



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

INMUNOREGULACIÓN EN  
NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha permitido consolidar mi formación profesional como investigador.

Agradezco también el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido mediante la beca de posgrado que me otorgó y gracias a la cual me fue posible dedicarme de tiempo completo al desarrollo del programa de estudios de posgrado.

Del mismo modo agradezco a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca que me fue otorgada durante la realización de mis estudios

Este proyecto fue apoyado por el Macroproyecto:  
Universidad Nacional Autónoma de México, SDI.PTID. 05.6

***Agradezco de manera muy especial a los miembros de mi comité tutorial por su guía incondicional y asesoría para concluir de manera exitosa mis estudios de posgrado.***

**Tutor principal:** Dr. Moisés Eduardo Selman Lama

**Comité Tutorial:** Dra. Annie Pardo Semo  
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

---

---

**Los resultados de esta tesis se publicaron en:**

*Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis.*  
Am J Respir Crit Care Med 177:44-55, 2008.

## Tabla de contenido

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1 Antígenos responsables .....	6
1.2 Epidemiología .....	7
1.3 Patogénesis .....	8
1.3.1 Factores promotores .....	8
1.3.2 Susceptibilidad genética y NH .....	9
1.3.3 Factores ambientales y NH .....	10
1.3.4 Mecanismos de daño pulmonar .....	12
1.3.5 La conexión con la fibrosis .....	14
1.3.6 Histopatología de la NH .....	15
<b>RESUMEN</b> .....	<b>17</b>
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>18</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>VI. MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
6.1 Población de estudio .....	20
6.2 Lavado bronquioalveolar .....	21
6.3 Anticuerpos .....	21
6.4 Determinación de los fenotipos de superficie de linfocitos T por citometría de flujo .....	22
6.5 Tinción celular .....	22
6.6 Cultivo celular .....	23
6.7 Determinación de citocinas y quimiocinas .....	23
6.8 Inmunohistoquímica .....	24
6.9 Determinación de la expresión del marcador CD107 a/b .....	25
6.10 Citometría de flujo .....	25
6.11 Análisis estadístico .....	25
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
7.1 Características demográficas de los grupos de pacientes .....	27
subagudos y crónicos .....	27
7.2 Seguimiento de pacientes con NH .....	27
7.3 Análisis de la relación CD4+/CD8+ .....	28
7.4 Linfocitos T CD4 y CD8 de memoria .....	29
7.5 Análisis funcional de células T de memoria CD4+ y CD8+ .....	30
7.6 Linfocitos T $\gamma\delta$ , NK y NKT en lavados bronquioalveolares .....	30
7.7 Perfil Th1/Th2 en células obtenidas de lavados bronquioalveolares .....	31
7.8 Cuantificación del factor de crecimiento transformante beta .....	34
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>44</b>

<b>XI. ANEXOS .....</b>	<b>52</b>
Tabla 1. Fuentes y antígenos involucrados en Neumonitis por Hipersensibilidad.....	53
Tabla 2. Características demográficas y funcionales de los pacientes estudiados .....	55
Tabla 3. Distribución de las subpoblaciones vírgenes y de memoria en las células T de lavado bronquioalveolar y sangre periférica en controles y pacientes con NH subaguda y crónica .....	56
Figura 1. Relación CD4/CD8 de controles, pacientes subagudos y crónicos.....	57
Figura 2. Perfil fenotípico de las subpoblaciones de memoria en células T CD4+ y CD8+ determinado por citometría de flujo.....	58
Figura 3. Ensayo funcional de células T de LBA efectoras y TEMRA.....	59
Figura 4. Liberación de perforina y su correlación con la expresión del marcador de superficie CD107 en células de LBA .....	60
Figura 5. Células T $\gamma\delta$ y $\gamma\delta$ intrepiteliales de LBA.....	61
Figura 6. Expresión de CXCR3, CCR5, CXCR4 y CCR4 en células de LBA de controles, pacientes con NH subaguda y crónica .....	62
Figura 7. Concentraciones de P-10/CXCL10, MIG/CXCL9, RANTES/CCL5 y TARC/CCL17 .....	63
Figura 8. Inmunolocalización de IP-10/CXCL10 y MIG/CXCL9 en pulmones con NH.....	64
Figura 9. Expresión intracelular de citocinas en células T de LBA de pacientes con NH subaguda y crónica .....	65

## INTRODUCCIÓN

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) o alveolitis alérgica extrínseca es un síndrome pulmonar complejo de intensidad y presentación clínica variable que resulta de una respuesta inmune exagerada a una amplia variedad de antígenos inhalados (1, 2). Los agentes causales incluyen un amplio espectro de proteínas de aves y mamíferos, hongos, bacterias y algunos compuestos químicos de bajo peso molecular (Tabla 1). Una de las causas frecuentes de NH, y de hecho la más común en México, es la exposición a proteínas de aves como palomas, pichones, pericos y canarios entre otros, que produce lo que se conoce como el “pulmón de los cuidadores de aves” (1).

La presentación clínica es heterogénea: la NH se puede presentar en forma aguda, subaguda o crónica, dependiendo, de factores como la intensidad de exposición al antígeno ó el tipo de respuesta inmune (1,2). Dadas la gran variabilidad de presentaciones y de curso clínico, se han propuesto otras clasificaciones, por ejemplo, la que divide a la enfermedad en activa intermitente no progresiva, aguda intermitente progresiva y crónica tanto progresiva como no progresiva, (3). Sin embargo, la clasificación más utilizada es la de presentación aguda, subaguda y crónica.

