**  
Cytokine levels (pg/mL ± SD) in BAL obtained from C57BL/6 and BALB/c mice.

Cytokine	C57BL/6			BALB/c		
	Control	SR 1 day	SR 4 days	Control	SR 1 day	SR 4 days
IL-12	6.8 ± 3.7	23.8 ± 8.9*	5.9 ± 4.2	4.8 ± 3.8	30.1 ± 12.5*	3.7 ± 2.8
GM-CSF	12.0 ± 3.3	22.2 ± 11.5*	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	40.5 ± 14.3*	1.0 ± 0.0
IFN-γ	33.3 ± 29.9	3.9 ± 7.7*	9.9 ± 15.4*	7.6 ± 11.4	72.8 ± 25.1*	1.0 ± 0.0
TNF-α	87.5 ± 12.8	476.1 ± 552.8*	56.9 ± 33.4	207.8 ± 138.9	667.4 ± 621.5*	56.9 ± 40.7
IL-2	1.8 ± 2.4	21.4 ± 20.2*	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.3	17.0 ± 11.6*	0.5 ± 0.4
IL-4	9.9 ± 8.9	21.9 ± 12.6*	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.0	21.9 ± 10.1*	4.0 ± 0.9
IL-5	51.4 ± 39.8	64.7 ± 23.0	7.1 ± 3.6*	10.8 ± 1.8	85.4 ± 53.2*	12.2 ± 4.9
IL-10	26.2 ± 0.7	91.6 ± 45.4*	23.9 ± 6.9	50.5 ± 31.4	108.9 ± 37.6*	18.7 ± 25.1

\* Statistically significant  $p$  values ( $p < 0.05$ ) obtained with the Mann–Whitney  $U$  test when compared with the values in non-treated control mice.

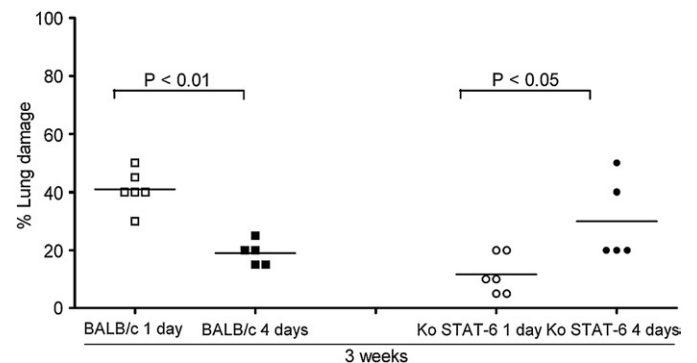


**Fig. 4.** Levels of IL-12 and IFN-γ in BAL from C57BL/6 and BALB/c mice treated with *S. rectivirgula*. Median values ± SD are shown. No differences in the levels of IL-12 were observed between both strains. A significant increase in the IFN-γ levels was detected in the SR-treated BALB/c mice when compared with C57BL/6 ( $p = 0.01$ ).

levels of IFN-γ that were significantly higher in the BALB/c (Fig. 4;  $p = 0.01$ ). By contrast, no differences were found in IL-12 (Fig. 4).

*BALB/c Stat6*−/− mice develop comparable lung damage to C57BL/6 strain

To further investigate the role of the Th2-bias of BALB/c mice in the inflammatory response, we compared the extent of the lung lesions and the T cell subpopulations in the wild-type and Th2 deficient mice exposed during 3 weeks to SR. *Stat6*−/− BALB/c mice showed a progressive increase in the extent of lung damage (from  $13.3 ± 11.7%$  at 1 day to  $30.0 ± 14.1%$  at 4 days;  $p = 0.03$ ). By contrast, a significant decrease of the extent of the lesions was confirmed in the wt BALB/c mice ( $p = 0.004$ ) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Extent of lung damage in BALB/c wild-type and BALB/c Th2 deficient (Ko STAT-6) mice. Animals were exposed to *S. rectivirgula* during 3 weeks and sacrificed 1 and 4 days after the last exposure. *Stat6*−/− BALB/c mice showed a progressive increase in the extent of lung damage at 1 day compared with 4 days after the last SR exposure ( $p < 0.05$ ). All experiments were performed by triplicate. Each symbol represents one animal.

