



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

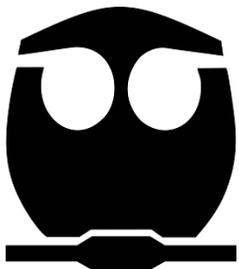
BALANCE DE LA RESPUESTA PRO Y ANTI-INFLAMATORIA, MEDIADA POR  
CÉLULAS TCD4<sup>+</sup> Y SU POSIBLE RELEVANCIA EN LA  
INMUNOPATOGENESIS DE LA EPOC

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DIANA TORRES GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: M en C. José Ignacio Paramo Ramírez

VOCAL: Profesor: Dr. Guillermo Cardoso Saldaña

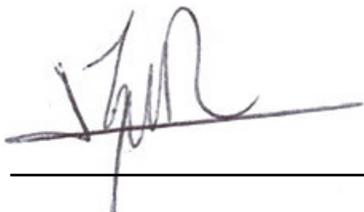
SECRETARIO: Profesor: Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos

1er SUPLENTE: Profesor: Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

2do SUPLENTE: Profesor: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Inmunobiología y Genética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas, INER.

ASESOR DEL TEMA:



---

Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos.

SUSTENTANTE:



---

Diana Torres García.

**BALANCE DE LA RESPUESTA PRO Y ANTI-INFLAMATORIA,  
MEDIADA POR CÉLULAS TCD4<sup>+</sup> Y SU POSIBLE RELEVANCIA EN LA  
INMUNOPATOGÉNESIS DE LA EPOC**

**CONTENIDO**

<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
1.1 Etiología de la EPOC	<b>8</b>
1.2 Aspectos Clínicos de la EPOC	<b>11</b>
1.2.1 Alteraciones en la tráquea y los bronquios.	<b>12</b>
1.2.2 Alteraciones en las vías aéreas periféricas	<b>13</b>
1.2.3 Alteraciones del parénquima pulmonar	<b>15</b>
1.2.4 Alteraciones de la vasculatura pulmonar	<b>17</b>
1.3 Epidemiología de la EPOC	<b>18</b>
1.3.1 Diagnóstico	<b>21</b>
1.4 Inmunopatogénesis de la EPOC	<b>24</b>
1.4.1 Posible relevancia de las células Th17 en la EPOC	<b>26</b>
1.4.2 Células Treg en la EPOC	<b>29</b>
<b>2. Planteamiento del Problema</b>	<b>33</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>35</b>
3.1 Objetivo general	<b>35</b>
3.2 Objetivos específicos	<b>35</b>

<b>4. Hipótesis</b>	<b>36</b>
<b>5. Diseño Experimental</b>	<b>37</b>
5.1 Población en estudio.	<b>37</b>
<b>6. Métodos</b>	<b>39</b>
6.1 Muestras	<b>39</b>
6.2 Obtención de células mononucleares (CMN)	<b>39</b>
6.3 Determinación de proporciones de subpoblaciones de células TCD4 <sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg) por citometría de flujo	<b>41</b>
6.3.1 Tinción de moléculas de superficie	<b>41</b>
6.3.2 Tinción intracelular	<b>42</b>
6.3.3 Análisis de las proporciones de subpoblaciones de linfocitos TCD4 <sup>+</sup>	<b>44</b>
6.4 Ensayos <i>in vitro</i> del efecto de la exposición al humo de tabaco en CMN	<b>46</b>
6.4.1 Preparación del extracto de humo de tabaco	<b>46</b>
6.5 Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por Luminex	<b>48</b>
6.6 Análisis estadístico	<b>49</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>50</b>
7.1 Determinación de proporciones de subpoblaciones de células TCD4 <sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg) en sangre periférica.	<b>51</b>
7.2 Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en suero	<b>53</b>
7.3 Ensayos <i>in vitro</i> del efecto de la exposición al humo de tabaco en CMN	<b>56</b>

7.3.1	Determinación de proporciones de células TCD4 <sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg)	<b>56</b>
7.3.2	Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en sobrenadantes de cultivos	<b>60</b>
7.3.2.1	Citocinas pro-inflamatorias	<b>60</b>
7.3.2.2	Citocinas anti-inflamatorias	<b>64</b>
7.3.2.3	Quimiocinas	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>Discusión</b>	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusión</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>Apéndices</b>	<b>77</b>
<b>11.</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Contenido	
<b>Figura 1.</b>	Principales componentes del sistema respiratorio	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b>	Bronquitis	<b>14</b>
<b>Figura 3.</b>	Enfisema pulmonar	<b>16</b>
<b>Figura 4.</b>	Estrategia de análisis fenotípico de subpoblaciones de células TCD4 <sup>+</sup>	<b>45</b>
<b>Figura 5.</b>	Distribución de subpoblaciones de células T CD4 <sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg) en sangre periférica	<b>52</b>
<b>Figura 6.</b>	Proporción de células Th1 (A) y Th2(B) estimuladas por la exposición a humo de tabaco en ensayos <i>in vitro</i>	<b>58</b>
<b>Figura 7.</b>	Proporción de células Th17(A) y Treg(B) estimuladas por la exposición a humo de tabaco en ensayos <i>in vitro</i>	<b>59</b>
<b>Figura 8.</b>	Citocinas pro-inflamatorias cuantificadas en el sobrenadante de cultivos de CMN expuestas a extracto de humo de tabaco	<b>63</b>
<b>Figura 9.</b>	Citocinas anti-inflamatorias cuantificadas en el sobrenadante de cultivos de CMN expuestas a extracto de humo de tabaco	<b>65</b>
<b>Figura 10.</b>	Quimiocinas cuantificadas en el sobrenadante de cultivos de CMN expuestas a extracto de humo de tabaco	<b>67</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Contenido
<b>Tabla 1.</b> Clasificación espirométrica de la gravedad de la EPOC	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas y demográficas	<b>50</b>
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en suero	<b>55</b>

# **BALANCE DE LA RESPUESTA PRO Y ANTI-INFLAMATORIA, MEDIADA POR CÉLULAS TCD4<sup>+</sup> Y SU POSIBLE RELEVANCIA EN LA INMUNOPATOGÉNESIS DE LA EPOC**

## **1. Introducción**

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por la limitación al flujo de aire, como resultado de la reducción del calibre en las vías respiratorias inferiores (bronquiolitis obstructiva) y la destrucción del parénquima pulmonar (enfisema) [1]. La limitación del flujo de aire por lo general es progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria pulmonar inducida, principalmente por la exposición al humo de tabaco y leña [1, 2], comúnmente usada para cocinar alimentos en zonas rurales; contribuyendo a la prevalencia de la EPOC en este sector poblacional.

En los últimos años, la prevalencia de la EPOC ha aumentado de manera significativa, sobre todo en poblaciones de edades avanzadas y en grupos económicamente marginados, convirtiendo a la EPOC en un problema de salud actual [3]. Las diferencias tanto en la etiología como en las manifestaciones clínicas, hacen necesario ampliar el conocimiento sobre la inmunopatogénesis de la EPOC, para implementar nuevos criterios de diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

## **1.1 Etiología de la EPOC**

Dentro de los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de la EPOC se encuentran: la exposición al humo de tabaco, infecciones del tracto respiratorio, hiper-reactividad bronquial y la exposición a gases producto de la combustión de material orgánico [1, 4].

De acuerdo a la ATS (American Thoracic Society) y la ERS (European Respiratory Society), el humo de tabaco es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de la EPOC [4]. Actualmente, se desconocen los mecanismos celulares y moleculares que inducen lesiones en tejido pulmonar, como resultado de la exposición a humo de tabaco. No obstante, se sabe que el estrés oxidativo generado por radicales libres, como p-benzosemiquinonas, contenidas en el humo de tabaco, generan daño tisular [5]. Además del estrés oxidativo, se sabe que el humo de tabaco induce el aumento en el infiltrado de neutrófilos y macrófagos activados, así como la apoptosis de células endoteliales y epiteliales [6, 7]. Estos eventos en conjunto, interfieren con la capacidad de reparación tisular y generan alteraciones en la función pulmonar; las cuales presentan una alta prevalencia en individuos fumadores, que además cuentan con una tasa de mortalidad asociada a EPOC, superior a los no fumadores [1, 4, 7, 8].

Actualmente se sabe que incluso, la exposición pasiva al humo de tabaco puede contribuir al desarrollo de la EPOC [9-11]. No obstante, es importante mencionar que no todos los fumadores desarrollan una EPOC clínicamente significativa, lo cual sugiere que existen factores genéticos e inmunológicos que podrían asociarse con diferencias en el riesgo individual para el desarrollo de esta enfermedad [4, 8, 12].

Como se mencionó con anterioridad, otro factor de riesgo asociado al desarrollo de la EPOC, son las infecciones del tracto respiratorio, las cuáles inducen lesiones en el tejido pulmonar que, a su vez, dan lugar a alteraciones fisiológicas, como disfunción ciliar, limitación al flujo de aire, hiperinflación, alteraciones del intercambio gaseoso e hipertensión pulmonar [4].

Además de la exposición al humo de tabaco, la exposición laboral a polvos orgánicos e inorgánicos, sustancias químicas y vapores, causan entre el 10 y el 20% de los síntomas o anomalías funcionales asociadas a la EPOC [4].

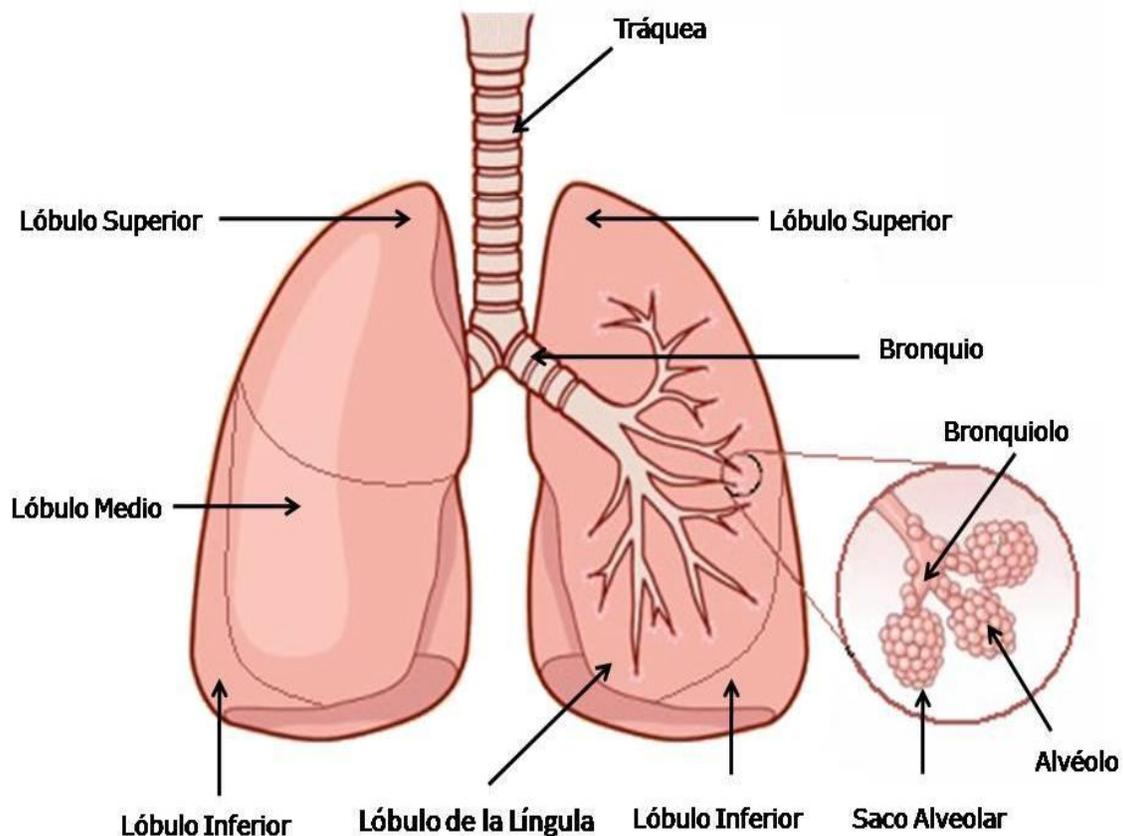
Adicionalmente la contaminación en espacios cerrados, por humo generado por la combustión de materiales inflamables como carbón o leña, utilizados para cocinar y calentar alimentos en áreas no ventiladas, son otro factor de riesgo que con frecuencia se asocia al desarrollo de la EPOC en mujeres jóvenes, habitantes de zonas rurales[12-14].

Se ha observado que las alteraciones relacionadas con la edad como inflamación crónica moderada, también pueden contribuir al desarrollo de enfisema mediante la disminución de la capacidad de reparación tisular [1, 4, 6].

El riesgo de desarrollar la EPOC surge de la interacción entre el individuo y el medioambiente. No obstante, se ha documentado que existe predisposición genética asociada a este padecimiento. El factor genético mejor documentado es el déficit hereditario de la enzima  $\alpha$ 1- antitripsina [15-19]. Ésta es una alteración recesiva autosómica poco frecuente, cuya prevalencia en Europa Occidental y Estados Unidos es de aproximadamente 1 por cada 2500 y 1 por cada 5000 recién nacidos, respectivamente, y es altamente dependiente del origen escandinavo de la población [19].

## 1.2 Aspectos Clínicos de la EPOC

Los cambios fisiológicos y los síntomas característicos de la EPOC son consecuencia de la presencia de alteraciones anatomopatológicas. La localización de estas modificaciones, es en: bronquios, bronquiolos, paredes alveolares y vasos pulmonares (Figura 1); pudiendo variar de individuo a individuo [4].