La forma aguda se produce generalmente después de la exposición intensa a cantidades masivas del antígeno en un corto período de tiempo. Los síntomas y signos clínicos aparecen abruptamente al cabo de 4 a 8 horas de la inhalación y se caracterizan por disnea intensa, fiebre, y tos, los que habitualmente desaparecen en pocos días si no hay nuevo contacto. Esta forma clínica puede ser difícil de identificar ya que los síntomas pueden confundirse con una infección bacteriana o viral.

La forma subaguda generalmente ocurre tras inhalaciones continuas pero no masivas del agente causal. Los síntomas aparecen de forma insidiosa durante unas semanas y consisten en malestar general, astenia, pérdida de peso, tos seca, pero a veces también productiva, y disnea que puede llegar a ser severa con cianosis e incluso, requerir hospitalización. Es importante destacar que la forma subaguda puede evolucionar en un porcentaje variable a la forma crónica si el paciente sigue teniendo contacto con el antígeno.

Finalmente, la forma crónica se caracteriza por disnea de esfuerzo lentamente progresiva tos, fatiga y pérdida de peso, con ausencia de episodios agudos. En general ocurre en individuos que se encuentran expuestos de manera crónica a la inhalación de pequeñas cantidades de antígenos, como por ejemplo, aquellos que tienen en sus hogares aves de ornato. En esta fase, la enfermedad es clínicamente indistinguible de la de una fibrosis pulmonar de cualquier otra etiología. En este estadio, la eliminación de la exposición al agente causal puede producir la estabilización o una discreta mejoría sintomática, pero la mayoría progresa y fallece de la enfermedad en un promedio de 5 a 10 años después del diagnóstico (4-6).

### **Antígenos responsables**

Como se puede apreciar en la tabla 1, existen numerosos antígenos capaces de causar neumonitis por hipersensibilidad. Estos agentes etiológicos se pueden clasificar en tres categorías: microorganismos (bacterias, hongos y amebas), proteínas animales y compuestos químicos de bajo peso molecular (ej. isocianatos y anhídridos ácidos). Entre los microorganismos, las bacterias termofílicas desempeñan un papel importante en el desarrollo del pulmón del granjero y la bagazosis entre otras NH.

Los antígenos capaces de inducir neumonitis por hipersensibilidad tienen algunas características que los diferencian de aquellos que inducen otras enfermedades como el

asma, tales como su tamaño, solubilidad, naturaleza particulada y su capacidad de producir, además de la respuesta inmunológica, una respuesta inflamatoria inespecífica. Desde el punto de vista aerodinámico deben tener un tamaño entre 1 y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que les permite alcanzar los espacios alveolares. Además, son antígenos que se comportan como potentes adyuvantes en la respuesta inmunológica, pueden activar la cascada del complemento por la vía alterna, estimular a los macrófagos y la respuesta celular retardada. Por último, suelen ser resistentes a la degradación enzimática (ej. mucina intestinal de la paloma).

Como se mencionó previamente, en México, la causa más frecuente de esta enfermedad se relaciona con la exposición a diferentes tipos de aves. El padecimiento parece ser frecuente y aunque la magnitud del problema en el país no se conoce con precisión, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se atienden en promedio 70 a 80 casos nuevos por año, y se reciben solicitudes de interconsulta adicional de un número similar de pacientes (7). De manera relevante, los pacientes con NH aguda o subaguda generalmente responden al manejo terapéutico mientras que los pacientes con NH en su forma crónica, evolucionan frecuentemente con una destrucción irreversible del pulmón por fibrosis.

## **Epidemiología**

Como se mencionó anteriormente, la prevalencia de neumonitis por hipersensibilidad no se conoce con precisión. Las dos formas más frecuentes de NH son el pulmón del granjero y el de los cuidadores de aves (Tabla 1). Los estudios epidemiológicos relacionados con el pulmón del granjero indican que su prevalencia puede alcanzar el 0.5-3% de los sujetos expuestos (8). Por otro lado, algunos estudios antiguos señalan que la prevalencia de NH en individuos que inhalan proteínas aviarias oscila entre 20 a 40 por 100,000 sujetos en riesgo (9,10). Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad en personas expuestas a unas pocas aves en casa, forma muy común de exposición en México, se desconoce.



Es importante señalar que dada la amplia variedad y ubicuidad de los agentes etiológicos, muchos individuos están en riesgo de exposición en sus ambientes laborales, domésticos o de recreación. Dos razones pueden explicar esta observación: a) La enfermedad no es reconocida y por lo tanto es subdiagnosticada y b) La presencia de otros factores ambientales y/o genéticos (factores promotores) es necesaria para provocar el desarrollo de la enfermedad (11).

### **Patogénesis**

La NH es muy probablemente, resultado de un doble proceso, es decir que, además del antígeno inhalado, existen cofactores que facilitan su desarrollo. Sin embargo estos factores promotores no han sido identificados.

#### ***Factores promotores***

Un gran número de individuos están expuestos a factores de riesgo etiológicos pero sólo unos cuantos desarrollan la enfermedad, por lo que es evidente que existen factores de riesgo independientes que deben de estar implicados. Debido a esto, la NH debe considerarse como una enfermedad multifactorial, resultado del efecto de la exposición a partículas orgánicas así como a otros factores ambientales o del huésped y a la susceptibilidad genética.