**Table 4**  
BAL cell profile in BALB/c and BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> mice after 3 weeks of exposure to *Saccharopolyspora rectivirgula*.

	WT BALB/c				BALB/c <i>Stat6</i> <sup>-/-</sup>			
	1 day		4 days		1 day		4 days	
	Control	SR	Control	SR	Control	SR	Control	SR
Total cell count ( $1 \times 10^6$ cells/ml)	1.3 ± 0.1	13.0 ± 0.1*	1.9 ± 0.5	5.2 ± 1.1***	0.7 ± 0.0	5.2 ± 0.8***	0.6 ± 0.1	3.1 ± 0.1#
Macrophages (%)	85.0 ± 4.9	35.0 ± 13.3**	89.5 ± 5.4	56.7 ± 3.1#	97.0 ± 3.0	82.0 ± 2.9	97.3 ± 2.1	87.8 ± 4.1
Neutrophils (%)	2.0 ± 1.5	55.0 ± 11.9**	0.3 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.0 ± 1.2	9.5 ± 5.7**	1.0 ± 1.0	8.0 ± 0.2**
Eosinophils (%)	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Lymphocytes (%)	12.0 ± 3.5	9.0 ± 3.5	10.2 ± 5.0	42.5 ± 3.6#	2.0 ± 2.1	8.5 ± 4.2**	1.7 ± 2.1	4.2 ± 4.1

SR: *Saccharopolyspora rectivirgula*.

\*  $p = 0.004$ .

\*\*  $p = 0.008$ .

\*\*\*  $p = 0.009$ .

#  $p = 0.04$ .

Total BAL cells obtained from the Th2 deficient mice treated with SR and sacrificed either at 1 or 4 days after the last antigen administration was significantly lower compared with the wt BALB/c mice (Table 4). Likewise, Th2 deficient mice showed a lower increase of neutrophils at 1 day after the last administration (SR-treated:  $9.5 \pm 5.7\%$  versus control:  $1.0 \pm 1.2\%$ ,  $p = 0.008$ ) compared with the wt mice (SR-treated:  $55.0 \pm 11.9\%$  versus control:  $2.0 \pm 1.5\%$ ,  $p = 0.008$ ), and a lower increase of lymphocytes when sacrificed 4 days (SR-treated:  $4.2 \pm 4.1\%$  versus control:  $1.7 \pm 2.1\%$ ,  $p = \text{non-significant}$ ) compared with the wt BALB/c mice (SR-treated:  $42.5 \pm 3.6\%$  versus control:  $10.2 \pm 5.0\%$ ,  $p = 0.04$ ).

The percentage of lung-specific NKT cells was considerably higher in controls (non-antigen exposed) *Stat6*<sup>-/-</sup> mice ( $9.5 \pm 1.1\%$ ) compared with controls wt BALB/c mice ( $0.9 \pm 0.1\%$ ) (Table 5, Fig. 6A). These high levels remained without changes after SR exposure. Most of the NKT cells in control *Stat6*<sup>-/-</sup> mice were CD8+ ( $83.2 \pm 1.6\%$ ), that decreased significantly after SR challenge (1 day:  $24.6 \pm 3.6\%$ ,  $p = 0.0007$ ; and 4 days:  $41.0 \pm 7.7\%$ ;  $p = 0.04$ ). In contrast, NKT CD4+ cells were increased at 1 day ( $39.1 \pm 8.1\%$ ,  $p = 0.04$ ) and 4 days ( $44.6 \pm 5.1\%$ ,  $p = 0.04$ ) when compared with control mice. WT mice showed an increase of the NKT DN at 1 day ( $p = 0.004$ ) and of NKT CD4+ at 4 days.

*Stat6*<sup>-/-</sup> deficient mice also exhibited high levels on NK cells in control animals without changes after SR exposure. By contrast, BALB/c wt mice displayed a significant increase at 1 and 4 days after antigen challenge (Table 5, Fig. 6B). Finally, a significant increase  $\gamma\delta$  T cells, was observed in both *Stat6*<sup>-/-</sup> and wt BALB/c mice after antigen exposure (Fig. 6C).