**Figura 1.** Principales componentes del sistema respiratorio.

[Modificado de: <http://www.encyclopediasalud.com/categorias/enfermedades/articulos/neumonía/>]

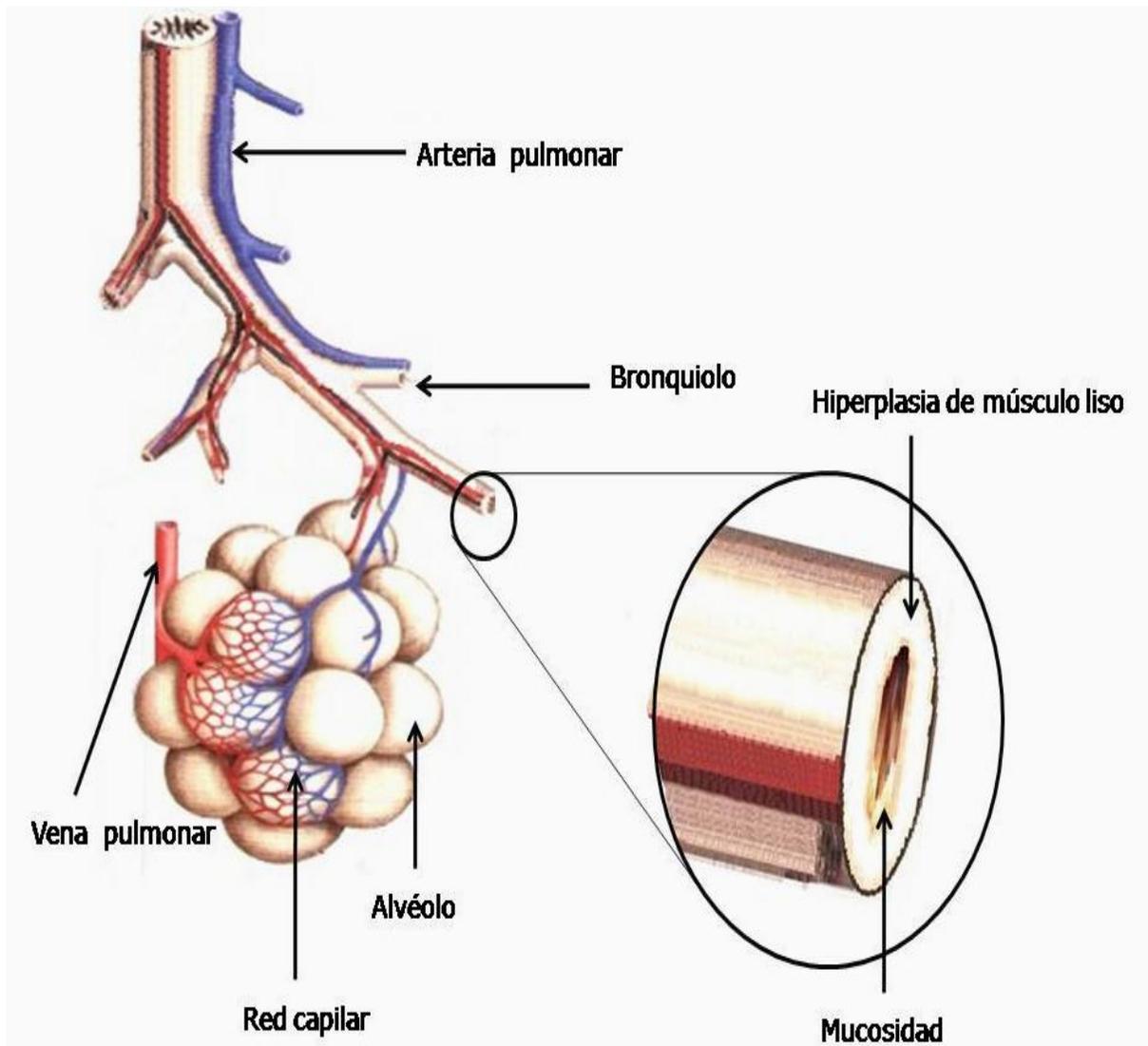
### **1.2.1 Alteraciones en la tráquea y los bronquios**

En pacientes con EPOC en etapas tempranas se observan alteraciones en la tráquea y los bronquios. Estas lesiones pueden estar asociadas con bronquitis crónica sin obstrucción al flujo de aire [20].

La existencia de lesiones bronquiales es establecida mediante el índice de Reid, un parámetro que permite cuantificar alteraciones de las glándulas traqueobronquiales y correlacionarlas con el estado clínico de los pacientes. Esta evaluación de la hipertrofia glanular, relaciona la proporción de espacio que las estructuras glandulares ocupan en la pared, con respecto al grosor total de la misma. En situaciones normales esta proporción es de un tercio. Un incremento en el índice de Reid es indicativo de lesiones bronquiales [20, 21]. Otras alteraciones comúnmente encontradas son zonas con pérdida del epitelio ciliar, ocupadas por metaplasia escamosa del epitelio e hiperplasia de células calciformes. También, se ha observado infiltración de células pro-inflamatorias (macrófagos, neutrófilos y linfocitos TCD8<sup>+</sup>) y como consecuencia la liberación de mediadores de inflamación (leucotrienos, CXCL8 (IL-8) y TNF- $\alpha$ ) en la pared bronquial. Diversos estudios han demostrado la correlación entre concentraciones altas de CXCL-8 y un incremento de neutrófilos, con respecto a la gravedad de la obstrucción y con la disminución del FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo después de administrar un broncodilatador) [20-22].

### **1.2.2 Alteraciones de las vías aéreas periféricas**

Las alteraciones en las vías aéreas pequeñas, los bronquiolos y los bronquios, son responsables de la limitación al flujo de aire. Esto se debe a lesiones intrínsecas o extrínsecas. Las lesiones intrínsecas, incluyen la inflamación del tracto respiratorio, en algunos casos, acompañada de fibrosis, obstrucción de mucosidad, hiperplasia de músculo liso y metaplasia celular [20, 21] (Figura 2). Con respecto a las lesiones extrínsecas a la luz bronquial, éstas incluyen la pérdida de retracción elástica y alteraciones en la pared de los bronquiolos como consecuencia de la ruptura de uniones alveolares [20, 21].



**Figura 2.** Bronquitis.

La hiperplasia del músculo liso y la obstrucción de mucosidad son lesiones intrínsecas de los bronquiolos, frecuentemente observadas en pacientes con EPOC. [Modificado de: <http://www.medicinapreventiva.com.ve/auxilio/signos/respiracion.htm>]

### **1.2.3 Alteraciones del parénquima pulmonar.**

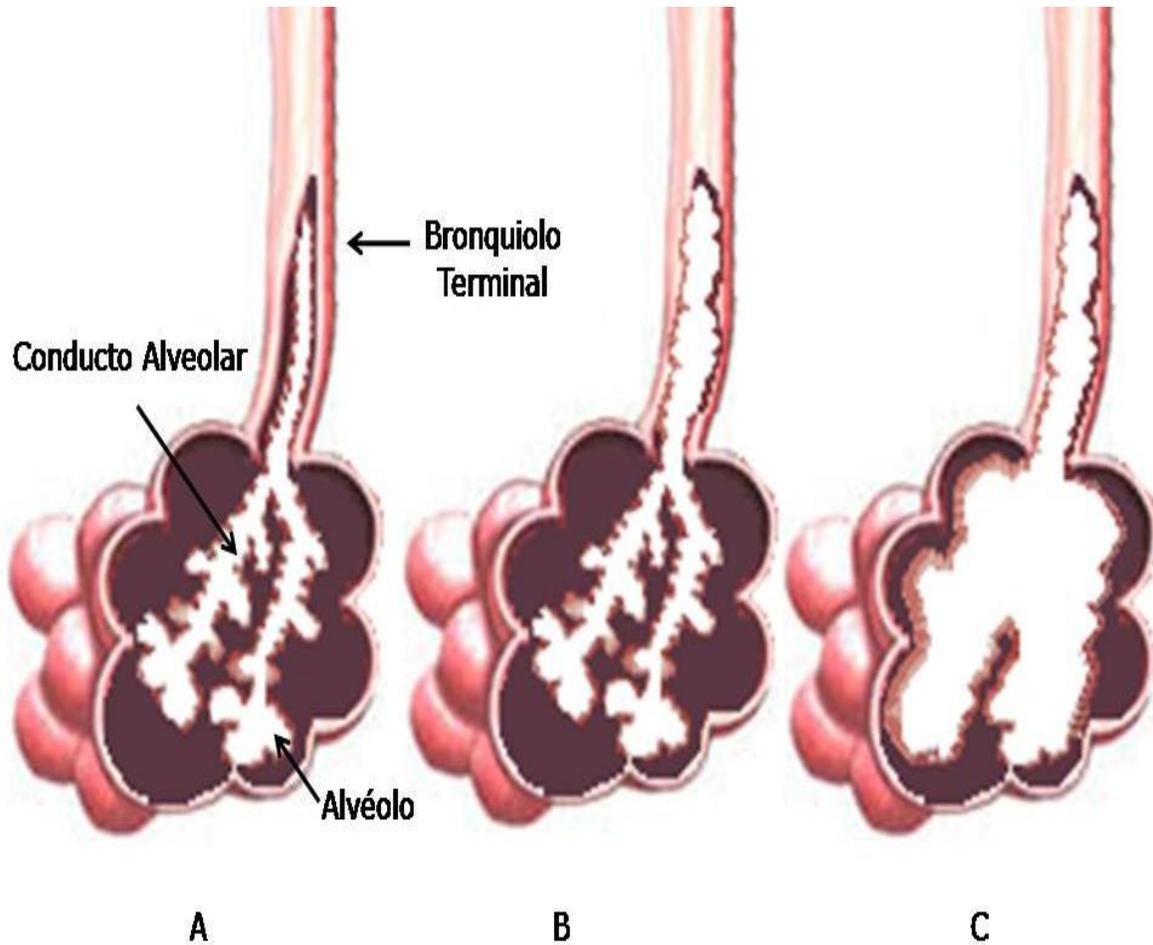
La lesión característica de la EPOC es el enfisema. El enfisema es una condición clínica distinguida por la distensión del acino y la destrucción del tejido en las paredes alveolares [20-22].

La clasificación histológica del enfisema se relaciona con la etiología de la enfermedad. Se han descrito diferentes tipos histológicos, dentro de los cuales se consideran:

1. Enfisema centroacinar es aquel que afecta a los bronquiolos respiratorios, respetando los *ductus* y los sacos alveolares. Es producido casi exclusivamente por la inhalación de humo de tabaco [20-22] (Figura 3B).

2. Enfisema panacinar. Afecta todo el acino y es provocado por la alteración de la homeostasis pulmonar, que genera la auto-digestión del parénquima secundario a una deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina, que se agrava con el reclutamiento de neutrófilos activados por la exposición al humo del tabaco [20-22] (Figura 3C).

En el enfisema, la destrucción del parénquima pulmonar genera la reducción de la capacidad del intercambio gaseoso, y por tanto hipoxemia e hipercapnia [23].



**Figura 3.** Enfisema pulmonar.

A) Estructura del acino sin lesiones. B) Enfisema centroacinar. Destrucción de paredes alveolares, restringida al área de los bronquiolos respiratorios, permaneciendo intacto el acino. C) Enfisema panacinar. Destrucción de paredes alveolares que afecta todo el acino.

[Modificado de: <http://medfamchihcesardk.blogspot.com/2007/06/noc-epoc-bronquitis-cronica-neumopatia.html>]

#### **1.2.4 Alteraciones de la vasculatura pulmonar**

Los vasos pulmonares presentan hipertrofia de la íntima y del músculo liso, generando el engrosamiento de las paredes. También se presenta hipertensión pulmonar e insuficiencia cardiaca derecha, como consecuencia de alteraciones en el lecho capilar, secundario al enfisema, así como hipoxia alveolar por la limitación crónica al flujo de aire [20-22].

### **1.3 Epidemiología de la EPOC**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2005, cerca de 3 millones de personas fallecieron a causa de la EPOC, lo que equivale al 5% de todas las defunciones registradas a nivel mundial durante ese año [3]. En el 2007, aproximadamente 210 millones de personas fueron diagnosticadas con EPOC, en todo el mundo. Se sabe que en países industrializados, la EPOC es la cuarta causa de mortalidad y se calcula que para el 2020 se convertirá en la tercera causa de muerte a nivel mundial [7].

En México, en el 2004, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) estimó los costos médicos atribuibles al consumo de tabaco en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Éstos se estimaron con base al número de casos con diagnóstico de primera vez de las principales enfermedades asociadas al consumo de tabaco: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón (CP), infarto agudo al miocardio (IAM) y enfermedad cerebrovascular (ECV). Los costos anuales de la atención médica se estimaron en 7000 millones de pesos, lo que equivalía al 5% del gasto total de operación del IMSS de ese año [24]. Además de los costos médicos atribuibles a la atención de la EPOC es importante saber la prevalencia y la morbilidad asociadas a esta enfermedad en nuestro país. Se estima que la prevalencia de la EPOC en México es de aproximadamente 2.75 millones de personas, es

decir 4.8% de la población total y es la sexta causa de muerte en mayores de 65 años [25].

De acuerdo a Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2004, el número de defunciones atribuibles al tabaquismo fue de 60 mil, es decir, 165 muertes al día, de las cuales el 29% (17390 muertes) se asocian a EPOC [25].

Si bien es escasa la información actual sobre la morbilidad debida a la EPOC, se sabe que este padecimiento aumenta con la edad y es mayor en hombres que en mujeres, así como en fumadores y ex-fumadores en comparación con no fumadores [26, 27].

La morbilidad por la EPOC puede estar asociada a otras co-morbilidades (por ejemplo, enfermedades músculo-esqueléticas, diabetes mellitus, neoplasias, osteoporosis, artritis [1] o asma [22, 28]), las cuales no están directamente relacionadas con la EPOC, pero pueden interferir con el tratamiento de la enfermedad y deteriorar la calidad de vida del paciente.

Por todo lo anterior, la EPOC debe ser tratada como un problema de salud pública, que no recibe la atención suficiente por parte de las autoridades sanitarias y los gobiernos. Considerando lo anterior, se instó a la OMS a auspiciar la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung

Disease, GOLD por sus siglas en inglés). Entre los objetivos principales de la GOLD están la concientización de la importancia de la EPOC y proporcionar ayuda a los pacientes, así como regular criterios de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad [1].

### **1.3.1 Diagnóstico**

La sintomatología característica de la EPOC es disnea, tos, expectoración de evolución crónica y progresiva, y/o un historial de exposición a factores de riesgo, como el consumo de tabaco. Todo paciente que presente estos síntomas debe ser evaluado mediante espirometría para confirmar el diagnóstico [20, 21].

La espirometría permite determinar la limitación al flujo de aire. Consiste en la medición del volumen máximo de aire espirado de manera forzada partiendo de una inspiración máxima (capacidad vital forzada o FVC), durante el primer segundo de ésta prueba (volumen espiratorio forzado en el primer segundo o FEV1). En los pacientes con EPOC es característico la disminución en ambos parámetros, FEV1 y FVC [1].

Para determinar la presencia de limitación al flujo de aire se debe calcular el cociente entre FEV1/FVC. La limitación al flujo de aire puede establecerse cuando el cociente FEV1/FVC post broncodilatador es  $<0.70\%$  [1]. Esta definición de la limitación al flujo aéreo representa una aproximación, ya que en pacientes ancianos con limitación leve, el proceso de envejecimiento normal, puede ser el responsable de la alteración de los volúmenes pulmonares, por lo que debe considerarse que no existen valores de referencia de FEV1 y FVC, que puedan ser

aplicados universalmente. No obstante, para realizar la confirmación del diagnóstico, los valores espirométricos deben compararse con los valores de referencia corregidos por la edad, altura, género y etnia [29, 30].

Adicionalmente, es importante determinar el déficit de  $\alpha$ 1- antitripsina, en pacientes caucásicos, con sospecha de EPOC a edad temprana (<45 años), o en quienes tengan una historia familiar muy sugestiva [19].

Además de ser esencial el diagnóstico, es importante determinar la gravedad de las alteraciones anatomopatológicas producidas por la EPOC. Es por ello que la GOLD ha clasificado a la EPOC, de acuerdo a su gravedad, en cuatro estadios (Tabla 1). Esta clasificación se realiza en base a los valores de espirometría [1, 4].