#### ***Susceptibilidad genética y NH***

Los posibles genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad han sido muy poco explorados, y se han enfocado fundamentalmente al complejo principal de histocompatibilidad (CPH) así como a algunas citocinas. En este contexto, diversos alelos y haplotipos del CPH clase II se han relacionado con la susceptibilidad hacia la NH (HLA-

DRB1\*1305/HLA-DQB1\*0501) o bien con la resistencia a la misma (HLA-DRB1\*0802) en pacientes mexicanos con neumonitis inducida por antígeno aviario (12).

Las secuencias del MHC clase II muestran un alto grado de variabilidad en la región que codifica para los aminoácidos que conforman el sitio de unión al péptido. Esto restringe la presentación del antígeno a las células T cooperadoras y regula la magnitud de la respuesta inmune subsecuente. Además, los péptidos específicos del CPH clase II pueden determinar la extensión de la respuesta inmune a través de la activación de las células T reguladoras (supresoras). Así, algunos alelos de la clase II de este complejo pueden contribuir a la susceptibilidad hacia la NH induciendo una respuesta inmune exagerada a los antígenos.

Se han estudiado también los polimorfismos del promotor del factor de necrosis tumoral alfa (Tumoral necrotic factor- $\alpha$  [TNF- $\alpha$  por sus siglas en inglés]) así como en el intron 1 del gen del TNF- $\alpha$  en pacientes con NH (9). El alelo TNF- $\alpha$ 2, que es un genotipo asociado con el incremento de la expresión del TNF- $\alpha$ , se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes con la enfermedad del granjero comparado con sujetos control o pacientes con la enfermedad de los cuidadores de paloma. Sin embargo, un estudio más reciente no confirma esta asociación así como tampoco alguna otra con genes de citocinas incluyendo a la interleucina 10 [(IL-10) (-592C/A, -819C/T, -1082G/A)], el factor de crecimiento transformante beta 1 [(Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ 1) por sus siglas en inglés) (-509C/T, +869T/C)], e IL-6 (-634C/G) en pacientes con la enfermedad de los cuidadores de paloma (13, 14).

### ***Factores ambientales y NH***

Se han identificado al menos dos factores de tipo ambiental que pueden contribuir al desarrollo de la NH como factores promotores: las infecciones virales, y la exposición a otro agente agresor. Modelos experimentales de NH han mostrado que animales que han sido

retados con el virus sincitial respiratorio o con el virus de Sendai presentan una respuesta inflamatoria más severa secundaria a la exposición a *Saccharopolyspora rectivirgula*, la cual puede persistir tiempo después de que la infección viral ha cedido (15,16). Asimismo, estudios en humanos han revelado que los virus respiratorios comunes, principalmente el virus de la influenza tipo A, se encuentra frecuentemente en las vías respiratorias bajas en pacientes con NH (17).

Las razones por las cuales las infecciones virales pueden potenciar el desarrollo de la NH se desconocen, sin embargo pueden estar relacionadas con la disfunción mucociliar inducida por el virus así como con un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras por macrófagos alveolares y en la secreción de quimiocinas que a su vez aumentan el reclutamiento de linfocitos en el pulmón (18,19).

La exposición a un segundo agente patógeno puede también tener un papel importante como un factor promotor. En un estudio antiguo que abarcó a dos familias con varios miembros afectados por la enfermedad, se observó que antes de desarrollar la enfermedad ambas familias utilizaban un isómero gamma de hexaclorobenceno para erradicar plagas de ácaros en aves infestadas (19). Recientemente, se ha sugerido que la exposición a pesticidas principalmente organocloruros y carbamatos, pueden ser un factor potencial para la enfermedad del granjero (20).

Algunos procesos propios del hospedero pueden también contribuir como un factor de riesgo a desarrollar NH. El reconocimiento de células fetales en tejidos y en la sangre materna (microquimerismo fetal), después del embarazo ha abierto un nuevo campo de investigación. A pesar de que las implicaciones del microquimerismo en patología humana son aún controvertidas, se ha sugerido que algunas enfermedades autoinmunes que ocurren comúnmente en mujeres en etapa reproductiva o posterior a ella, podrían ser en realidad

enfermedades alo-inmunes (21,22). Un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio proporcionó evidencia del incremento en la frecuencia de células microquiméricas en pacientes con NH y su presencia en pulmones (23). Las células microquiméricas eran principalmente macrófagos y linfocitos CD4+ y CD8+, lo que sugiere que pueden participar en la reacción exagerada que caracteriza a esta enfermedad. Sin embargo, el papel específico de estas células fetales microquiméricas en NH se desconoce, a pesar de que parece incrementar la severidad de la enfermedad.

### ***Mecanismos de daño pulmonar***

La respuesta local exagerada a antígenos involucra procesos celulares y humorales (24,25). Se ha sugerido que el daño al tejido epitelial en episodios agudos se debe a la formación de complejos inmunes, lo cual puede explicar los síntomas que se presentan entre 4 a 8 horas después de la exposición al antígeno, situación similar a la que se observa en la reacción de Arthus en pruebas intradérmicas (24, 26). La formación de complejos inmunes en el parénquima pulmonar puede activar el sistema del complemento, generando moléculas C3a, C5a y C3b que se asocian covalentemente con los complejos inmunes, y con el complejo de ataque a la membrana C5b-9. Adicional a esta activación del complemento, se ha observado un incremento en el número de neutrófilos activados en el lavado bronquioalveolar en pacientes en la fase aguda intermitente de la enfermedad y en aquellos que han sido estudiados a las pocas horas o días de la inhalación del antígeno (27-29).