### mRNA *IFN- $\gamma$* , *IL-4* and *GATA-3* expression

The expression of *IFN- $\gamma$* , *IL-4* and *GATA3* transcription factor was evaluated by RT-PCR. *IFN- $\gamma$*  mRNA was significantly overexpressed in the lung tissue of the *Stat6*<sup>-/-</sup> BALB/c mice compared with treated and non-treated wt BALB/c mice ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 7A). The expression of *IFN- $\gamma$*  was increased in the wt 1 and 4 days after the last antigen exposure ( $p = 0.03$ ), while a non-significant tendency was observed in the knockout. The levels of *IL-4* were undetectable in all strains of BALB/c mice. *GATA3* mRNA levels were notably higher in the control *Stat6*<sup>-/-</sup> mice compared with the non-treated wt BALB/c mice ( $p = 0.002$ ), and did not change significantly after SR exposure in the KO mice (Fig. 7B). *GATA3* was practically undetectable in the lung of saline-treated wt mice but was significantly upregulated after antigen exposure ( $p = 0.03$ ).

### Discussion

Several studies have indicated that Th1 immunity mediates the development to HP in both experimental animals and humans (Barrera et al., 2008; Yamasaki et al., 1999; Butler et al., 2002). However, Th1 to Th2 switching appears to be determinant in the progression of the inflammation to fibrosis that characterized chronic cases of HP (Barrera et al., 2008; Pardo and Selman, 2002). These observations suggest that *IFN- $\gamma$*  mediated immunity might be essential in the maintenance of the inflammatory process in initial stages with a significant involvement of the Th2 responses in

**Table 5**  
NK and NKT subpopulations in BALB/c and BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> mice after 3 weeks of exposure to *Saccharopolyspora rectivirgula*.

Cell subpopulation	WT BALB/c				BALB/c <i>Stat6</i> <sup>-/-</sup>			
	1 day		4 days		1 day		4 days	
	Control	SR	Control	SR	Control	SR	Control	SR
CD4/CD8 ratio	3.5	9.9	3.2	4.1	7.3	9.6	4.2	6.8
NK%	2.0 ± 0.5	14.6 ± 3.2*	2.7 ± 0.3	16.2 ± 1.3**	11.6 ± 2.8	13.0 ± 2.9	11.8 ± 2.7	10.7 ± 3.5
NKT%	0.9 ± 0.1	4.2 ± 0.2**	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2	9.5 ± 1.1	9.0 ± 2.5	11.0 ± 1.1	10.4 ± 3.3
NKT CD4+%	54.8 ± 1.2	51.6 ± 1.2	20.4 ± 0.5	33.9 ± 0.8	9.9 ± 0.4	39.1 ± 8.1§	12.5 ± 7.6	44.6 ± 5.1§
NKT CD8+%	28.3 ± 1.1	12.4 ± 1.8#	46.9 ± 0.9	35.9 ± 0.9*	83.2 ± 1.6	24.6 ± 3.6**	83.5 ± 11.4	41.0 ± 7.7§
NKT DN%	14.0 ± 2.7	36.0 ± 1.7+	30.4 ± 1.6	27.7 ± 2.5	6.3 ± 1.9	22.9 ± 6.4+	0.1 ± 0.1	7.9 ± 3.4*

SR: *Saccharopolyspora rectivirgula*.

NK: natural killer.

NKT: natural killer T cells.