**Tabla 1. Clasificación espirométrica de la gravedad de la EPOC  
(FEV1 post broncodilatador)**

Etapa I: Leve	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70% FEV <sub>1</sub> ≥ 80%
Etapa II: Moderado	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70% 50% ≤ FEV <sub>1</sub> < 80%
Etapa III: Grave	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70% 30% ≤ FEV <sub>1</sub> < 50%
Etapa IV: Muy Grave	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70% FEV <sub>1</sub> < 30% ó FEV <sub>1</sub> < 50% mayor insuficiencia respiratoria*

FEV1: volumen espirado máximo en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada;  
\*Insuficiencia respiratoria. Establecida mediante los siguientes parámetros: presión parcial arterial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) inferior a 60 mm Hg (8.0 kPa) con o sin presión parcial arterial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) superior a 50 mm Hg (6,7 kPa).

#### **1.4 Inmunopatogénesis de la EPOC**

El humo de tabaco está compuesto por aproximadamente 5000 sustancias [31], lo cual dificulta la asociación específica de sus componentes con mecanismos inmunes relacionados con la susceptibilidad al desarrollo de la EPOC. No obstante, se sabe que el humo de tabaco interfiere con los mecanismos de defensa de la inmunidad innata, alterando la integridad de la barrera epitelial y estimulando la migración de neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, B, células dendríticas y NK (natural killer), al parénquima pulmonar y vías aéreas centrales [32].

Hasta el momento se sabe que las modificaciones estructurales en las vías respiratorias inferiores, características de la EPOC, son el resultado del estrés oxidativo inducido por la exposición al humo de tabaco, deficiencias en  $\alpha$ 1-antitripsina, la apoptosis de células epiteliales y endoteliales; así como la presencia de infiltrados de células, principalmente de linfocitos TCD8<sup>+</sup> y TCD4<sup>+</sup> [7, 15-19, 23].

Como ya fue mencionado, la EPOC se caracteriza por la inflamación de las vías respiratorias y destrucción del parénquima pulmonar. Existe información que indica que la destrucción del tejido epitelial y la activación de los macrófagos, inducidos por la exposición al humo de tabaco, estimulan la liberación de los factores quimiotácticos que

reclutan neutrófilos. Estas células contribuyen a la degradación del tejido conectivo por la producción de elastasas [6], las cuales generan péptidos de elastina, principal constituyente de la matriz extracelular pulmonar. Recientemente, los péptidos de elastina se han asociado a una posible respuesta autoinmune en la EPOC. Dentro de los hallazgos que sustentan esta hipótesis es la presencia de anticuerpos contra elastina en individuos con enfisema [34-36]. También se ha reportado en pacientes con EPOC, un incremento en IFN- $\gamma$  producido por células TCD4<sup>+</sup> en respuesta a péptidos de elastina [37]. Así mismo, se sabe que las células Th17, presentes en el parénquima pulmonar de pacientes con enfisema y la estimulación por péptidos de elastina promueven la diferenciación de células Th1 y Th17 [38], lo cual podría indicar que la elastina puede actuar como auto-antígeno durante la patogénesis de la EPOC, vía inducción de la respuesta inmune Th1 y Th17. En conjunto estos estudios han sugerido que las células Th17 podrían mediar la respuesta inmune celular y la autoinmunidad en la patogénesis de la EPOC.

### **1.4.1 Posible relevancia de las células Th17 en la EPOC**

Las células Th17 son una subpoblación de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, que se caracterizan principalmente, por secretar IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, TNF- $\alpha$ , CCL5 y CXCL7 [39, 40]. De estas citocinas, la IL-17A, IL-22, CCL5 y CXCL7, se han asociado a la respuesta inmune inflamatoria, característica de la EPOC, correlacionada con el incremento de la expresión de estas, en biopsias bronquiales y mucosa bronquial, de pacientes con EPOC [33, 39-41].

La IL-17 es una citocina pro-inflamatoria producida tanto por células Th17, como macrófagos, células NKT (Natural Killer T), células dendríticas, linfocitos B y T $\gamma\delta$ . Esta citocina induce en células del endotelio, epitelio, fibroblastos y macrófagos, la producción de factores de crecimiento, como GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor); y diversas quimiocinas, como CXCL1, CXCL2 y CXCL5. Dichas quimiocinas, funcionan como factores quimiotácticos de granulocitos, indispensables para eliminar patógenos e inducir una respuesta inflamatoria [39-41].

La importancia de la IL-17 en las vías respiratorias se ha demostrado a través de diversos estudios en los cuales se ha encontrado que en ratones knock-out para el receptor de IL-17 (IL-17R), incrementa la susceptibilidad a infecciones pulmonares, correlacionada con la ausencia

de migración de neutrófilos al espacio bronqueoalveolar de las vías respiratorias, así como la incapacidad de eliminar bacterias como *Escherichia coli* [39, 42]. Adicionalmente, en modelos animales de enfisema, se ha asociado la exposición crónica al humo de tabaco con el incremento significativo en el número de células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 en LBA (Lavado bronqueoalveolar) [43].

Como se mencionó anteriormente, las células Th17 también producen IL-22, la cual se ha asociado a enfermedades crónicas inflamatorias como artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad del intestino irritable [44, 45]. Actualmente, se sabe que la IL-22 es una citocina pro-inflamatoria, indispensable para la protección contra ciertas infecciones pulmonares, debido a que induce la expresión de  $\beta$ -defensinas, las cuales son importantes en la protección de la barrera mucociliar contra microorganismos en el pulmón [46].

Estudios recientes han demostrado que el número de células del epitelio bronquial, productoras de IL-22, incrementa en pacientes con EPOC en relación con individuos sanos [40].

En modelos animales de enfermedad pulmonar inducida por bleomicina, se observó un efecto protector en ratones con deficiencia de IL-22 ó ratones tratados con anticuerpo que bloquea IL-22. También se

determinó que la respuesta inflamatoria inducida por IL-22 depende de la presencia de IL-17 A [47].

Además de la IL-22 e IL-17 se sabe que TNF- $\alpha$  podría ser una citocina indispensable en la respuesta inmune inflamatoria característica de la EPOC, ya que promueve la producción de CXCL8 en células del epitelio de vías respiratorias, promoviendo el infiltrado de neutrófilos y con ello la degradación de tejido pulmonar [36]. Así mismo, existen estudios que han reportado que el incremento en suero de TNF- $\alpha$  está ligado a exacerbaciones en pacientes con EPOC [48]. Adicionalmente, se sabe que al igual que la IL-22, la función de TNF- $\alpha$  podría depender de IL-17A, ya que se ha encontrado, en mastocitos, un incremento de esta citocina debido a IL-17A, lo cual genera infiltrado de neutrófilos en tejido pulmonar [49].

La asociación de citocinas producidas por células Th17 con la respuesta inmune en tejido pulmonar, sugiere que el desarrollo y la progresión de la EPOC es el resultado de la inflamación mediada por células Th17.

### **1.4.2 Células Treg en la EPOC**

Las células T reguladoras (Treg) son la subpoblación más abundante de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, ya que representan del 5–10% del total de esta población [50]. Esta estirpe celular expresa constitutivamente CD25, GITR (glucocorticoid-inducible TNF (tumour necrosis factor) receptor), CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), y FOXP3 (forkhead box P3) [40, 51]. Así mismo, se sabe que las células Treg expresan receptores de quimiocinas, como CCR6 y CCR7, los cuales les confieren la habilidad de migrar a sitios de inflamación [40, 52].

Actualmente, se sabe que las células Treg son responsables de la regulación de la tolerancia periférica, respuesta inflamatoria y autoinmune, inducidas por células T cooperadoras. Dichas funciones son realizadas mediante la producción de citocinas como IL-5, IL-10, IL-35, IFN- $\gamma$ , y factores de crecimiento como TGF- $\beta$  [40].

Se sabe que la diferenciación de células T naïve en células Treg y la expansión de esta estirpe celular dependen de TGF- $\beta$ 1 e IL-2 [40]. Esto se ha comprobado a través de estudios en animales, en los cuales, ratones deficientes en IL-2 presentan una disminución en la proporción de células Treg, indicando la importancia de esta citocina, en la proliferación de esta estirpe celular [53].

Además de la importancia como factores estimulantes de la diferenciación de células Treg, se cree que TGF- $\beta$ 1 e IL-2 podrían ser responsables de la respuesta inmune en la EPOC, ya que se ha reportado el incremento en las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 en suero de pacientes con EPOC comparado con controles sanos [54]. Adicionalmente, se ha reportado un incremento en la concentración de IL-2 en pacientes con EPOC estable [55] comparados con aquellos que exhiben un rápido declive de la función pulmonar. Los hallazgos de altas concentraciones de TGF- $\beta$ 1 e IL-2 sugieren que existe un ambiente que fomenta la diferenciación a células Treg y esto puede ser especialmente acentuado en pacientes con EPOC estable.

Como se mencionó con anterioridad, las células Treg producen citocinas antiinflamatorias, incluidas la IL-35, la cual inhibe la proliferación de células T. La IL-35 es un heterodímero, perteneciente a la familia de citocinas IL-12 junto con IL-23 e IL-27 [56]. En ratones, la IL-35 se ha asociado a la supresión de células Th17 [57], no obstante, esta función no se ha demostrado en humanos [58]. Actualmente, se cree que la IL-35 podría regular las funciones de células que participan en la respuesta inmune en EPOC, especialmente macrófagos [40].

Además de IL-35, se sabe que IL-10 podría ser indispensable en la regulación de la respuesta inflamatoria característica de la EPOC. Dentro de las funciones relevantes de IL-10 y que podrían demostrar su

relevancia en la patogénesis de la EPOC, son que esta suprime citocinas producidas por células Th1, como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , e inhibe en neutrófilos, la producción de CXCL8, generando un efecto anti-inflamatorio [59, 40]. Como ya fue mencionado, la neutrofilia es característica de la EPOC, por lo que se podría sugerir que la producción de IL-10 no es suficiente para prevenir el infiltrado de neutrófilos en individuos con EPOC. Adicionalmente, se ha reportado que en ausencia de IL-10, las concentraciones de IL-23 pueden elevarse y generar la activación de células Th17 [60].

Con base a la función de las células Treg, se puede hipotetizar que la proporción de esta estirpe celular se encuentra relacionada de manera inversamente proporcional al daño generado por los procesos inflamatorios característicos de la EPOC. No obstante, se ha reportado el incremento en las proporciones de células Treg, en pacientes con EPOC con exacerbaciones y en biopsias de pulmón de pacientes con enfisema [37]. Existe información que indica la existencia de una correlación directa entre el número de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, en LBA, con el número de paquetes de tabaco consumido al año, en pacientes con EPOC [61]. Adicionalmente, un estudio en parénquima pulmonar de pacientes con EPOC moderado, concluyó que hay un incremento en el número de linfocitos TCD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> [62].

La importancia de las células Treg en EPOC es controversial. Algunos estudios sugieren que la disminución en la subpoblación de células Treg en tejido pulmonar de pacientes con EPOC podría ser importante en la progresión clínica de la enfermedad [63], mientras que otros grupos sugieren que hay alteraciones funcionales en las células Treg, que influyen en la patogénesis de EPOC [64]. No obstante, se desconoce el mecanismo responsable de esta desregulación en la respuesta de las células Treg, pero se cree que posiblemente, algún componente del humo de tabaco puede ser el responsable de este fenómeno.

Con base a la información previamente mencionada podemos concluir que en los pacientes con EPOC, la inflamación crónica no puede ser controlada por esta estirpe celular, generando así un desbalance en la respuesta pro y anti-inflamatoria.

## **2. Planteamiento del problema**

Investigaciones recientes sugieren que las subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup>, contribuyen de manera importante en la inmunopatogénesis de la EPOC [6, 65]. Dentro de estas subpoblaciones de linfocitos, las células Th17 se han descrito como la posible estirpe celular responsable de mediar la respuesta inflamatoria crónica en la EPOC. Debido a que estas células secretan diversas citocinas pro-inflamatorias, como IL-17A, IL-22 y TNF $\alpha$ , la cuales son responsables del incremento en el infiltrado de células pro-inflamatorias y por ende del daño tisular característico de esta enfermedad [40].

Además de las células Th17, las células Treg se han asociado a la respuesta inmune celular en la EPOC, pues existen estudios que indican que esta estirpe celular, al regular la tolerancia periférica y las funciones de las células T cooperadoras, tienen la capacidad de regular la respuesta inflamatoria [40, 36], pero que en algunas patologías, como la EPOC, esta respuesta es ineficiente debido a la posiblemente alteración en la función de estas células, producto de la exposición al humo de tabaco; generando una respuesta inmune pro-inflamatoria posiblemente mediada por células Th17.

En este contexto, es relevante precisar el papel de las células TCD4<sup>+</sup>, en particular el balance Th17/Treg en la patogénesis del proceso

inflamatorio característico de la EPOC. Así mismo, es importante definir el balance pro y anti-inflamatorio mediante la correlación de las modificaciones en la proporción de subpoblaciones de linfocitos TCD4+, con la producción de citocinas *ex vivo* y compararlas con la respuesta celular, producto de la exposición al humo de tabaco *in vitro*. Por lo tanto, los resultados de este trabajo contribuirán para entender los mecanismos involucrados en la fisiopatogenia de la EPOC.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Analizar la respuesta inmune celular y la producción de citocinas en sangre periférica de pacientes con EPOC, fumadores sin EPOC y controles sanos. Establecer las propiedades funcionales de las células mononucleares de pacientes con EPOC, fumadores sin EPOC y controles sanos, estimuladas con extracto de humo de tabaco.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Analizar la proporción de las diferentes subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg), obtenidas de sangre periférica, de pacientes con EPOC, fumadores e individuos sanos.
2. Determinar mediante estudios *in vitro* la proporción de células Th1, Th2, Th17 y Treg, inducida por la exposición al humo de tabaco.
3. Cuantificar las concentraciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, CCL-11, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, PDGF-BB, CCL-5, TNF- $\alpha$  y VEGF) en el suero y sobrenadantes de cultivos celulares de CMN de los ensayos *in vitro* inducidos por la exposición a humo de tabaco.

## 4 Hipótesis

La respuesta inflamatoria crónica característica de la EPOC, promoverá la existencia de diferencias fenotípicas y alteraciones funcionales en las subpoblaciones de linfocitos TCD4<sup>+</sup> (proporción de subpoblaciones y producción de citocinas), en pacientes con EPOC en relación con fumadores sin EPOC e individuos sanos. Dichos cambios funcionales son el reflejo de la existencia de un desbalance en la respuesta pro y anti-inflamatoria, mediado por subpoblaciones de linfocitos TCD4<sup>+</sup>.

La exposición al humo de tabaco, en ensayos *in vitro*, promoverá una respuesta pro-inflamatoria, la cual se pondrá de manifiesto a través del incremento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias y modificaciones en las proporciones de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup>.

## **5. Diseño Experimental**

Estudio descriptivo, transversal, experimental.

### **5.1 Población en estudio**

Se incluyeron 15 pacientes con diagnóstico de EPOC. El diagnóstico se realizó por espirometría, empleando un espirómetro dry rolling-seal volume (Sensormedics, Yorbalinda, CA). La espirometría se realizó antes y después de la administración de 200 µg de salbutamol, siguiendo los procedimientos recomendados por la ATS (American Thoracic Society) [4], la ERS (European Respiratory Society) y la GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) [1].