En contraste con los mecanismos descritos anteriormente, existen numerosas evidencias clínicas y experimentales que demuestran que una respuesta mediada por células T exagerada puede ejercer un papel crítico en la reacción inflamatoria que caracteriza a las formas subaguda y crónica de la enfermedad (29). Esta evidencia incluye las características histopatológicas del padecimiento (alveolitis linfocítica con formación de granulomas), un

notable incremento de linfocitos T en el lavado bronquioalveolar, y la producción de citocinas por células T estimuladas por antígeno en el pulmón (30). Del mismo modo, las células T CD4+ de ratón sensibilizadas con antígeno pueden inducir NH en modelos murinos experimentales mientras que las células B y los anticuerpos no consiguen inducir el desarrollo de la enfermedad en respuesta a la sensibilización con antígeno (31-32).

Los mecanismos por los cuales se presenta una alveolitis linfocítica en NH subaguda o crónica no se conocen con precisión, pero parecen incluir un incremento en la migración y reclutamiento de células T, un incremento en la proliferación de éstas células dentro del microambiente local, en parte causado por un defecto en la habilidad de los macrófagos alveolares para suprimir la proliferación de los linfocitos, así como una disminución de la muerte celular programada de los linfocitos T (33-34).

Evidencia experimental reciente sugiere que las citocinas tipo Th1 tienen un papel importante en el desarrollo de la NH; sin embargo, los estudios en humanos son escasos (31, 36, 37). Los hallazgos experimentales deben tomarse con reservas. Es importante señalar que la hipótesis Th1/Th2 se deduce a partir de experimentos en ratones y no en humanos, y esta dicotomía respecto a los perfiles de citocinas está de hecho influenciada por muchas variables experimentales. Ciertamente las células Th1 y Th2 se encuentran en enfermedades humanas, pero casi nunca se observa una polarización tan clara como sucede en ratones (38). Existe un consenso generalizado que establece que en muchas enfermedades humanas no existe una clara división entre el perfil Th1 o Th2, y que estas células se generan frecuentemente de manera simultánea. Por otro lado, y quizás la evidencia más importante, es que la NH no es una enfermedad homogénea y los mecanismos inmunológicos involucrados en un episodio subagudo o en episodios subagudos recurrentes, o bien en la etapa crónica son sustancialmente diferentes. Es posible que bajo ciertas circunstancias la actividad de las

células tipo Th1 disminuya mientras que la actividad de las células Th2 se incrementa (hipótesis de intercambio Th1/Th2). En este contexto, recientemente se demostró que los trabajadores de los hongos, muchos de los cuales presentan precipitinas (anticuerpo precipitante específico) específicas en suero y pueden desarrollar NH, muestran un incremento en las células productoras de citocinas tipo Th2 con una disminución de interferón gamma, indicando una inclinación hacia un patrón de secreción tipo Th2 (39). Estudios de seguimiento muestran que las células Th2 se incrementan gradualmente conforme se incrementa el tiempo en que se tiene contacto con los hongos indicando que los antígenos de los mismos contienen sustancias inmunogénicas que estimulan la respuesta tipo Th2.

### ***La conexión con la fibrosis***

Alrededor del 30-40% de los pacientes con episodios subagudos repetidos o NH crónica evolucionan hacia una fibrosis intersticial difusa con destrucción del parénquima pulmonar (24, 40-43). Sin embargo, la secuencia de los mecanismos moleculares implicados en la resolución de la alveolitis linfocítica y la regeneración tisular o bien la remodelación extracelular anormal y el progreso hacia la fibrosis, no han sido elucidados

El infiltrado de células mononucleares de una inflamación no resuelta puede activar a los fibroblastos a proliferar y secretar componentes de la matriz extracelular. La observación de que el incremento de linfocitos T CD4+ puede estar relacionado con el desarrollo de fibrosis es cautivante (48). De manera interesante, los ratones a los que se ha repletado de células T CD4+ muestran una marcada disminución de la fibrosis subepitelial en las vías aéreas (44). Del mismo modo, la sobre regulación de la endotelina-1 en el pulmón resulta en el progreso de la fibrosis pulmonar y el reclutamiento de células inflamatorias predominantemente CD4+ (45). Sin embargo, debido a la heterogeneidad de células T y de sus múltiples funciones

reguladoras durante la estimulación antigénica, aún permanecen muchas interrogantes respecto a su posible conexión con la respuesta fibrótica. En este contexto, una mejor comprensión de los mecanismos que dirigen la respuesta de las células T en la fibrosis permitirá identificar blancos moleculares potencialmente terapéuticos.

### **Histopatología de la Neumonitis por Hipersensibilidad**

El patrón patológico característico de la NH es la presencia de granulomas bronquiocéntricos pobremente formados con una alveolitis intersticial principalmente compuesta de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (46). Sin embargo, en la NH inducida por micobacteria no tuberculosa, es común encontrar granulomas bien formados no necrotizantes (47).

Se han descrito varias alteraciones bronquiolares que incluyen bronquiolitis obliterante proliferativa en el caso de la enfermedad del granjero (48), inflamación peribronquiolar/fibrosis con hipertrofia de músculo liso y estrechamiento extrínseco de las vías aéreas menores en la enfermedad de los cuidadores de paloma (49), y menos frecuente, lesiones tipo BOOP [bronquiolitis obliterante con neumonía organizada, (50).

Alrededor del 20 al 30% de los pacientes con NH subaguda o crónica, muestran un patrón histológico diferente, incluyendo neumonitis intersticial no específica [NSIP por sus siglas en inglés (51)], o neumonía organizada criptogénica. En el caso de la forma histológica tipo NSIP muestran lesiones inflamatorias o fibróticas temporal y geográficamente uniformes sin la característica bronquiocéntrica de la NH típica. En pacientes con otros patrones histológicos (por ejemplo NSIP, BOOP, etc.), es extremadamente importante corroborar la causa etiológica y hacer un diagnóstico específico.