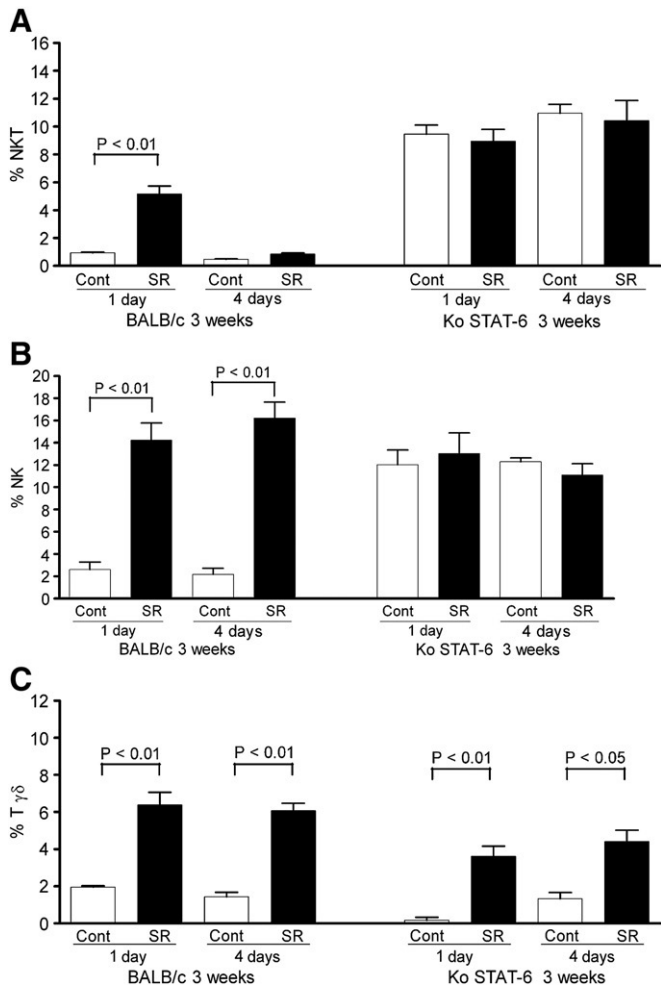
\*  $p = 0.008$ .

\*\*  $p = 0.0007$ .

#  $p = 0.02$ .

+  $p = 0.004$ .

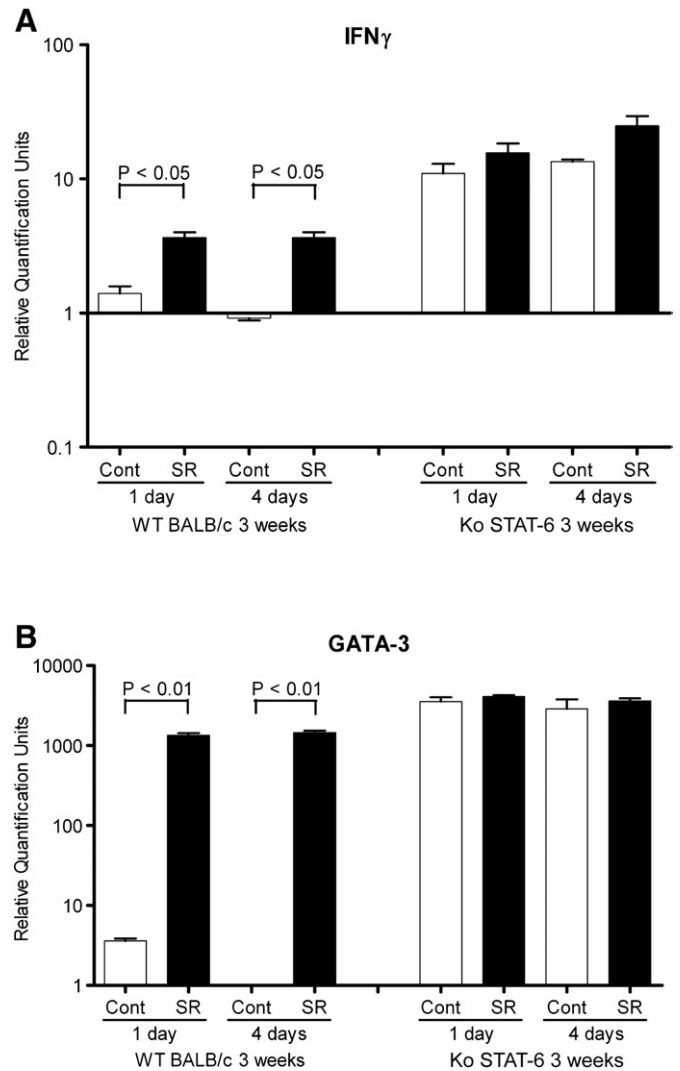
§  $p = 0.04$ .