Los pacientes con EPOC pertenecen a una cohorte de individuos de 45-65 años de edad. Son atendidos en el departamento de EPOC y tabaquismo del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Fueron evaluados durante un periodo clínicamente estable, libre de exacerbaciones. Se excluyeron del estudio los individuos con diagnóstico de EPOC no asociado a la exposición al humo de tabaco y/o con desórdenes respiratorios adicionales (bronquiectasia o asma), así como aquellos con co-morbilidad asociada o cáncer.

Como grupos de contraste se incluyeron 15 fumadores sin EPOC y 6 controles sanos. Los criterios de inclusión para estos grupos son la ausencia de antecedentes de enfermedades crónicas (diabetes mellitus, hipertensión, neoplasias, artritis reumatoide, etc); pertenecen al mismo grupo etario que los pacientes con EPOC; no consumen alcohol o drogas. En el caso del grupo de controles sanos, son no fumadores y no cuentan con historial de consumo de tabaco.

Sólo se incluyeron individuos quienes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ciencia y de Bioética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

## **6. Métodos**

### **6.1 Muestras**

Se obtuvieron muestras de 20 ml de sangre periférica anti-coagulada con K<sub>3</sub>EDTA al 15%.

### **6.2 Obtención de células mononucleares (CMN)**

La separación de células mononucleares de muestras de sangre periférica, se realizó por gradiente de densidad, empleando Lymphoprep (Ficoll-Hypaque, marca: Axis-Shield). Esta metodología consiste en la homogenización de la muestra de sangre, contenida en tubos de 4 ml con K<sub>3</sub>EDTA al 15% (marca: BD Vacutainer). Posteriormente se transfirió la muestra a un tubo de 50 ml y se adicionó solución salina isotónica (SSI, marca: CS PISA, NaCl 0.9%) en una proporción 1:1. Se homogenizó y agregó Lymphoprep en una proporción 2:1, con respecto a la sangre diluida en SSI. La adición de Lymphoprep se realizó de forma lenta para crear un gradiente de densidad. Posteriormente se centrifugó, sin freno a 1500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Subsecuentemente se tomaron las CMN, con pipeta pasteur, dichas células se ubican debajo del plasma y por encima del Lymphoprep. Las CMN aisladas, se transfirieron a un tubo de 15 ml y se lavaron en 2 ocasiones, con SSI. Se centrifugó a

1500 rpm por 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante y resuspendió el *pellet* en 1ml de RPMI 1640 suplementado (Marca: Lonza).

Por último, en un tubo de 1.5 ml se agregaron 90  $\mu$ l del colorante azul de tripano (Marca: Sigma) al 1% en PBS (Marca: Lonza) y 10  $\mu$ l de la muestra. Esta dilución se utilizó para realizar el conteo de CMN en cámara de Neubauer. Dichas células se usaron para cultivo celular y para ser analizadas fenotípicamente por citometría de flujo.

### **6.3 Determinación de proporciones de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg) por citometría de flujo.**

#### **6.3.1 Tinción de moléculas de superficie**

Para realizar la determinación de la proporción de subpoblaciones de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, se colocaron en tubos para cultivo celular de 5 ml (marca: BD Falcon)  $1.0 \times 10^6$  CMN. Posteriormente se lavaron con 2 ml de buffer PBA (PBS (Phosphate Buffered Saline) con 1 % de albúmina bovina sérica y 0.1% de azida de sodio). Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo previamente mencionado, se decantó el sobrenadante. Cada subpoblación se determinó en tubos por separados, a excepción de las células Th1 y Th2, las cuales fueron determinadas en el mismo tubo.

Posteriormente se marcaron las CMN para moléculas de superficie con los anticuerpos monoclonales anti-CD3-APC (1.25  $\mu$ l), anti-CD4-APC-C $\gamma$ 7 (20  $\mu$ l) y anti-CD8-PerCP/C $\gamma$ 5.5 (1.25  $\mu$ l) (marca: Biolegend). Cabe mencionar que las células Treg, además de ser teñidas con los anticuerpos previamente mencionados se teñieron con anti-CD25-FITC (10  $\mu$ l) (marca Biolegend). Así mismo, se adicionó PBA cuanto bastaba para alcanzar un volumen de 50  $\mu$ l en cada tubo.

Subsecuentemente, se incubó durante 25 minutos a 4°C en la oscuridad, para evitar la exposición de los fluorocromos a la luz. Una vez

transcurrido este tiempo se adicionaron 2 ml de PBA a cada tubo y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante.

### **6.3.2 Tinción intracelular**

La tinción intracelular consistió en la permeabilización de la membrana celular, mediante la adición de 100 µl de la solución para permeabilizar (Fixation/Permeabilization solution) del kit Cytofix/Cytoperm (marca: BD Biosciences). Se incubó durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Posteriormente, se adicionó 1 ml de solución de lavado Perm/Wash, previamente diluida 1:10 en agua bidestilada. Se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y resuspendió el *pellet* en 50 µl de PermWash.

Para realizar la tinción intracelular se emplearon los anticuerpos monoclonales anti-IFN- $\gamma$ -PEC $\gamma$ 7 (5 µl), anti-IL-4-PE (2.5 µl), anti-IL-17A-PE (1.25 µl) y anti-FOXP3-PE (10 µl), para la determinación de células Th1, Th2, Th17 y Treg, respectivamente. Se adicionó PermWash cuanto bastaba para alcanzar un volumen de 100 µl en cada tubo. Se incubó por 25 minutos a 4°C, en la oscuridad.

Una vez realizada la incubación se lavaron las células con 1 ml de PBS. Se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se aspiró el

sobrenadante y resuspendió el *pellet* en 300 $\mu$ l de PBS con formaldehído al 3%.

Como controles de compensación se emplearon perlas Comp Beads Negative Control (FBS, marca: BD Biosciences) y perlas Comp Beads Anti-Mouse Ig $\kappa$  (Marca: BD Biosciences), de las cuales se agregaron 3 gotas de cada una, en tubos para cultivo celular de 5 ml (marca: BD Falcon). La tinción de estas perlas se realizó siguiendo el protocolo antes mencionado y empleando anticuerpos con los diferentes fluorocromos utilizados en la tinción de CMN. Como control negativo se emplearon perlas Comp Beads Negative Control (FBS, marca: BD Biosciences) sin teñir.

Además de los controles de compensación se emplearon los controles de isotipo: IgG $\kappa$ 1-PE (0.605  $\mu$ l), IgG $\kappa$ 1-PEC $\gamma$ 7 (5  $\mu$ l) y IgG $\kappa$ 1-FITC (20  $\mu$ l). La metodología seguida fue la anteriormente mencionada. Por último, para cada muestra se emplearon controles de células sin teñir.

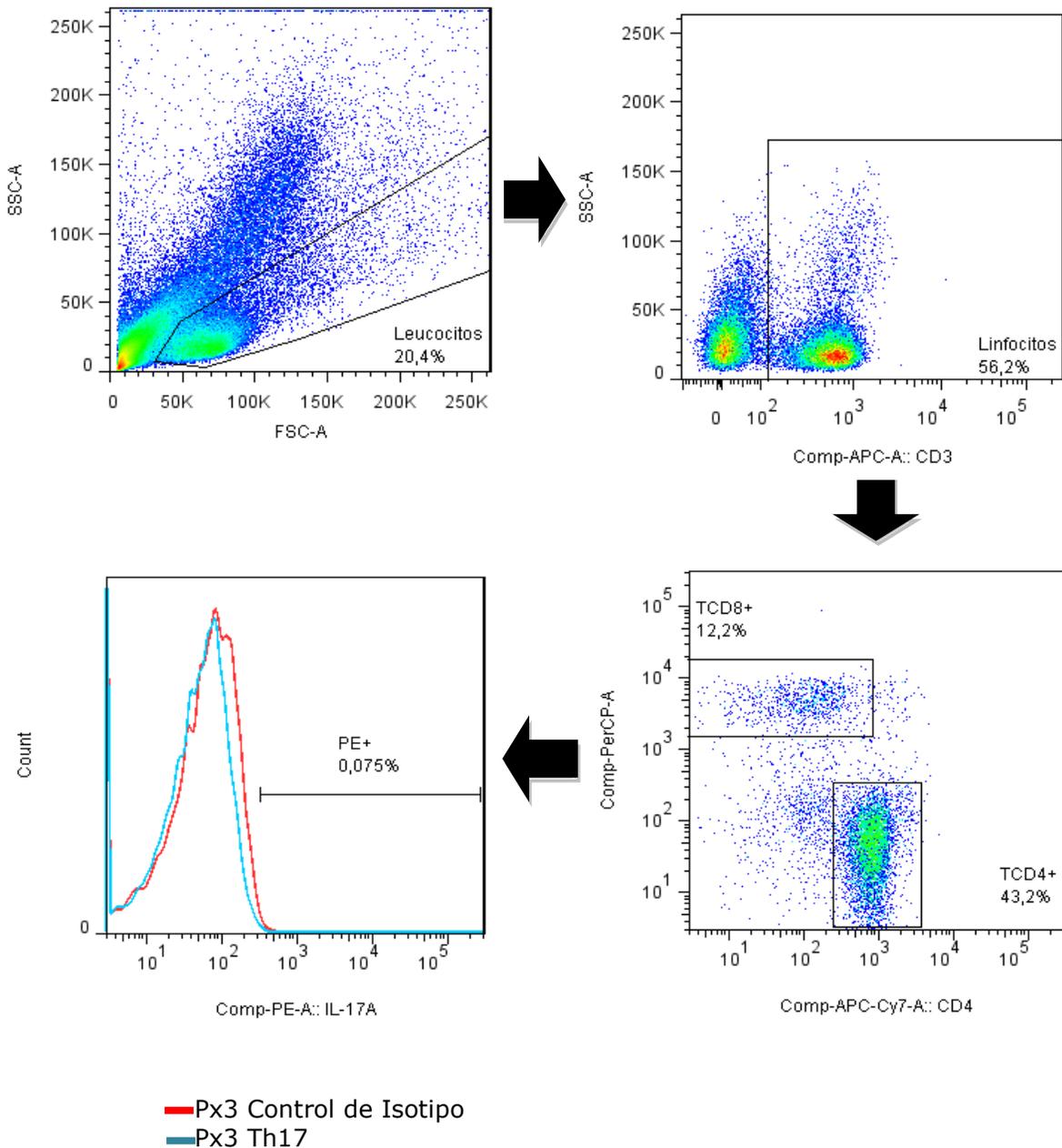
Es importante señalar, que el volumen de anticuerpos se determinó mediante la titulación previa de cada uno de ellos.

### **6.3.3 Análisis de las proporciones de subpoblaciones de linfocitos TCD4<sup>+</sup>**

A partir de las células teñidas se adquirieron 50,000 eventos totales en un equipo FACsAria (BD Biosciences) y las subpoblaciones se analizaron mediante el programa FlowJo.

La determinación de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup>, se realizó mediante la selección de la población correspondiente a los leucocitos con base a su granularidad y tamaño, en el gráfico de puntos FSC-A vs SSC-A. A partir de esta población se seleccionaron los linfocitos T, mediante la fluorescencia emitida por las células CD3<sup>+</sup>, en los gráficos de puntos CD3<sup>+</sup>-APC vs SSC-A. Posteriormente se determinó la población de linfocitos TCD4<sup>+</sup> con base a los gráficos de puntos CD4<sup>+</sup>-APC/C $\gamma$ 7 vs CD8<sup>+</sup>-PerCP/C $\gamma$ 5.5. Por último, la determinación de la proporción de subpoblaciones de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, se realizó empleando los controles de isotipo correspondientes a los anticuerpos usados como marcadores de cada estirpe celular. Los controles de isotipo permitieron determinar la proporción de células que presentaba el marcador característico de cada subpoblación en estudio, al comparar la intensidad media de fluorescencia (IMF) emitida por cada control de isotipo con respecto a la IMF de cada muestra, definiendo así el porcentaje de cada subpoblación celular con respecto a las células TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> totales.

En la figura 4 se esquematiza un ejemplo de la estrategia que se siguió para determinar las subpoblación de células TCD4<sup>+</sup>.



**Figura 4.** Estrategia de análisis fenotípico de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup>

## **6.4 Ensayos *in vitro* del efecto de la exposición al humo de tabaco en CMN**

### **6.4.1 Preparación del extracto de humo de tabaco.**

Mediante un sistema de vacío, se puso en contacto el humo proveniente de 2 gramos de tabaco, en un volumen de 25 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado. La concentración del medio tratado con 2 gramos de tabaco se determinó a través de la absorbancia a una longitud de onda de 320 nm, mediante espectrofotómetro UV/Vis (Marca: Beckman Coulter, modelo: DU800 Spectrophotometer). Posteriormente se ajustó la concentración a 1 unidad de absorbancia, con medio RPMI 1640 suplementado, y se consideró como la concentración del 100%. El pH del medio tratado con humo de tabaco fue ajustado entre 7.2 - 7.5. Posteriormente, el medio tratado se esterilizó por filtración para su uso en cultivo celular. Este protocolo ha sido previamente descrito [66].

Se prepararon placas de cultivo de 24 pozos, colocando por pozo  $1 \times 10^6$  CMN, aisladas de muestras de sangre periférica, tomadas de 4 pacientes con EPOC, 4 fumadores sin EPOC y 4 controles sanos. Las CMN en placas de cultivo fueron expuestas a diferentes concentraciones de medio tratado con humo de tabaco (1%, 3% y 5%). Como control positivo se utilizaron  $3 \mu\text{l}$  de PHA-p (phytohemagglutinin-p) a una

concentración de 3µg/ml y los pozos con CMN en RPMI 1640 suplementado sin estímulo se consideraron controles negativos. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se incubaron durante 8 horas a 37°C, en presencia de 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa de 95%.

Para realizar la determinación de las proporciones de células TCD4<sup>+</sup>, se agregó 1µl de brefeldina (Golgi Plug, Protein Transport Inhibitor, marca: BD) por pozo, después de 1 hora de iniciada la incubación y una vez, transcurridas las 8 horas de incubación se colectaron las células para realizar el análisis fenotípico. Así mismo, para determinar las concentraciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se cultivaron CMN en las mismas condiciones y estímulos previamente mencionados, pero sin brefeldina.

Los sobrenadantes de estos cultivos celulares fueron colectados y almacenados a -80°C para su posterior análisis por el método de Luminex.

## **6.5 Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por luminex.**

Las concentraciones en pg/ml de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se determinaron en suero de pacientes con EPOC, fumadores, controles sanos y en sobrenadantes de 8 horas, obtenidos a partir de los cultivos celulares no tratados con brefeldina. Estas moléculas se cuantificaron mediante el sistema Bio-Plex, BIO-RAD (Bio-Plex 200 System). Se utilizó un panel comercial de 27 analitos (Bio-Plex cytokine X-Plex panel: IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, CCL-11, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, PDGF-BB, CCL-5, TNF- $\alpha$  y VEGF).