La etapa crónica se caracteriza por grados variables de fibrosis intersticial; sobrepuesta a cambios subagudos como infiltración intersticial de linfocitos y ocasionalmente granulomas pobremente formados (52, 53, 54).

Recientemente, se han descrito tres patrones de fibrosis in la NH crónica: a) fibrosis periférica con un patrón de parches con distorsión de la arquitectura pulmonar y focos de fibroblastos parecidos microscópicamente a la neumonía intersticial usual; 2) fibrosis intersticial homogénea parecida a la NSIP; y 3) fibrosis peribronquiolar (55). En estos casos, la presencia de células gigantes, los granulomas pobremente formados, los cuerpos de Schaumann o las características inflamatorias de la NH subaguda son esenciales en el diagnóstico de la NH.

En otro estudio con pacientes con la enfermedad de los cuidadores de paloma crónica, se encontró que la mitad de ellos tenían cambios morfológicos compatibles con NSIP celular o fibrótica mientras que otros mostraban un patrón de lesiones parecido a la neumonía intersticial usual caracterizado por cambios fibróticos heterogéneos y temporales aparentes (50).



## RESUMEN

**Antecedentes:** La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es un síndrome pulmonar complejo de presentación clínica variable. La forma subaguda es generalmente reversible mientras que la forma crónica puede progresar hacia la fibrosis. Los estudios son escasos y contradictorios y no existe ninguno que compare ambas formas clínicas.

**Objetivo:** Estudiar las posibles diferencias fenotípicas y funcionales de linfocitos T locales entre pacientes con la forma subaguda y crónica de NH.

**Métodos:** Se estudiaron, 25 pacientes subagudos, 30 crónicos y 8 controles. Se analizaron los linfocitos T de lavados bronquioalveolares por citometría de flujo, por ensayo de acoplamiento de anticuerpo a perlas (Cytometric Bead Array (CBA) en inglés) e inmunohistoquímica.

**Resultados:** Los pacientes crónicos mostraron incremento en la relación CD4/CD8 (mediana: 3.05, (0.3-15); subagudo, mediana: 1.3 (0.1-10); controles, mediana: 1.3 (0.7-2.0);  $p < 0.01$ ) y una disminución de células T gamma delta (mediana: 2.0 (0.5-3.4); subagudos: mediana: 10 (4.8-17); controles: mediana: 15 (5-19);  $p < 0.01$ ).

Los pacientes crónicos mostraron un incremento en las subpoblaciones de células T de memoria terminales CD4+ y CD8+ comparadas con los pacientes subagudos ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, los crónicos secretaron una menor cantidad de interferón gamma. Las células de pacientes crónicos mostraron un fenotipo Th2 con un incremento en la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 ( $p < 0.01$ ), así como una disminución de la expresión del receptor CXCR3 ( $p < 0.01$ ).

Así mismo, los sobrenadantes de cultivo celular estimulados con antígeno aviario de pacientes crónicos produjeron mayor cantidad de interleucina-4 y menores niveles de interferón gamma comparado con los subagudos.

**Conclusiones:** Nuestros hallazgos sugieren que las células de los pacientes con NH crónica disminuyen o pierden sus funciones efectoras y muestran un perfil Th2 el cual puede estar relacionado con la respuesta fibrótica que caracteriza esta forma clínica.

## ABSTRACT

**Rationale:** Hypersensitivity pneumonitis (HP) exhibits a diverse outcome. Patients with acute/subacute HP usually improve while chronic patients often evolve to fibrosis. However, the mechanisms underlying this difference are unknown.

**Objective:** To examine the T-cell profile from subacute (sub-hp) and chronic (chr-hp) patients.

**Methods:** T-cells were obtained from bronchoalveolar lavage (BAL) from 25 sub-hp patients, 30 chr-hp patients and 8 controls. T-cells phenotype and functional profile were evaluated by flow cytometry, cytometric bead array, and immunohistochemistry.

**Results:** Chr-hp patients showed higher CD4+/CD8+ ratio (median: 3.05, (0.3-15); subacute, median: 1.3 (0.1-10); controls, median: 1.3 (0.7-2.0);  $p < 0.01$ ), and a decrease of gamma delta t-cells (median: 2.0 (0.5-3.4); sub-hp: median: 10 (4.8-17); controls: median: 15 (5-19);  $p < 0.01$ ). Chr-hp patients exhibited an increase in the terminally differentiated memory CD4+ and CD8+ t-cells subsets compared with sub-hp patients ( $p < 0.05$ ). However, memory cells from chr-hp showed lower IFN- $\gamma$  production, and decreased cytotoxic activity by CD8+ T-lymphocytes. Chr-hp displayed a Th2-like phenotype with increased CXCR4 expression [median: 6% (1.7-36) versus controls: median 0.7% (0.2-1.4) and subacute: median: 2.2% (0.1-5.3);  $p < 0.01$ ], and decreased CXCR3 expression (median 4.3% (1.4-25) versus median: 37% (4.9-78) from sub-hp;  $p < 0.01$ ). Likewise, supernatants from antigen-specific stimulated cells from chr-hp produced higher levels of IL-4 ( $80 \pm 63$  pg/ml versus  $25 \pm 7$  pg/ml  $p < 0.01$ ), and lower levels of IFN- $\gamma$  ( $3818 \pm 1671$  pg/ml vs  $100 \pm 61$  pg/ml;  $p < 0.01$ ) compared with sub-hp.