**Fig. 6.** Levels of NKT (A) NK (B) and  $\gamma\delta$ T cells (C) in BALB/c wt and BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> (Ko STAT-6) mice. Animals were exposed to saline or *S. rectivirgula* during 3 weeks and sacrificed 1 and 4 days after the last exposure. Total cells were isolated from the left lung by enzymatic digestion, stained, and analyzed by flow cytometry. All experiments were performed by triplicate.

the attenuation of the inflammation while in late stages Th2 predominance contributes to the induction of pro-fibrotic factors. However, despite the fact that HP is considered a Th1-mediated disease, low levels of IFN- $\gamma$  in lung and lack of expression of IFN- $\gamma$  in T cells of SR-treated mice have been recently described (Simonian et al., 2009).

Our results showed important differences in the kinetics of the lung damage between C57BL/6 mice (Th1-biased) and BALB/c mice (Th2-biased). Thus, while a significant increase in the extent of lung lesions was observed in the C57BL/6 mice the opposite response was observed in the BALB/c mice. We also found that Th2 deficient mice (*Stat6*<sup>-/-</sup>) with BALB/c background behave similar to the C57BL/6 mice exhibiting a progressive lung damage. Interestingly, control *Stat6*<sup>-/-</sup> mice had a several fold increase of IFN- $\gamma$  mRNA in lung compared with control wild-type BALB/c. Similar results have been reported with GATA3 over-expressing mice. GATA3 induces Th2 development and inhibit the differentiation of Th1 cells that is essential in airway hyperresponsiveness (Yamashita et al., 2004; Yamashita et al., 2006; Finotto et al., 2001). In contrast, the up-regulation of GATA3 has protective role of in the development of HP in C57BL/6 mice through the enhancing of Th2 responses and suppressing IFN- $\gamma$  production (Matsuno et al., 2007). In our study the expression of GATA3 was virtually absent in the control BALB/c mice



**Fig. 7.** Lung expression levels of IFN- $\gamma$  in BALB/c wt and BALB/c *Stat6*<sup>-/-</sup> (Ko STAT-6) mice. Animals were exposed to saline or *S. rectivirgula* during 3 weeks and sacrificed 1 and 4 days after the last exposure. Gene expression was analyzed by real time RT-PCR and the values were normalized to GAPDH and then presented as relative change in comparison to the untreated calibrator sample in relative quantification (RQ) units. All experiments were performed by triplicate.

and was highly upregulated after antigen exposure while *Stat6*<sup>-/-</sup> deficient mice exhibited higher GATA3 expression without changes between controls and SR-treated mice.

Our results regarding BAL cytokine levels revealed that SR treatment induced the lung overexpression of both Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12, and IFN- $\gamma$ ) and Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-10) in both strains. Interestingly, these cytokines were elevated 1 day after SR exposure but return to normal levels at 4 days, indicating a rapid and reversible response to the antigen. Control C57BL/6 mice showed higher levels of IFN- $\gamma$  but without a further increase after SR challenge. In contrast, antigen exposure provoked a significant increase of this cytokine in the BALB/c that correlated with the higher extent of lung damage observed in the mice sacrificed 1 day after exposure. These results are consistent with previous findings that also showed that Th-1 bias mice treated with SR expressed very low levels of IFN- $\gamma$  in the lungs after two weeks of SR exposure (Simonian et al., 2009). On the other hand, it has been suggested that Th2 cytokines modulate the severity of HP in inbred strains of mice (Butler et al., 2002). We did not find differences in the levels of IL-4,

IL-5 and IL-10 between the two strains, although a significant increase was observed when compared with the non-treated littermates.