La plataforma Bio-Plex permite cuantificar citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento mediante un inmuno-ensayo tipo sándwich. Este ensayo consiste en el uso de anticuerpos monoclonales unidos covalentemente a perlas. Dichos anticuerpos están dirigidos contra cada citocina, quimiocina o factor de crecimiento por cuantificar.

Las perlas acopladas a los anticuerpos reaccionan con las citocinas contenidas en la muestra. Después de una serie de lavados para remover proteínas no unidas, se utiliza un anticuerpo de detección biotinilado, dando como resultado la formación de un sándwich de anticuerpos alrededor de las citocinas. Por último, se emplea un complejo de estreptavidina-ficoeritrina, el cual se une al anticuerpo

biotinilado y permite cuantificar las citocinas mediante la fluorescencia emitida por la ficoeritrina.

El análisis de la muestra se realizó en el equipo Luminex (marca: Bio-RAD). Este equipo determina la concentración de cada analito a través de un flujo laminar, diseñado de tal forma que las perlas atraviesan en una sola fila, una región iluminada por dos láser, para posteriormente realizar la determinación de la fluorescencia emitida por cada perla y con base a una curva estándar realizar la interpolación correspondiente para cuantificar cada analito.

La cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Bio-RAD.

## **6.6 Análisis estadístico**

Las diferencias demográficas entre los grupos estudiados, en la distribución de las subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> y las concentraciones de citocinas entre grupos fueron analizadas por U de Mann-Whitney. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Los resultados se expresan como la mediana con rango y/o el promedio + ES.

## 7. Resultados

Las características clínicas y demográficas de las poblaciones en estudio se encuentran en la tabla 2.

**Tabla 2. Características clínicas y demográficas**

	<b>CONTROLES SANOS (n = 6)</b>	<b>FUMADORES (n = 15)</b>	<b>EPOC (n = 15)</b>	<b>valor de p</b>
<b>Edad (años)</b>	54± 7	55 ± 6	57 ± 5	NS
<b>Género (M/F)</b>	1/5	9/6	12/3	
<b>Tabaco (paquetes/año)</b>	—	30±10	45±26	NS
<b>IMC</b>	29±3	24±4	25±15	NS

Los valores se expresan en mediana ± Desviación Estándar. NS = No significativo  
IMC = Índice de Masa Corporal

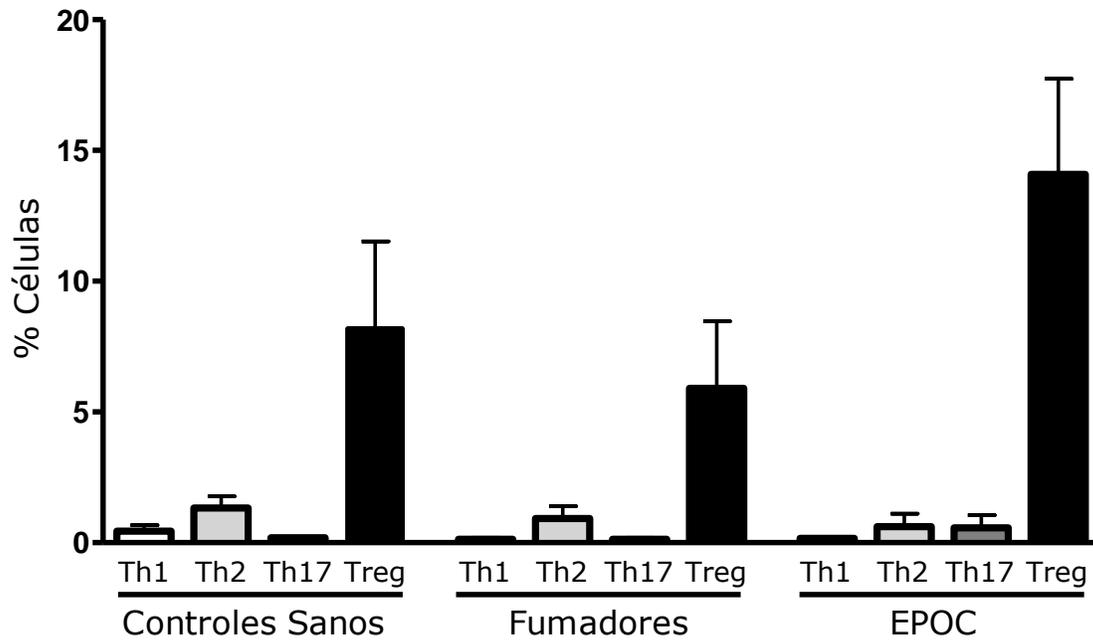
Como se muestra en la tabla 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad e IMC de los tres grupos en estudio. La media del consumo de tabaco para los pacientes con EPOC fue de 45±26 paquetes por año y 30±10 paquetes por año para el grupo de los fumadores (p=NS).

## **7.1 Determinación de proporciones de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg) en sangre periférica.**

El análisis de las subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> en sangre periférica mostró que el porcentaje de células Treg fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con EPOC (mediana= 16.2%) con respecto a los fumadores (5.7%) y controles sanos (7.5%) (Figura 5).

En general, los porcentajes de células Th1 y Th17 fueron similares en los pacientes con EPOC (0.1% y 0.2%, respectivamente) y los fumadores (0.1%, tanto en la proporción de células Th1, como Th17), en comparación con los controles sanos (0.2%, en ambas estirpes celulares).

Con respecto a las células Th2 se observó en los pacientes con EPOC (0.2%) una menor proporción de estas células en comparación con los fumadores (0.7%) y controles sanos (1.3%).



**Figura 5.** Distribución de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg) en sangre periférica.

## **7.2 Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en suero.**

En la tabla 3 se muestran los valores en pg/ml de la cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, realizada en muestras de suero de pacientes con EPOC (n=6), fumadores sin EPOC (n=15) y controles sanos (n=15).

El análisis de la concentración de las citocinas pro-inflamatorias reveló un ligero incremento en las concentraciones de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-17 (IL-17 en pacientes versus controles sanos  $p < 0.05$ ) en el grupo de pacientes con EPOC en relación con los controles sanos y fumadores. En contraste, se observó una mayor concentración de IFN- $\gamma$  en el grupo de fumadores (47.5 pg/ml, 4.3-160.0 pg/ml) con respecto al grupo de pacientes con EPOC (34.3 pg/ml, 17.1-143.7) y los controles sanos (28.2 pg/ml, 22.7-49.8).

La concentración de citocinas anti-inflamatorias (IL-1RA, IL-4, IL-13, IL-10 e IL-5) en suero no mostró diferencias marcadas entre los grupos de estudio. En general, se observaron bajas concentraciones de IL-1RA en el grupo de fumadores (59.8 pg/ml, 1.6-196.2) en relación con los pacientes con EPOC y sanos (73.4 pg/ml y 75.1 pg/ml, respectivamente).

En el análisis de quimiocinas se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de eotaxina, entre los controles sanos (75.5 pg/ml, 10.5-106.0) con respecto a los fumadores (120.8 pg/ml, 24.1-788.2) y a los pacientes con EPOC (130.8 pg/ml, 32.0-319.8) ( $p=0.05$ ). También se observó un incremento en la concentración de IP-10 en los fumadores (756.5 pg/ml, 221.5-9607.3) en relación con los pacientes con EPOC (581.5 pg/ml, 309.0-1503.2) y los controles sanos (350.4 pg/ml, 17.23-802.4). La concentración sérica de MCP-1 fue mayor en los pacientes con EPOC (27.1 pg/ml, 9.5-34.5) en relación con los individuos sanos (23.4 pg/ml, 2.0-42.3) y fumadores (14.8 pg/ml, 3.1-99.2). Se observó un aumento marginal de las concentraciones de IL-8 en el grupo de pacientes con EPOC (4.6 pg/ml, 1.1-32.9) en relación con los controles sanos (2.5 pg/ml, 1.6-65.0) y fumadores (1.9 pg/ml, 0.5-65.3).

**Tabla 3. Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en suero.**

	<b>Controles Sanos (n=6)</b>	<b>Fumadores (n=15)</b>	<b>EPOC (n=15)</b>
<b>Citocinas Pro-inflamatorias</b>			
IL-1 $\beta$	0.6(0.2-3.4)	0.7(0.07-1.5)	0.6(0.3-9.8)
IL-6	2.9(2.1-4.7)	2.7(0.5-8.3)	3.4(0.2-18.2)
IL-12	3.2(1.0-28.5)	4.3(0.8-28.8)	4.6(0.2-13.8)
IL-17	2.4(0.01-3.3)	3.0(0.01-4.2)	5.0(0.9-6.8) <sup>A</sup>
IFN- $\gamma$	28.2(22.7-49.8)	47.5(4.3-160.0)	34.3(17.1-143.7)
TNF- $\alpha$	0.01(0.01-5.6)	3.0(0.01-9.2)	7.3(0.01-27.4)
<b>Citocinas Anti-inflamatorias</b>			
IL-1RA	75.1(7.4-118.6)	59.8(1.6-196.2)	73.4(15.6-268.3)
IL-4	0.4(0.3-2.2)	0.5(0.1-3.9)	0.5(0.2-2.4)
IL-13	3.2(2.3-4.1)	1.0(0.01-7.7)	1.7(0.7-29.4)
IL-10	0.4(0.01-1.7)	0.8(0.01-1.9)	0.7(0.1-4.7)
IL-5	0.9(0.6-2.4)	0.5(0.01-2.7) <sup>B</sup>	0.9(0.3-3.3)
<b>Quimiocinas</b>			
IL-8	2.5(1.6-65.0)	1.9(0.5-65.3)	4.6(1.1-32.9) <sup>C</sup>
EOTAXINA	75.5(10.5-105.9) <sup>D</sup>	120.8(24.1-788.2)	130.8(32.0-319.8)
IP-10	350.4(17.2-802.4)	756.5(221.5-9607.3)	581.5(309.0-1503.2)
MCP-1	23.4(2.1-42.3)	14.8(3.1-99.2)	27.1(9.5-34.5)

Los valores están expresados en mediana (rango). Las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se determinaron en pg/ml. Todos los valores de p fueron determinados por la prueba U de Mann-Whitney; A) en comparación con los fumadores y controles sanos; B) en comparación con los pacientes con EPOC; C) en comparación con los fumadores; D) en comparación con los pacientes con EPOC y fumadores.

### **7.3 Ensayos *in vitro* del efecto de la exposición al humo de tabaco en CMN**

#### **7.3.1 Determinación de proporciones de células TCD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg)**

Se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar el efecto de la exposición a diferentes concentraciones (1, 3 y 5%) de extracto de humo de tabaco (EHT), en la proporción de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 y Treg).

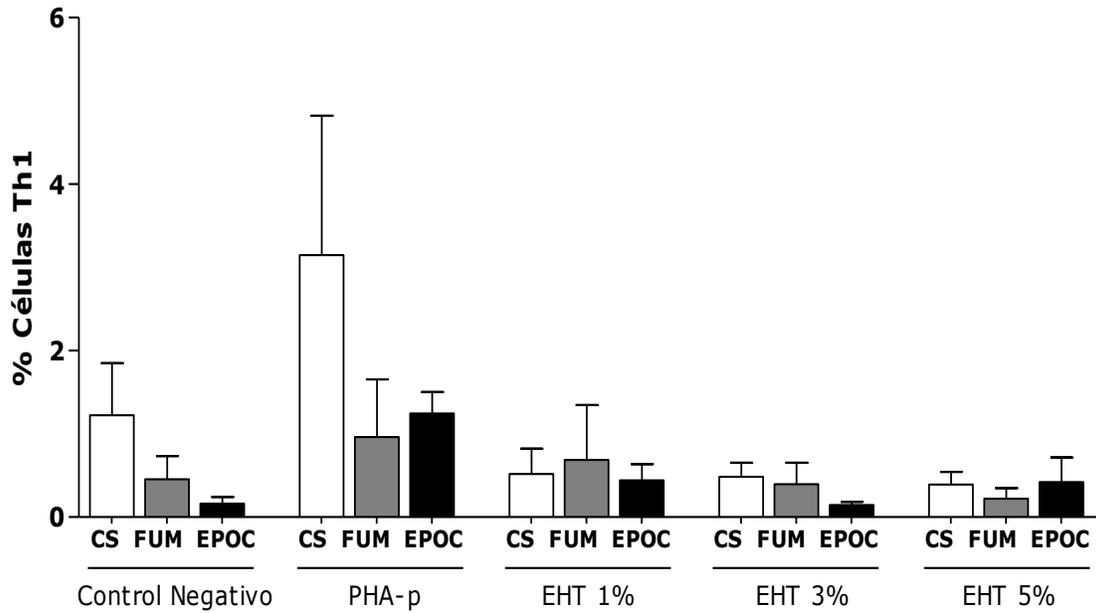
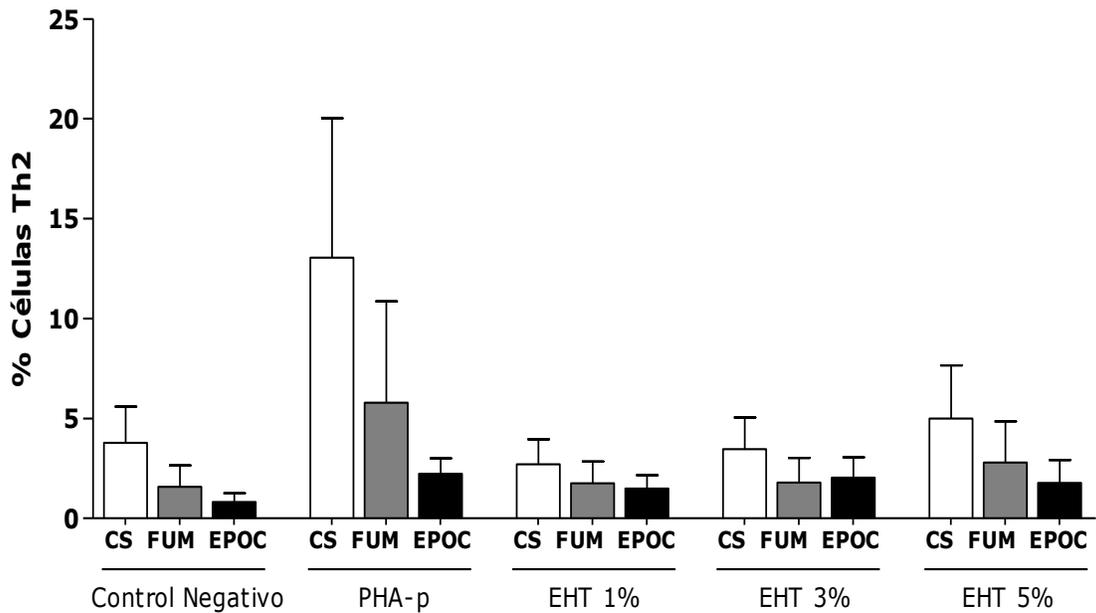
En los cultivos de CMN de pacientes con EPOC (n=4), fumadores (n=4) y controles (n=4), expuestas al EHT no se observaron diferencias significativas en la proporción de células Th1 (Figura 6A).