**Conclusions:** Our findings indicate that chronic hp patients lose effector T-cell function and exhibit skewing towards Th2 activity, which may be implicated in the fibrotic response that characterize this clinical form.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La neumonitis por hipersensibilidad es un padecimiento intersticial difuso relativamente frecuente y cuyos mecanismos inmunopatológicos no se conocen con precisión. Asimismo, una proporción importante de los pacientes con esta enfermedad desarrollan una fibrosis pulmonar progresiva y eventualmente fallecen de ella en un período breve de tiempo.

En este contexto, este estudio pretendió evaluar las posibles alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de diferentes subpoblaciones de linfocitos T que participan en la regulación y/o tipo de respuesta inmune.

Los resultados de este estudio permitirán entender mejor algunos de los mecanismos involucrados en la respuesta inflamatoria y fibrosante pulmonar y eventualmente servirán para la búsqueda de mejores estrategias terapéuticas.

## **HIPÓTESIS**

Los linfocitos T de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad en etapas crónicas presentan diferencias fenotípicas y funcionales lo cual eventualmente favorece la progresión hacia la fibrosis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer las diferencias fenotípicas y funcionales que presentan las subpoblaciones celulares en las etapas subaguda y crónica en pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar el fenotipo de las poblaciones celulares obtenidas de lavados bronquioalveolares de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad en etapas subaguda y crónica así como en controles sanos según su patrón de expresión de superficie.
2. Caracterizar funcionalmente las subpoblaciones en las cuales se encuentren diferencias fenotípicas.
3. Establecer si las diferencias encontradas se relacionan con el progreso de la enfermedad.

## MÉTODOS

### *Población en estudio*

En este trabajo se incluyeron 55 pacientes con neumonitis por hipersensibilidad provocada por antígenos aviarios. Los pacientes fueron clasificados como subagudos (25 pacientes,  $42.5 \pm 11.4$  años) o crónicos (30 pacientes,  $50.3 \pm 8.1$  años). La forma subaguda se definió como: a) un paciente con menos de 6 meses de síntomas antes del diagnóstico y b) con una tomografía computada de alta resolución y/o biopsia pulmonar que mostraba alteraciones patológicas de tipo inflamatorio y sin fibrosis. La forma crónica se definió como: a) un paciente con más de 24 meses de síntomas antes del diagnóstico mostrando en los mismos estudios al menos un 20% de infiltrado de tipo fibrótico. Se incluyeron 8 sujetos sanos ( $37.6 \pm 6.5$  años) los cuales fueron estudiados como controles. Esta investigación fue aprobada por el comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y con el consentimiento informado de cada sujeto.

Los criterios de inclusión para los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad han sido previamente publicados (56, 57) e incluyeron:

- 1) Historia de exposición a aves con relación causa-efecto.
- 2) Presencia de anticuerpos séricos específicos contra antígeno aviario medidos por la técnica de ELISA.
- 3) Cuadro clínico, radiológico y funcional respiratorio compatible con una neumopatía intersticial difusa.
- 4) Lavado bronquioalveolar con  $\geq 40\%$  de linfocitos.

5) Tomografía axial computada de alta resolución que mostraba imágenes micronodulares bronquiolocéntricas bilaterales, imágenes en vidrio despulido y mosaico. Los pacientes crónicos mostraban además opacidades reticulares compatibles con fibrosis.

6) Biopsia pulmonar a cielo abierto (56% de los pacientes) con alteraciones morfológicas pulmonares compatibles NH.

### ***Lavado bronquioalveolar (LBA)***

EL LBA se llevó a cabo utilizando una técnica estandarizada (58). El fluido del LBA se filtró y centrifugó a 250 X g por 10 minutos a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de solución de fosfatos (PBS) y se utilizó un alícuota para realizar un conteo de células totales y viabilidad. Una alícuota de células se fijó en carbowax y se tiñó con hematoxilina y eosina, para realizar el conteo diferencial. Las células restantes, se resuspendieron en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% y suero fetal bovino (SFB) al 90% a una concentración de  $10^6$  células por mililitro y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

### ***Anticuerpos***

En este estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores de superficie de linfocitos humanos: anti CD3-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) clona UCHT1, anti-CD3-aloficocianina (APC) clona SK7, anti-CD4-ficoeritrina cianina 5.1 (PE Cy5) clona SK3, anti-CD4-APC Cy7, clona SK3, anti-CD8-PE Cy5 clona SK1, anti-CD8 APC Cy7 clona SK1, anti-CD45RA PE Cy7 clona HI100, anti-CD62L-FITC clona DREG-56, anti-CD62L-APC clona DREG-56, anti-CD16 clona 3G8, anti-CD56-PE clona B159, anti CD103-PE clona Ber-ACT8, anti-TCR  $\gamma\delta$ -APC clona B1, anti-TCR $\gamma\delta$ -PE clona 11F2, anti-CCR7-PE clona 3D12, anti-CXCR3-FITC clona 1C6, anti-CCR4-PE clona 1G1, anti-CCR5-FITC clona 2D7; intracelulares, anti-interleucina-2 (anti-IL-2)-FITC clona 5344.111, anti-IL-4-PE clona 3010.211, anti-IL-10-PE clona JES3-9D7, anti-interferón gamma (anti-INF- $\gamma$ )-FITC, clona 25723.11 y anti-perforina-PE

clona  $\delta$ G9 Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD Pharmingen (San José, California EUA).