Previous reports have revealed that HP patients exhibit different phenotypic and functional T cell subsets depending on the clinical stage of the disease (Barrera et al., 2008). In the present study, several differences were noticed between C57BL/6 and BALB/c mice. One of them was related to the NK cell population which was significantly increased in BALB/c after 1 and 4 days of SR exposure, while no change was observed in the C57BL/6 mice. Likewise, a higher increase of  $\gamma\delta$  T cells was observed also in the BALB/c wt mice. The putative relationships between these findings and a better control of lung damage are presently unknown but NK and  $\gamma\delta$  T cells play an important role in the innate immune response against infected and transformed cells and have been implicated in the regulation of the lung inflammation. For example, it has been shown that  $\gamma\delta$  T cells increases in the lung after intratracheal infection with *Cryptococcus neoformans*, and its depletion reduces the time of clearance. These results suggest that  $\gamma\delta$  T cells play a regulatory role during the infection down-modulating the Th1 inflammatory response (Uezu et al., 2004). Likewise, following challenge with *B. pertussis*,  $\gamma\delta$  TCR $^{-/-}$  mice exhibited greater pulmonary inflammation compared with the wild-type animals, suggesting a regulatory influence for  $\gamma\delta$  T cells over the early pulmonary inflammatory response to bacterial infection. (Zachariadis et al., 2006). A similar effect may be proposed in our model. Additionally, intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells are important in tissue repair through the production of cytokines and growth factors. These cells recognize stress-induced self-antigens which would enable a homogeneous population of  $\gamma\delta$  T cells to monitor epithelial injury (Holtmeier, 2003). Functional assays in mice have also demonstrated that  $\gamma\delta$  T cells exert a protective antifibrotic role (Simonian et al., 2006). In this regard, we have observed decreased numbers of  $\gamma\delta$  T cells in chronic but not in subacute HP (Barrera et al., 2008), suggesting an important role of these cells in the regulation of the inflammation in HP. Regarding NK cells, studies have demonstrated that IL-4 stimulated NK cells may provoke abnormalities in the maturation of dendritic cells, possibly inducing a Th2 response and immune tolerance (Marcenaro et al., 2005). In contrast, IL-12 stimulated NK cells produce IFN- $\gamma$  and promote dendritic cell maturation and Th1 responses. The exposure of NK cells to Th1 or Th2 cytokines in early stages of immune responses appear to be important in the regulation of NK cell mediated responses.

Differences were also found in the natural killer T cells and its different subsets. Although an increase of the lung NKT cells was observed both in BALB/c and C57BL/6 mostly when the mice were sacrificed at 1 day after SR exposure, the increase in BALB/c was predominantly noticed in the DN NKT cells while in the C57BL/6 were mainly in the CD4 $^{+}$  NKT cells. In both strains a decrease of CD8 $^{+}$  NKT cells was observed. On the other hand, control *Stat6* $^{-/-}$  mice showed a significantly high percentage of NKT cells without changes after SR challenge. These mice also displayed an increase of the CD4 $^{+}$  NKT subpopulation but also in the DN NKT subset after challenge. It is well known that NKT cells play an important role in the host response to a broad range of respiratory infections because of their rapidity of response and bridging role between innate and adaptive immunity (Boyton, 2008). Studies in mice models have suggested that NKT cells contributes to the protection for the development of HP through the production of Th2 cytokines resulting in a reduction of the recruitment of neutrophils and in the production of IFN- $\gamma$  (Gudmundsson et al., 1998). Also, an important role of NKT cells in the attenuation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis has been described (Kim et al., 2001).

A growing body of evidence suggests that CD4 $^{+}$  and DN (CD4 $^{-}$ , CD8 $^{-}$ ) NKT cells have different functional capabilities regarding the induction of Th1 and Th2 responses. Thus, functional studies stimulating NKT cells with  $\alpha$ -galactosylceramide have demonstrated that dendritic cells react with CD4 $^{+}$  NKT cells to induce Th1

polarization whereas dendritic cells stimulated with DN NKT cells encourage Th2 responses (Liu et al., 2008).