Se observó un incremento del porcentaje de las células Th2 en los cultivos con cada uno de los diferentes estímulos aplicados a las CMN aisladas de muestras de sanos con respecto a los pacientes con EPOC y fumadores (Figura 6B). Sin embargo, estos incrementos no fueron estadísticamente significativos.

También se observó en los controles sanos, un incremento en la proporción de células Th2, en los ensayos de estimulación con EHT al 1% (mediana= 2.0%), 3% (2.5%) y 5% (3.7%) de concentración (Figura 6B).

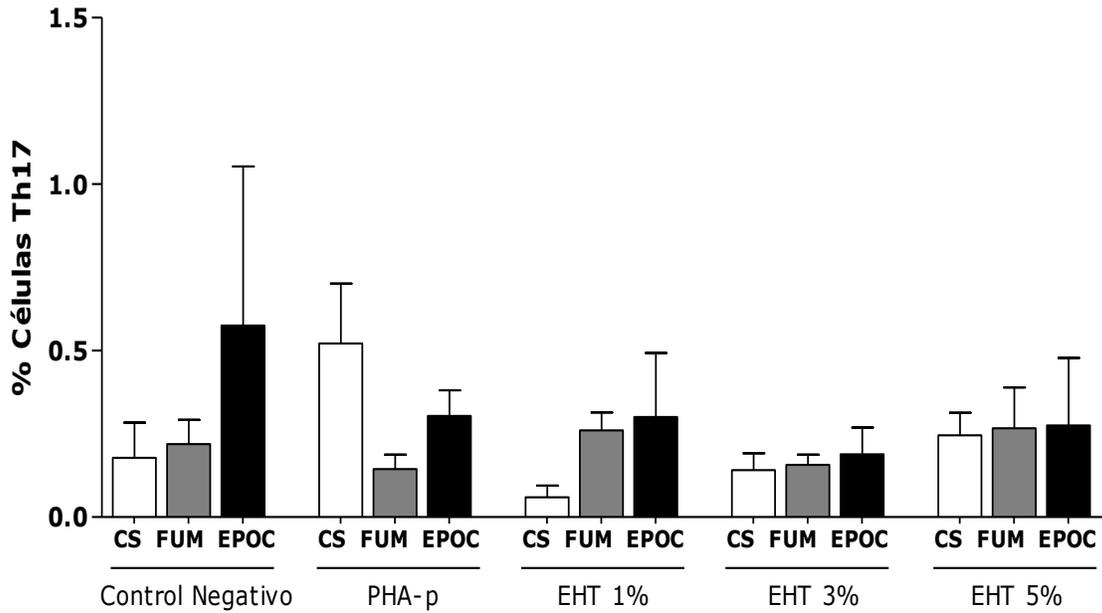
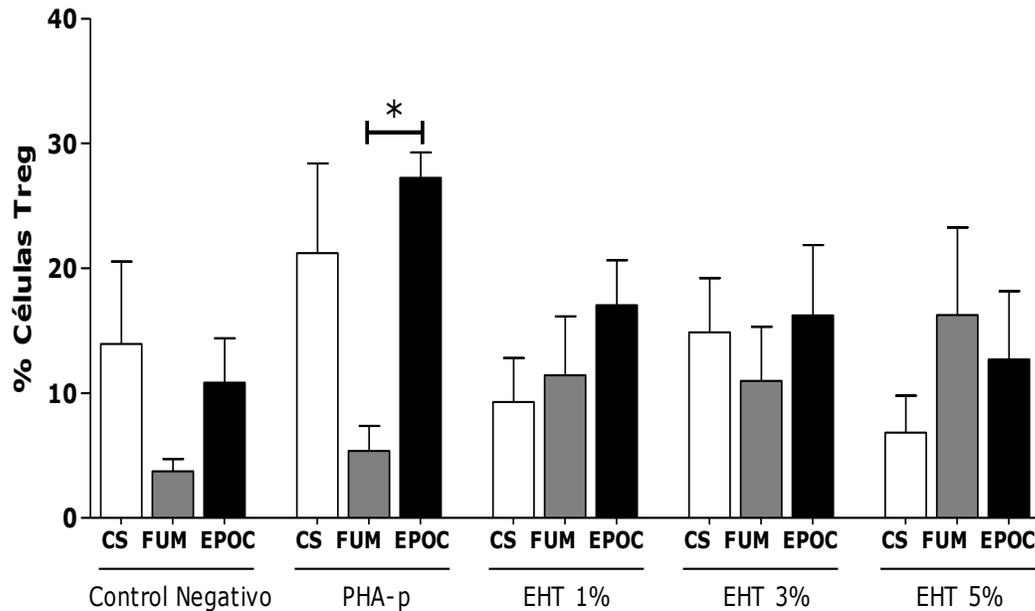
En la figura 7A se muestran los porcentajes de células Th17, en las diferentes condiciones de estimulación (sin estímulo, control positivo PHA-p, EHT 1%, EHT 3% y EHT 5%). Al respecto, no se observaron diferencias importantes en la proporción de estas células entre grupos y diferentes estímulos.

Por último, se observó que el grupo de fumadores tiene una menor proporción de células Treg, en relación con los pacientes con EPOC y controles sanos. En este contexto, la condición de estímulo con PHA-p mostró que los fumadores generan proporciones significativamente bajas de células Treg (5.3%) en relación con los pacientes con EPOC (27.8%) ( $p < 0.05$ ) y controles sanos (17.3%) (Figura 7B).

**A****B**

**Figura 6.** Proporción de células Th1 (A) y Th2 (B) estimuladas por la exposición a humo de tabaco en ensayos *in vitro*.

Pacientes con EPOC (EPOC), fumadores sin EPOC (FUM) y controles sanos (CS), Extracto de humo de tabaco al 1% (EHT 1%), 3% (EHT 3%) y 5% (EHT 5%); PHA-p (control positivo).

**A****B**

**Figura 7.** Proporción de células Th17(A) y Treg (B) estimuladas por la exposición a humo de tabaco en ensayos *in vitro*.

\*Los valores de p fueron determinados mediante la prueba de U de Mann Whitney;  $p < 0.05$  en el grupo de fumadores en comparación con los pacientes con EPOC expuestas al mitógeno PHA-p.

### **7.3.2 Cuantificación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en sobrenadantes de cultivos.**

#### **7.3.2.1 Citocinas Pro-inflamatorias.**

Las concentraciones en pg/ml de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento determinadas en el sobrenadante de cultivos de CMN estimuladas con extractos de humo de tabaco al 1%, 3% y 5%, se muestran en las Figuras 8-10.

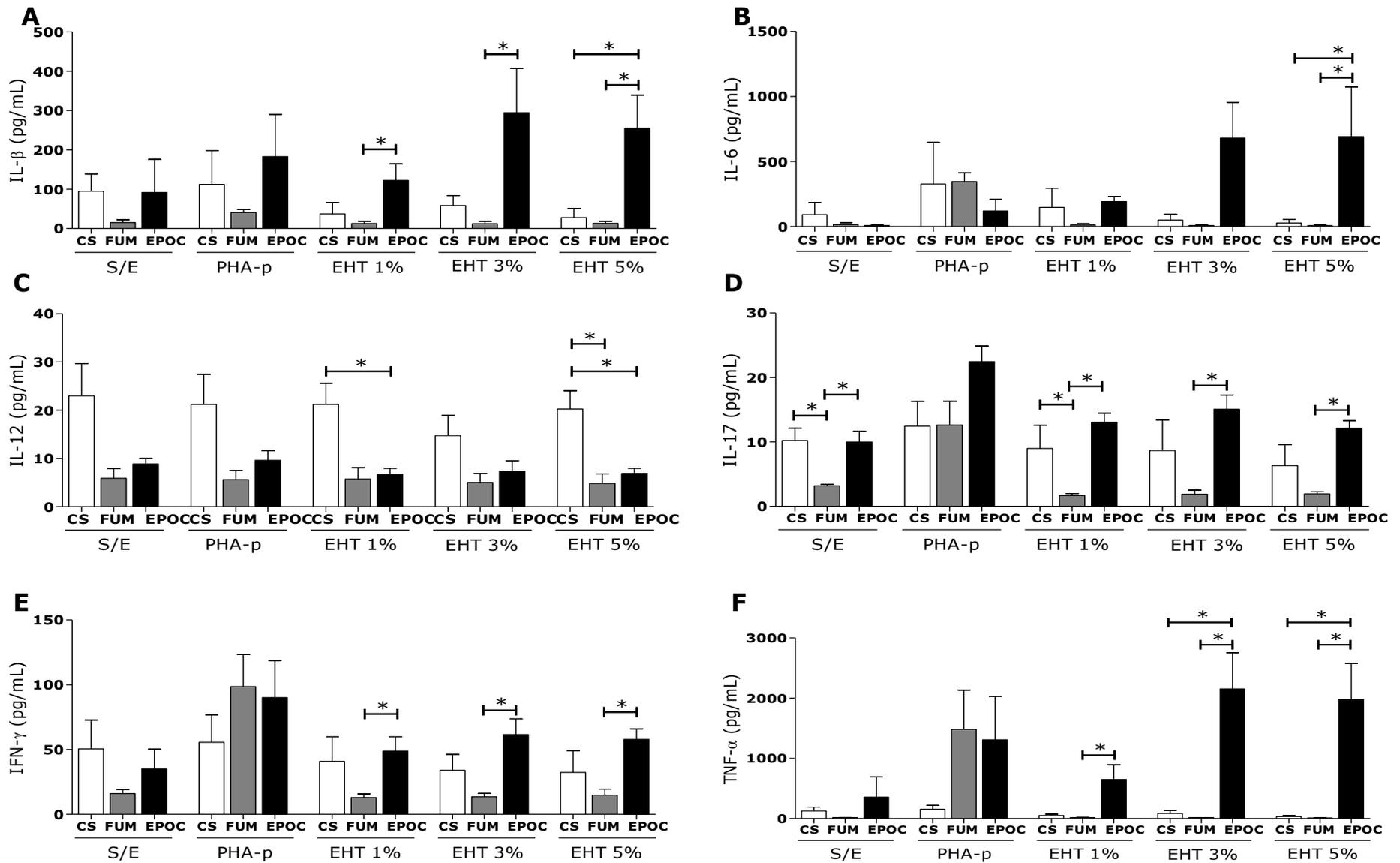
En la Figura 8 se muestran las concentraciones de las citocinas pro-inflamatorias: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . En general, se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración de las citocinas pro-inflamatorias en el grupo de pacientes con EPOC en comparación con los fumadores y controles sanos, al exponer las CMN al EHT al 1, 3 y 5%.

Con respecto a la concentración de IL-1 $\beta$ , se observó un aumento importante en los cultivos de células de pacientes con EPOC estimulados particularmente con EHT al 1% (mediana= 103.1 pg/ml, rango= 237.2-46.0 pg/ml), 3% (245.6 pg/ml, 585.4-102.6) y 5% (228.9 pg/ml, 509.6-60.8) en relación con los fumadores y controles sanos quienes mostraron concentraciones de IL-1- $\beta$  por debajo de 95 pg/ml en esas mismas condiciones ( $p < 0.05$ ) (Figura 8A).

De manera interesante, se observó en los pacientes con EPOC que la concentración de IL-6 incrementa conforme se aumenta la concentración del EHT al cual son expuestas las CMN. Este incremento en la concentración de IL-6 también se observó con respecto a los controles sanos y fumadores. No obstante, únicamente en los cultivos de células de pacientes con EPOC (389.3 pg/ml, 1805.8-172.0) estimulados con EHT 5% se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los fumadores (1.5 pg/ml, 22.4-0.6) y controles sanos (0.3 pg/ml, 109.5-0.01) ( $p < 0.05$ ) (Figura 8B). En contraste, los pacientes con EPOC y los fumadores mostraron una menor producción de IL-12 ( $< 10$  pg/ml en todas las condiciones de estimulación) en relación con los sujetos sanos quienes mostraron concentraciones mayores a 20 pg/ml en promedio (Figura 8C).

Las células del grupo de pacientes con EPOC mostraron un incremento en la producción de IL-17 en comparación con los controles sanos y fumadores ( $p < 0.05$ ) (Figura 8D). Las células de fumadores mostraron un déficit significativo en la producción de IFN- $\gamma$  ( $< 28$  pg/ml) en el estímulo por EHT al 1, 3 y 5% en relación con los pacientes con EPOC, que en promedio, mostraron una producción de IFN- $\gamma$  mayor a 50 pg/ml ( $p < 0.05$ ). Este fenómeno no se observó en la estimulación por PHA-p, condición en la que las células de los tres grupos de estudio mostraron una producción similar de esta citocina. En relación con TNF- $\alpha$  se

observó un marcado incremento en sus concentraciones en cultivos de células de pacientes con EPOC con estímulos de 1% (657.7 pg/ml, 1228.9-42.1), 3% (2033.28 pg/ml, 3652.6-893.13) y 5% de EHT (1474 pg/ml, 4041.0-587.7) en relación con sujetos sanos (<270pg/ml) ( $p < 0.05$ , en CMN estimuladas al 3 y 5% de EHT) y fumadores (<25pg/ml) ( $p < 0.05$ ).