### ***Determinación de los fenotipos de superficie de linfocitos T por citometría de flujo***

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: 1) Se lavaron las células obtenidas con buffer PBS-BSA 1% durante 10 minutos a 400 x g; 2) Se resuspendieron en 50  $\mu$ l del mismo buffer; 3) Se incubaron con cada uno de los anticuerpos (1  $\mu$ g/ millón de células) en las combinaciones adecuadas durante 30 minutos; 4) Se lavaron con el mismo buffer dos veces, 5) Se resuspendieron en el amortiguador *cytofix/cytoperm* por 30 minutos, 6) Se lavaron dos veces con el amortiguador *perm/Wash* y 7) Por último se resuspendieron en 0.5 ml de amortiguador PBS con paraformaldehído al 1%. Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSAria con el software FACSDiva 4.1.

### ***Tinción intracelular***

Al término de cada cultivo según el protocolo apropiado, las células se cosecharon y se lavaron dos veces con PBS y fueron teñidas con anticuerpos de superficie como se describió anteriormente. Después de esto, se fijaron y permeabilizaron con una solución que contiene paraformaldehído y saponina (*cytofix/cytoperm*, BD Pharmingen, San José CA), por 20 minutos a 4°C. Al terminar el periodo de incubación, las células se lavaron dos veces con una solución que permite mantenerlas permeables (*Perm/Wash*, BD Pharmingen, San José CA). Las células fueron posteriormente teñidas por 30 minutos a 4°C con los anticuerpos intracelulares (1  $\mu$ g/ millón de células) Finalmente, se lavaron dos veces con PBS y resuspendieron en paraformaldehído al 1%, después de lo cual fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

## ***Cultivo celular***

Las células de LBA fueron resuspendidas en medio de cultivo (RPMI 1640, GIBCO Invitrogen, USA), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO Invitrogen, USA), glutamina 2 mM, 100 unidades de penicilina por mililitro, y 100 µg de estreptomicina por mililitro (todos de GIBCO Invitrogen, USA), a una densidad de 10<sup>6</sup> células/ml y se colocaron en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano (FALCON Becton Dickinson Labware, NJ). Las células fueron cultivadas durante 6 horas en presencia o ausencia de: 1) Forbol miristato acetato (PMA) (10 ng/ml) e ionomicina (1 µM) para evaluar la expresión de superficie del marcador CD107 a/b así como perforina intracelular y 2) suero total de paloma (100 µg/ml) para la determinación de INF-γ, IL-4 e IL-10.

Para la detección intracelular de citocinas, se añadió el inhibidor de transporte de proteínas, brefeldina (*GolgiPlug* BD Pharmingen, San José Calif. [1µM]), durante las últimas 4 horas de cultivo.

## ***Determinación de citocinas y quimiocinas***

Se utilizó un estuche para la detección de citocinas acoplado a perlas (*Cytometric bead array*) (16) (BD Pharmingen, San José, CA), tipo Th1 o Th2 (IL-2, IL-10, IL-4 e INF-γ) o bien para las siguientes quimiocinas: proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10/CXCL10), monocina inducida por interferón gamma, (MIG/CXCL9), quimiocina activada y regulada por el timo (TARC/CCL17), y RANTES/CCL5 (del inglés *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*). Con este método se determinó la concentración de citocinas presentes en el sobrenadante del cultivo celular, y para las quimiocinas en fluido de lavado bronquioalveolar de los distintos grupos estudiados. Los resultados se analizaron con el programa BD CBA (BD Pharmingen San José, CA).



El factor transformante beta (TGF- $\beta$ ) se cuantificó por la técnica de ELISA utilizando un estuche comercial (*Immunoassay quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN*).

### ***Inmunohistoquímica.***

La localización celular de IP-10/CXCL10 y MIG/CXCL9 se analizó por inmunohistoquímica siguiendo el método reportado previamente para otras proteínas (57, 59). Brevemente, los tejidos se desparafinaron en xilol y se rehidrataron con etanol absoluto y después con etanol al 96% y 70% por 5 minutos en cada uno de ellos y finalmente en agua. Para eliminar la peroxidasa endógena, los tejidos se incubaron por 30 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% preparado en metanol. Después de lavar dos veces durante 10 minutos con PBS se procedió a revelar el antígeno incubando las muestras en buffer de citratos 10 mM pH 6, calentando en un horno de microondas por 5 min. Después de bloquear con suero normal de borrego a una dilución de 1:100 en PBS por 30 minutos, los tejidos se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos policlonales contra IP-10 y MIG (Santa Cruz *Biotechnology, Inc. CA*). Como controles negativos se utilizaron muestras en donde el anticuerpo primario fue reemplazado con suero no inmune. Posteriormente, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado y después con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Dako, Carpintería, CA) y se revelaron con 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Biogenex, San Ramon CA) en buffer de acetatos con 0.05% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente las preparaciones fueron contrateñidas con hematoxilina acuosa para revelar los núcleos.

### ***Determinación de la expresión del marcador CD107 a/b***

Para determinar la expresión del marcador CD107 a/b, se cultivaron células mononucleares de sangre periférica y de lavado bronquioalveolar de 5 pacientes subagudos y 5 crónicos. A los cultivos se les añadió el anticuerpo CD107 a/b (1  $\mu$ g/millón de células) y posteriormente se

estimularon con PMA (10 ng/ml) e ionomicina (1  $\mu$ M). Los cultivos fueron incubados por 5 horas en presencia de monesina y brefeldina-A (1  $\mu$ M) (BD Biosciences). Cada hora se recuperó una alícuota, la cual fue marcada con los anticuerpos de superficie que permitieron identificar las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> así como aquellas que liberaron perforina durante el cultivo.