## Conclusion

Our results demonstrates significant differences in the lung damage progression and T cell subpopulations, between Th1 and Th2 biased mice treated with *Saccharopolyspora rectivirgula* derived antigens. In this context, Th2 biased mice (BALB/c) have a tendency to control the extent of the lung lesions whereas Th1 biased mice and Th2 knockout mice have a trend to increase the damage, possibly due to the lack of an efficient Th2 anti-inflammatory effect. However, further functional studies are needed to corroborate the putative role of DN NKT cell subset, regulatory NK (IL-4 sensitized) and  $\gamma\delta$  T cells in this response.

## Acknowledgments

This study was supported by Grant Conacyt no. 89927 and by Universidad Nacional Autónoma de México, Grant SDI.PTID.05.6

## References

- Barrera, L., et al., 2008. Functional diversity of T cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 44–55.
- Boyton, R., 2008. The role of natural killer T cells in lung inflammation. *J. Pathol.* 214, 276–282.
- Butler, N.S., et al., 2002. Altered IL-4 mRNA stability correlates with Th1 and Th2 bias and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *J. Immunol.* 169, 3700–3709.
- Denis, M., 1995. Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 164–169.
- Finotto, S., et al., 2001. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J. Exp. Med.* 193, 1247–1260.
- Ghadirian, E., Denis, M., 1992. Murine hypersensitivity pneumonitis: interleukin-4 administration partially abrogates the disease process. *Microb. Pathog.* 2, 377–382.
- Gudmundsson, G., Hunninghake, G., 1997. Interferon- $\gamma$  is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Invest.* 99, 2386–2390.
- Gudmundsson, G., et al., 1998. IL-12 modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J. Immunol.* 161, 991–999.
- Hagood, J.S., et al., 2005. Loss of fibroblast Th1-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 167, 365–379.
- Holtmeier, W., 2003. Compartmentalization gamma/delta T cells and their putative role in mucosal immunity. *Crit. Rev. Immunol.* 23, 473–488.
- Hwang, S.J., et al., 2006. IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-gamma-producing neutrophils. *J. Immunol.* 177, 5258–5268.
- Kim, J., et al., 2001. Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon- $\gamma$ . *Am. J. Pathol.* 167, 1231–1241.
- Lacasse, Y., et al., 2003. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 952–958.
- Liu, T.Y., et al., 2008. Distinct subsets of human invariant NKT cells differentially regulate T helper responses via dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 1012–1023.
- Marcenaro, E., et al., 2005. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J. Immunol.* 174, 3992–3998.
- Matsuno, Y., et al., 2007. Overexpression of GATA-3 protects against the development of hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 1015–1025.
- Nance, S., et al., 2005. IFN- $\gamma$  production by innate immune cells is sufficient for development of hypersensitivity pneumonitis. *Eur. J. Immunol.* 35, 1928–1938.
- Pan, L.H., et al., 2000. Inhibition of binding of E- and P-selectin to sialyl-Lewis X molecule suppresses the inflammatory response in hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1689–1697.
- Pardo, A., Selman, M., 2002. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front. Biosci.* 7, 1743–1761.
- Pardo, A., et al., 2000. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1698–1704.
- Pardo, A., et al., 2003. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 925–932.
- Schuyler, M., et al., 1997. Th1 CD4 $^{+}$  cells adoptively transfer experimental hypersensitivity pneumonitis. *Cell. Immunol.* 177, 169–175.
- Selman, M., 2004. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin. Chest Med.* 25, 531–547.
- Simonian, P.L., et al., 2006. Regulatory role of  $\gamma\delta$  T cells in the recruitment of CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T cells to lung and subsequent pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 177, 4436–4443.
- Simonian, P.L., et al., 2009. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *J. Immunol.* 182, 657–665.
- Uezu, K., et al., 2004. Accumulation of  $\gamma\delta$  T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 172, 7629–7634.



- Yamasaki, H., et al., 1999. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J. Immunol.* 163, 3516–3523.
- Yamashita, M., et al., 2004. Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J. Biol. Chem.* 279, 26983–26990.
- Yamashita, N., et al., 2006. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L1045–L1051.
- Zachariadis, O., et al., 2006. Gammadelta T cells regulate the early inflammatory response to bordetella pertussis infection in the murine respiratory tract. *Infect. Immun.* 74, 1837–1845.