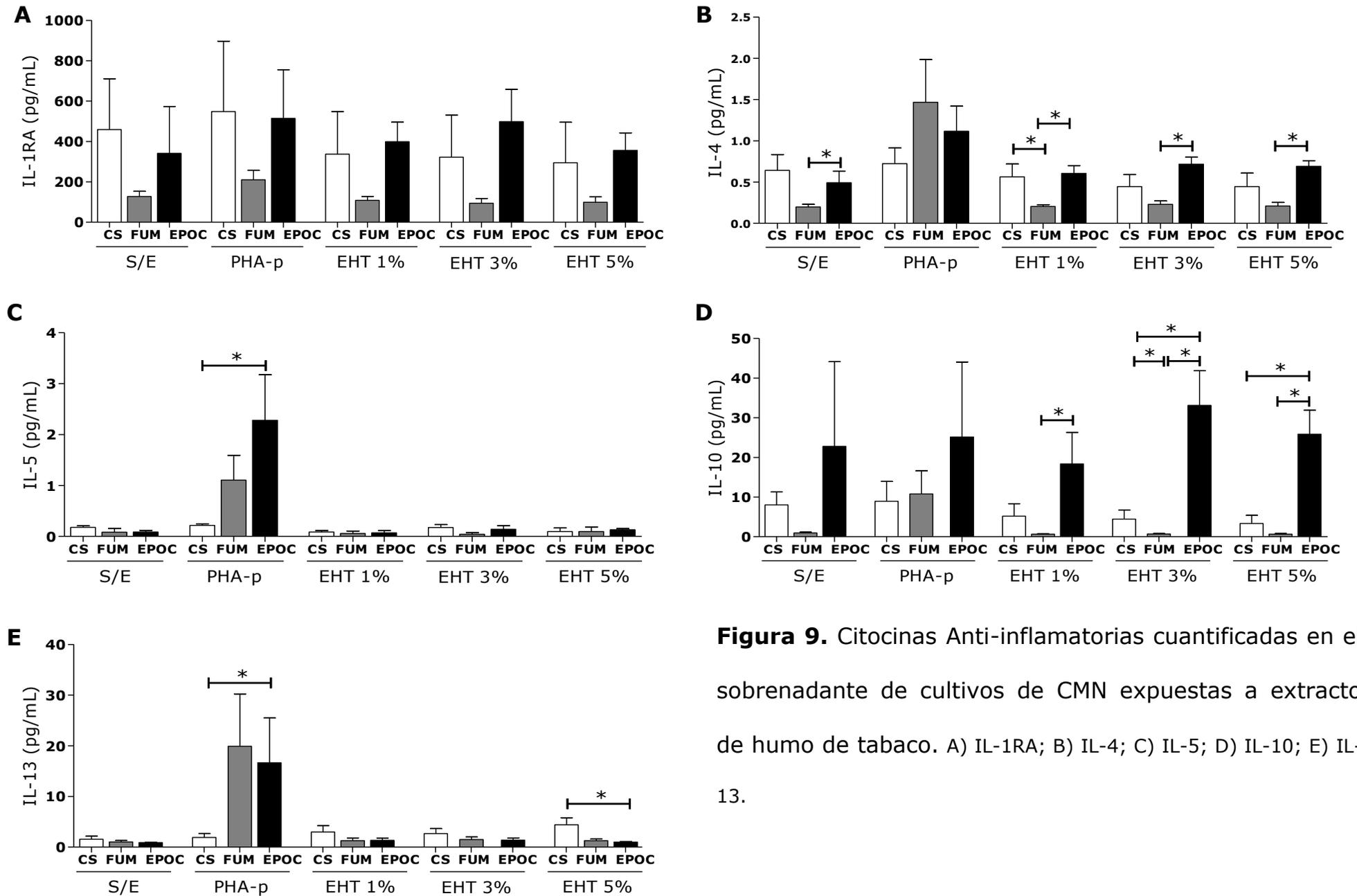


**Figura 8.** Citocinas pro-inflamatorias cuantificadas en el sobrenadante de cultivos de CMN expuestas a extracto de humo de tabaco. A) IL-1 $\beta$ ; B) IL-6; C) IL-12; D) IL-17; E) IFN- $\gamma$ ; F) TNF- $\alpha$ .

### **7.3.2.2 Citocinas Anti-inflamatorias.**

En la Figura 9 se muestran las concentraciones de citocinas anti-inflamatorias (IL-1RA, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) cuantificadas en los sobrenadantes de cultivos de CMN de pacientes con EPOC, fumadores y controles sanos.

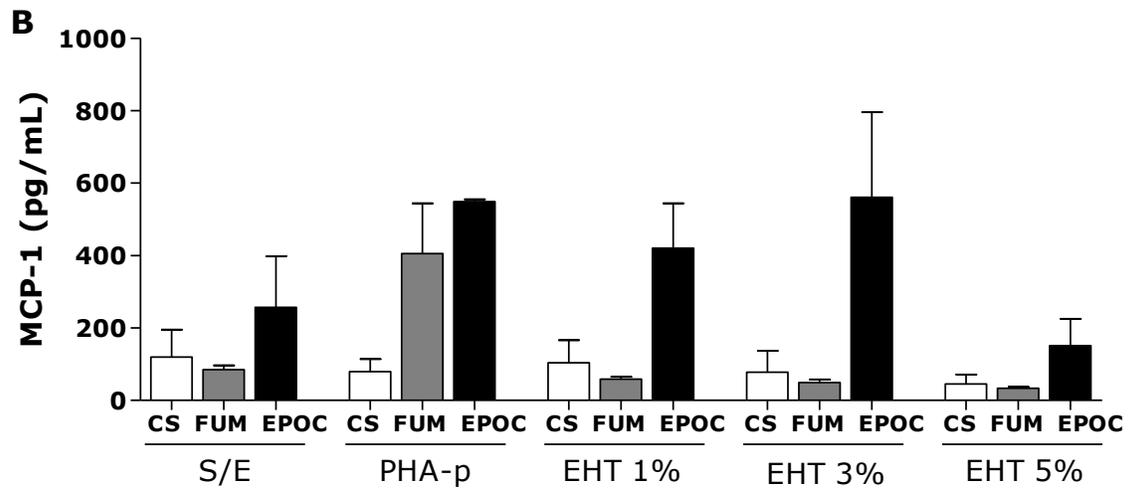
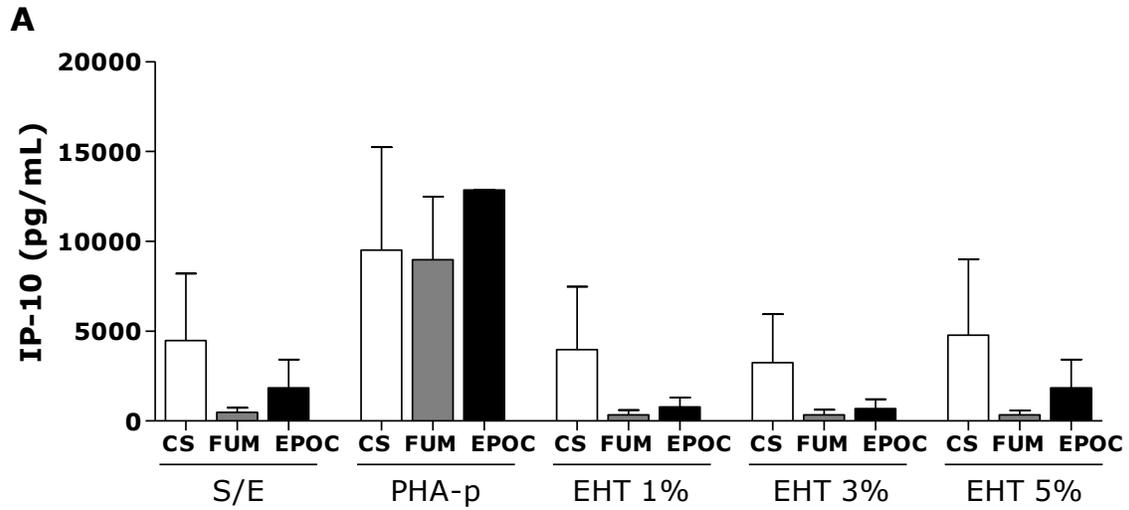
No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de IL-1RA, IL-4, IL-15 e IL-13 entre los diferentes grupos estudiados (Figura 9). No obstante, se observó una mayor producción de IL-10 en los sobrenadantes de cultivos de CMN de pacientes con EPOC expuestas al EHT 1% (14.2 pg/ml, 39.6-5.6), 3% (34.5 pg/ml, 48.6-14.9) y 5% (25.9 pg/ml, 42.7-0.7) al compararse con los controles sanos (2.1 pg/ml; 3.0 pg/ml ( $p < 0.05$ ); 1.5 pg/ml ( $p < 0.05$ ), respectivamente) y fumadores (0.7 pg/ml ( $p < 0.05$ ); 0.8 pg/ml ( $p < 0.05$ ); 0.7 pg/ml ( $p < 0.05$ ), respectivamente). De manera interesante, se observó que las células de fumadores en general producen menor cantidad de IL-1RA, IL-4 e IL-10 (Figuras 9A, 9B y 9D).



**Figura 9.** Citocinas Anti-inflamatorias cuantificadas en el sobrenadante de cultivos de CMN expuestas a extracto de humo de tabaco. A) IL-1RA; B) IL-4; C) IL-5; D) IL-10; E) IL-13.

### **7.3.2.3 Quimiocinas.**

Las quimiocinas cuantificadas en sobrenadantes de cultivos de CMN expuestas a 1,3 y 5% de EHT se presentan de forma gráfica en la Figura 10. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de IP-10 entre pacientes con EPOC y fumadores. Sin embargo, las concentraciones observadas en controles sanos fueron en general mayores, bajo condiciones de estímulo con EHT al 1% (79.9 pg/ml, 17914.9-6.1), 3% (248.6 pg/ml, 13897.4-8.3) y 5% (66.5 pg/ml, 21606.0-3.1). Se observó un marcado aumento en la producción de MCP-1 en cultivos de células de pacientes con EPOC estimulados con EHT al 3% (790.9 pg/ml, 800.9-90.7), en relación con fumadores (41.3 pg/ml, 76.0-37.2) y controles (27.8 pg/ml, 252.1-4.1) (Figura 10).



**Figura 10.** Quimiocinas cuantificadas en el sobrenadante de cultivos de CMN expuestas a extracto de humo de tabaco. A) IP-10; B) MCP-1.

## 8. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han estudiado diversos aspectos de la respuesta inmune humoral y celular que potencialmente podrían contribuir al desarrollo de un proceso inflamatorio crónico inducido por la exposición al humo de tabaco y a gases generados por la combustión de materiales sólidos utilizados como combustibles.

En este trabajo se analizó la proporción de diferentes subpoblaciones de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, así como los perfiles de producción de citocinas *ex vivo* e *in vitro* inducida por extractos de humo de tabaco en CMN, aisladas de muestras de sangre periférica de pacientes con EPOC, fumadores crónicos e individuos sanos. Los principales hallazgos encontrados fueron: 1) la proporción de células Th1, Th2 y Th17 en sangre periférica de pacientes con EPOC son similares a los observados en sujetos sanos y fumadores crónicos. No obstante, los porcentajes de células Treg son mayores en pacientes con EPOC; 2) Los pacientes con EPOC muestran un ligero incremento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$ , y de las quimiocinas IL-8, eotaxina y MCP-1; 3) en ensayos *in vitro* con CMN de pacientes con EPOC, fumadores y controles sanos, el estímulo con EHT no induce diferencias importantes en la proporción de células Th1, Th2, Th17 y Treg; 4) el estímulo con EHT induce una mayor producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17,

TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 y MCP-1 en CMN de pacientes con EPOC, en relación con fumadores e individuos sanos.

Los resultados *ex vivo* indican que a nivel sistémico las proporciones de subpoblaciones de células T efectoras no se ven modificadas por la respuesta pro-inflamatoria, característica de la EPOC, posiblemente porque la activación de linfocitos T ocurre a nivel local. Por lo cual, no se puede descartar que en el pulmón, las proporciones de estas subpoblaciones muestren diferencias importantes. Al respecto, existen estudios que han realizado la caracterización funcional de linfocitos infiltrados en tejido pulmonar y han encontrado una predominante activación de células Th1 y la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo IFN- $\gamma$  [67-69]. En contraste, en muestras de sangre periférica de pacientes con EPOC en comparación con controles sanos, se ha reportado el incremento de células Th1 [69, 70] y una disminución en la proporción de células Th2 [70]. Adicionalmente se ha correlacionado la proporción de células Th2 con parámetros clínicos (FEV1/FVC) asociados a la severidad de la EPOC [70]. No obstante, cabe destacar que existen estudios que respaldan los resultados observados en este trabajo, en los cuales no se encontraron diferencias en las proporciones de células TCD4<sup>+</sup> en sangre periférica [68].

Por otro lado, en este trabajo se observó un incremento en la proporción de células Treg, lo cual sugiere que esta estirpe celular podría ser un marcador importante de la EPOC. Como se ha señalado con anterioridad, la importancia de las células Treg en EPOC es controversial, ya que existen tanto estudios que han reportado la disminución en la proporción de esta estirpe celular, en tejido pulmonar de pacientes con EPOC [63], así como otros estudios que demuestran la existencia de un incremento en la proporción de células Treg, tanto en sangre periférica como en LBA de pacientes con EPOC [71, 72]. Adicionalmente existe evidencia que podría indicar que el incremento en la proporción de células Treg, se debe a alteraciones en la funcionalidad de esta estirpe celular, generando la incapacidad de regular la respuesta de linfocitos T cooperadores y con ello promover una respuesta inflamatoria crónica [64].

En enfermedades autoinmunes, como la arteroesclerosis [73] y artritis reumatoide (AR) [65, 74-76], se ha reportado la existencia de alteraciones en la respuesta mediada por células Treg.

En pacientes con AR se observó un incremento de células Treg en sangre periférica, las cuales eran incapaces de suprimir la función de células T cooperadoras y la producción de citocinas pro-inflamatorias de células T activadas y monocitos [77]. En otro estudio se determinó que el incremento en la proporción de células Treg no estaba correlacionado

con el incremento de la expresión de ARNm deIDO (Indoleamina 2,3-dioxigenasa), en macrófagos CD14<sup>+</sup> [64].IDO es una enzima que inhibe la proliferación de células T, lo cual permite que las células presentadoras de antígeno (CPA) regulen la tolerancia periférica [78, 79]. La producción deIDO es mediada por células Treg a través de la proteína deCTLA-4. Aunque la evidencia es indirecta, estos estudios sugieren que la regulación de la expresión deIDO por las células Treg, puede ser un mecanismo alterado, producto de la patogénesis de la AR. Esto permite pensar que en otras patologías podrían existir modificaciones en las funciones de células Treg. Adicionalmente, se ha reportado la existencia de un SNP (single nucleotide polymorphism) enCTLA-4, asociado a bronquitis crónica [80], lo cual podría indicar que en la EPOC, al igual que en AR existen alteraciones en la funcionalidad de las células Treg.

Otro de los objetivos de este trabajo fue cuantificar citocinas en suero, debido a que son responsables de la inflamación del tracto respiratorio, puesto que promueven la diferenciación y supervivencia de células pro-inflamatorias, así como, la proliferación y/o activación de células epiteliales, contribuyendo al remodelado del tracto respiratorio [81].

En este estudio observamos la sobreproducción de mediadores inflamatorios como IL-6, IL-12, IL-17 y TNF- $\alpha$ , en el suero de los

pacientes con EPOC con respecto a los grupos control, lo cual, en el caso de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17 ha sido previamente reportado [82-86].

Algunas de estas citocinas inflamatorias, en particular TNF- $\alpha$ , estimula en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos, la producción de quimiocinas, promoviendo la infiltración de células inflamatorias, como neutrófilos, al sitio de lesión pulmonar, donde dichas células secretan elastasas que degrada tejido conectivo y con ello provoca la presencia de lesiones tipo enfisema [6, 81, 87]. Así mismo, dichas citocinas estimulan la maduración de células dendríticas, las cuales generarán la activación de células T y con ello serán promotores de la polarización de células TCD4<sup>+</sup> efectoras y promoverán la persistencia del proceso inflamatorio en los pulmones de los pacientes con EPOC [81].

De manera similar a los pacientes con EPOC, el grupo de fumadores mostró niveles periféricos elevados de IFN- $\gamma$ , eotaxina e IP-10 en relación al grupo de sanos. Esto sugiere que tanto, pacientes con EPOC como fumadores tienen un estado inflamatorio a nivel periférico el cual posiblemente es el reflejo de un estado inflamatorio en el tejido pulmonar.

Actualmente el origen de la inflamación sistémica en EPOC se desconoce, pero se cree existen algunos factores asociados a esta respuesta, como la edad avanzada, tabaquismo, obesidad y

enfermedad cardiovascular [88, 89], lo cual podría explicar el incremento en citocinas pro-inflamatorias en fumadores sin EPOC.

La importancia clínica del aumento de mediadores de inflamación sistémica en pacientes con EPOC reside en su asociación con el deterioro de la calidad de vida, riesgo de exacerbaciones [90-92] y posiblemente con el pronóstico de la enfermedad [93,94].

La respuesta inflamatoria sistémica anormal, detectada en los fumadores, sugiere que la exposición al humo de tabaco podría inducir una respuesta pro-inflamatoria. Por esta razón, evaluamos el impacto del humo de tabaco sobre la proporción de células TCD4<sup>+</sup> y la concentración de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento; mediante ensayos *in vitro* de estimulación de CMN de pacientes con EPOC, fumadores y controles sanos, con extractos de humo de tabaco a diferentes concentraciones. De manera interesante observamos que el extracto de humo de tabaco no promueve cambios cuantitativos significativos en el fenotipo de subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Treg y Th17) entre los diferentes grupos, por lo cual debe considerarse en estudios posteriores el incremento de la n de cada grupo en estudio, ya que es evidente que el número de ensayos realizados no permitió establecer diferencias en las proporciones de células TCD4<sup>+</sup>.

No obstante, el estímulo con extracto de humo de tabaco induce diferencias en la producción de citocinas y quimiocinas, entre los diferentes grupos en estudio. Entre ellas observamos un marcado incremento en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y MCP-1 en CMN de pacientes con EPOC estimuladas con EHT a diferentes concentraciones. Estos hallazgos apoyan en parte nuestra hipótesis de que la exposición al humo de tabaco genera una respuesta inflamatoria mediada por citocinas. Así mismo estos resultados respaldan las observaciones en el incremento de mediadores inflamatorios en sangre periférica.

Existen estudios que respaldan los hallazgos de este trabajo, pues se ha reportado, la existencia de concentraciones elevadas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en secreción respiratoria de pacientes con EPOC [95]. Adicionalmente se ha reportado que las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y MCP-1 se encuentran elevadas en secreciones respiratorias de fumadores crónicos [96]. Por otro lado, se ha observado que los macrófagos alveolares de fumadores crónicos y de pacientes con EPOC producen altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  y la citocina anti-inflamatoria IL-10 [97].

Aunque en este trabajo no analizamos muestras respiratorias de sujetos con EPOC, fumadores o sanos, los marcadores observados en sangre periférica y en los ensayos *in vitro*, permiten establecer que la

producción de citocinas en pacientes con EPOC y fumadores en buena medida es por el efecto inflamatorio directo del humo de tabaco aunque en general, los pacientes con EPOC muestran un estado más inflamatorio en relación con fumadores asintomáticos y estos a su vez en relación con no fumadores sanos.

Una limitación de este trabajo es el tamaño de la muestra, lo cual no permitió en los ensayos *in vitro* realizar una asociación entre la severidad de la enfermedad y los parámetros aquí medidos, sin embargo es importante resaltar que los pacientes con EPOC incluidos fueron seleccionados por un grupo de neumólogos expertos en el manejo de la enfermedad en el INER y no tuvieron co-morbididades adicionales.

## 9. CONCLUSIÓN

Los pacientes con EPOC y los fumadores muestran un incremento en la concentración de mediadores inflamatorios (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-17 en pacientes con EPOC e IFN- $\gamma$ , IP-10 y eotaxina en fumadores) en relación con los sujetos sanos.

Por otro lado, se encontró un mayor porcentaje de células Treg en los pacientes con EPOC, sin embargo, no hay diferencias significativas en la distribución de células Th1, Th2 y Th17 periféricas entre los grupos en estudio.

La estimulación *in vitro* de células con extracto de humo de tabaco induce la producción de mayores concentraciones de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias (MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) en CMN de pacientes con EPOC. Adicionalmente el estímulo con extracto de tabaco no causa cambios cuantitativos importantes en el porcentaje de células Th1, Th2, Treg y Th17 entre los diferentes grupos. En este contexto podemos señalar que la elevada producción de mediadores inflamatorios inducida por la exposición al humo de tabaco podría tener un papel importante en la fisiopatogenia de la EPOC y en la generación de un estado crónico de inflamación en fumadores.

## 10. APÉNDICES

### Preparación de soluciones

1.- Solución fijadora P-formaldehído 3%.

- Pesar 3 g de P-formaldehído.
- Colocar en 90 ml de PBS.
- Solubilizar.
- Calentar a 70°C durante 1 hora.
- Ajustar el pH 7.2-7.4 con HCl 0.1 M.
- Aforar a 100 ml.

2.- PBA

- Pesar  $\text{NaN}_3$  0.1 g (0.1% vol/vol)
- Agregar 100 ml de PBS
- Pesar 1.0 g BSA (1.0% w/vol)
- Solubilizar
- Ajustar el pH 7.2-7.4
- Filtrar (#41 Fast)
- Refrigerar a 4°C

3.- RPMI 1640 suplementado

Para preparar RPMI suplementado se debe agregar cada uno de los siguientes componentes en el porcentaje indicado en la tabla, en la cual se muestra un ejemplo para preparar 100 ml de RPMI suplementado

	Porcentaje (%)	Volumen total= 100 ml
RPMI 1640	86.4	86.4 ml
aminoácidos esenciales	0.5	0.5 ml
aminoácidos no esenciales	1.0	1.0 ml
Piruvato	1.0	1.0 ml
L-glutamina	0.1	0.1 ml
HEPES	1.0	1.0 ml
Antibióticos	1.0	1.0 ml
Suero Fetal Bovino	10	10 ml

Posteriormente se debe realizar prueba de esterilidad de los componentes individuales y el RPMI suplementado.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:532-555.
2. Bruce N, Perez-Padilla R, Albalak R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bull World Health Organ* 2000; 78:1078-1092.
3. World Health Organization. November 2009. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Fact Sheet N°315. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs315/en/print.html> [Con acceso el 2/12/11].
4. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23:932-946
5. Banerjee S, Chattopadhyay R, Ghosh A, et al. Cellular and molecular mechanisms of cigarette smoke-induced lung damage and prevention by vitamin C. *J Inflamm (Lond)* 2008; 11:5-21
6. Cosio MG, Saetta M, Agustí A. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Disease. *N Engl J Med* 2009; 360:2445-2454.
7. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*

2008; 31:1334–1356.

8. Agusti A, MacNee W, Donaldson K, et al. Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component?. *Thorax* 2003; 58:832–834.

9. Eisner MD, Balmes J, Katz PP, et al. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health* 2005; 4:7.

10. Leuenberger P, Schwartz J, Ackermann-Liebrich U, et al. Passive smoking exposure in adults and chronic respiratory symptoms (SAPALDIA Study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults, SAPALDIA Team. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1222-1228.

11. Dayal HH, Khuder S, Sharrar R, et al. Passive smoking in obstructive respiratory disease in an industrialized urban population. *Environ Res* 1994; 65:161-171.

12. Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350:630-633.

13. Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, et al. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:542-546.

14. Sezer H, Akkurt I, Guler N, et al. A case-control study on the effect of exposure to different substances on the development of COPD. *Ann*

*Epidemiol* 2006; 16:59-62.

15. Eriksson S. Pulmonary Emphysema and alpha1-Antitrypsin Deficiency. *Acta Med Scand* 1964; 175:197-205.

16. Axelsson U, Laurell CB. Hereditary variants of serum alpha-1-antitrypsin. *Am J Hum Genet* 1965; 17:466-472.

17. DeMeo DL, Silverman EK. Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 2004; 59:259-264.

18. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005; 365:2225-2236.

19. Fregonese L, Stolck J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3:16.

20. Agustí A, Celli B. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. 1ª ed. Barcelona, España. Elsevier, 2005.

21. Cabrera Navarro P, Rodríguez de Castro F, Freixinet Gilart J, et al. Manual de Enfermedades Respiratorias. 2ª ed. Las Palmas de Gran Canaria, España. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, 2005. 101-125.

22. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22:672-688.

23. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, et al. Systemic effects of chronic

obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21:347-360.

24. Reynales SL, Shamah LT, Gómez-Humarán MI, et al. Organización Panamericana de la Salud; Instituto Nacional de Salud Pública (MX). Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos. México 2009. Instituto Nacional de Salud Pública. Coeditado con la Organización Panamericana de la Salud, 2010. Disponible en: <[http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/pie/GATS\\_2009.pdf](http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/pie/GATS_2009.pdf)> [Con acceso el 15/01/11].

25. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Demografía y población, Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2008. Disponible en: <<http://www.inegi.org.mx/Sistemas/temasV2/Default.aspx?s=est&c=17484>> [Con acceso el 16/02/11].

26. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28:523-532.

27. Soriano JR, Maier WC, Egger P, et al. Recent trends in physician diagnosed COPD in women and men in the UK. *Thorax* 2000; 55:789-794.

28. Himes BE, Dai Y, Kohane IS, et al. Prediction of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in asthma patients using electronic medical records. *J Am Med Inform Assoc* 2009; 16:371-379.

29. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26:948-968.

30. Hardie JA, Buist AS, Vollmer WM, et al. Risk of over-diagnosis of

COPD in asymptomatic elderly never-smokers. *Eur Respir J* 2002; 20:1117-1122.

31. Stedman RL. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 1968; 68:153-207.

32. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:512-521.

33. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol* 2009; 157:316-324.

34. Cosío BG, Agustí A. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Arch Bronconeumol* 2005; 41:10-14.

35. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, et al. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:156-163.

36. Seok CH and Seung-Hyo L. Role of Th17 cell and autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease. *Immune Netw* 2010; 10:109-114.

37. Lee SH, Goswami S, Grudo A, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13:567-569.

38. Shan M, Cheng HF, Song LZ, et al. Lung myeloid dendritic cells

coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema. *Sci Transl Med* 2009; 1:4ra10.

39. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther* 2008; 10:206.

40. Lane N, Robins AR, Corne J, et al. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells. *Clin Sci (Lon)* 2010; 119:75-86.

41. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, et al. Association of increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD. *Thorax* 2009; 64:968-975.

42. Shibata K, Yamada H, Hara H, et al. Resident V $\delta$ 1+ $\gamma$  $\delta$  T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol* 2007; 178:4466-4472.

43. Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, et al. Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol Lett* 2008; 121:13-21.

44. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1037-1046.

45. Wolk K, Witte E, Warszawska K, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological

cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* 2009; 39:3570-3581.

46. Zenewicz LA and Flavell RA. IL-22 and inflammation: leikin' through a glass onion. *Eur J Immunol* 2008; 38:3265–3268.

47. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, et al. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010; 207:1293-1305.

48. Calikoglu M, Sahin G, Unlu A, et al. Leptin and TNF- $\alpha$  levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease and their relationship to nutritional parameters. *Respiration* 2004; 71:45–50.

49. Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM, et al. The role of TNF- $\gamma$  and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun* 2001; 3:188–199.

50. O'Garra A and Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10:801–805.

51. Belkaid Y and Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6:353–360.

52. Schnedier MA, Meingasser JG, Lippo M, et al. CCR7 is required for the *in vivo* function of CD4 CD25 regulatory T cells. *J Exp Med* 2007; 204:735–745.

53. Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:949–959.

54. Mak JC, Chan-Yeung MM, Ho SP, et al. Elevated plasma TGF- $\beta$ 1

levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Resp Med* 2009; 103:1083–1089.

55. D'Armiento JM, Scharf SM, Roth MD, et al. Eosinophil and T cell markers predict functional decline in COPD patients. *Respir Res* 2009; 10:113.

56. Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, et al. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 2009; 182:6121–6128.

57. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* 2007; 37:3021–3029.

58. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, et al. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 2008; 181:6898–6905.

59. Couper KN, Blount DG and Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180:5771–5777.

60. Stumhofer J, Silver J and Hunter C. Negative regulation of Th17 responses. *Semin Immunol* 2007; 19:394–399.

61. Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, et al. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest* 2007; 132:156–163.

62. Plumb J, Smyth LJ, Adams HR, et al. Increased T regulatory cells

within lymphocyte follicles in moderate COPD. *Eur Respir J* 2009; 34:89–94.

63. Isajevs S, Taivans I, Strazda G, et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J* 2009; 33:61-67.

64. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, et al. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140:360-367.

65. Wooten OJ, Dulfano MJ. Improved homogenization techniques for sputum cytology counts. *Ann Allergy* 1978; 41:150-154.

66. Ouyang Y, Virasch N, Hao P, et al. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 160:280-287.

67. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1:75–83.

68. Barceló B, Pons J, Fuster A, et al. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 145:474-479.

69. Hodge G, Nairn J, Holmes M, et al. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood,

bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol* 2007; 150:22-29.

70. Majori M, Corradi M, Caminati A, et al. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:458-462.

71. Barceló B, Pons J, Ferrer JM, et al. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2008; 31:555-562.

72. Domagala-Kulawik J and Maskey-Warzecowska M. T-regulatory cells in COPD or tumour environment. *Eur Respir J* 2009; 34:284.

73. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, et al. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199:971-979.

74. Bluestone JA and Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; 17:638-642.

75. Jiang H and Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354: 1166-1176.

76. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12:178-180.

77. Ehrestein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF- $\alpha$

therapy. *J Exp Med* 2004; 200:277–285.

78. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*. *Nat Immunol* 2002; 3:1097–1101.

79. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:1206–1212.

80. Zhu G, Agusti A, Gulsvik A, et al. CTLA4 gene polymorphisms are associated with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 2009; 34:598-604.

81. Toews GB, Kunkel SL, Kelley J, et al. Cytokines in pulmonary disease infection and inflammation. New York, USA. Marcel Dekker. 2000, Volume 141, 1-50, 83-107p.

82. Attaran D, Lari SM, Towhidi M, et al. Interleukin-6 and airflow limitation in chemical warfare patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2010; 5:335-340.

83. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59:574-580.

84. De Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, et al. Elevated TNF- $\alpha$  production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:633–637.

85. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, et al. Tumor necrosis factor levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1453–1455.

86. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1179–1184.
87. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008; 118:3546-3556.
88. Morales SA, Dreyse DJ, Díaz PO, et al. Systemic inflammation among stable ex smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Med Chil* 2010; 138:957-964.
89. Broekhuizen R, Wouters EFM, Creutzberg EC, et al. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006; 61:17-22.
90. Groenewegen KH, Postma DS, Wim C, et al. Increased systemic inflammation is a risk factor for COPD exacerbations. *Chest* 2008; 133:350-357.
91. Pinto-Plata V, Livnat G, Girish M, et al. Systemic Cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbations *Chest* 2007; 131:37-43.
92. Parera WR, Hurst JR, Wilkinson TMA, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29:527-534.
93. Walter RE, Wilk JM, Larson MG, et al. Systemic inflammation and

COPD. The Framingham heart study. *Chest* 2008; 133:19-25.

94. Fogarty AW, Jones S, Britton JR, et al. Systemic inflammation and decline in lung function in a general population: a prospective study. *Thorax* 2007; 62:515-20.

95. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, et al. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:530-534.

96. Lim S, Roche N, Oliver BG, et al. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1355-1360.

97. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, et al. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 1996; 9:1989-1994.