### ***Citometría de Flujo***

Todas las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson, San José, CA), utilizando el programa de análisis FACS Diva. Se adquirieron 10,000 eventos a partir de las ventanas de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> o bien CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> para tinciones de superficie. Para las tinciones intracelulares en las que se determinó la presencia de citocinas, se adquirieron 40,000 eventos a partir de las mismas ventanas.

### ***Análisis estadístico***

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  D.E., y las diferencias entre grupos fueron analizadas por medio del análisis estadístico ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Los datos que no mostraron una distribución normal se reportaron como la mediana y rango, las diferencias fueron evaluadas por la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Los datos se consideraron significativos con una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Características demográficas de los grupos de pacientes subagudos y crónicos.

En la **tabla 2** se resumen los datos demográficos clínicos, y funcionales respiratorios así como las características del conteo diferencial de las células inflamatorias recuperadas del LBA. Todos los pacientes mostraron evidencia clínica, radiológica y funcional de enfermedad pulmonar intersticial difusa con diversos grados de disnea, disminución en la capacidad vital forzada e hipoxemia en reposo que empeoraba durante el ejercicio. Los pacientes con NH crónica fueron en promedio de mayor edad ( $50.3 \pm 8.1$  versus  $42.1 \pm 10.9$ ;  $p < 0.01$ ), y mostraron una hipoxemia más severa ( $\text{PaO}_2$ :  $48.8 \pm 8.9$  versus  $53.2 \pm 8.2$  mmHg;  $p < 0.05$ ); asimismo, prácticamente la mitad de ellos presentaba hipocratismo digital, un signo clínico asociado a fibrosis, en comparación con el 12% de los pacientes con la presentación subaguda. Ambos grupos se caracterizaron por una marcada linfocitosis, sin embargo se observaron niveles significativamente más altos en los pacientes subagudos ( $71.2 \pm 13.1\%$  versus  $56.7 \pm 17.3\%$ ;  $p < 0.01$ ).

### Seguimiento de pacientes con NH

Todos los pacientes recibieron 3 bolos de metilprednisolona (1gr/día) y posteriormente fueron tratados con: (1) prednisona (0.5 mg/kg/día), reduciéndola hasta lograr una dosis de mantenimiento diario de 10 mg/día, o bien, (2) corticosteroides inhalados (beclometasona, 100 µg dos veces al día). Posteriormente, los pacientes fueron seguidos por 2 años y la respuesta clínica y funcional se clasificó como:

- a) Curación, (ausencia de síntomas y normalización de las pruebas funcionales respiratorias).
- b) Mejoría (aumento  $> 10\%$  de la capacidad vital forzada y  $> 4$ mmHg en  $\text{PaO}_2$ ),

- c) Estabilización (sin cambios)
- d) Empeoramiento (disminución >10% en la capacidad vital forzada y > 4 mmHg en PaO<sub>2</sub>), o fallecidos.

Después de dos años de seguimiento, la mayoría de los pacientes con NH subaguda mejoró o se mantuvieron estables, mientras que el 40% de los pacientes crónicos empeoraron o inclusive fallecieron como consecuencia de la enfermedad (Tabla 2).

### **Análisis de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>**

La relación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> se evaluó en las células del lavado bronquioalveolar en 25 pacientes subagudos, 30 pacientes crónicos y 8 sujetos sanos. La relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en los controles osciló entre 0.7 a 2 (mediana = 1.3). En los pacientes con NH, esta relación fue muy variable y estuvo en el rango de 0.1 a 10 en los enfermos subagudos (mediana = 1.3), y de 0.3 a 15 en los pacientes con NH crónica (mediana = 3.05) (**Figura 1**). A pesar de esta heterogeneidad, se observó un incremento significativo de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en los pacientes crónicos comparado con los subagudos y controles (p<0.01). De manera interesante, los tres pacientes subagudos que empeoraron (tabla 1) mostraron una relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> incrementada (4.1, 6.0 y 10 respectivamente). El cambio en la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> se debió al incremento del número absoluto de células T CD4<sup>+</sup> por mililitro.

## Linfocitos T CD4 y CD8 de memoria

Las subpoblaciones de células T de memoria se examinaron tanto en células mononucleares de sangre periférica como en lavado bronquioalveolar de 8 controles, 21 pacientes subagudos y 20 pacientes crónicos. Para este análisis se usaron de manera simultánea los anticuerpos de superficie CD45RA, CD62L, CD4 ó CD8 y CD3. Los linfocitos CD4 o CD8 positivos fueron evaluados en base a sus propiedades de dispersión de luz lateral tomando como referencia la tinción para CD3 y posteriormente para CD4 o bien CD8 y finalmente fueron analizadas para la expresión de CD45RA y CD62L. De este modo fue posible definir tres subpoblaciones: a) células de memoria central, aquellas que expresaban CD45RA<sup>+</sup>/CD62L<sup>alto</sup>; b) células T de memoria efectoras, aquellas que mostraron un fenotipo CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>bajo</sup>; c) células de memoria efectoras terminales (TEMRA), aquellas que expresaron CD45RA<sup>+</sup>/CD62L<sup>low</sup>. Como se muestra en la **figura 2** los pacientes con la enfermedad crónica mostraron un incremento en células efectoras terminales (TEMRA) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el LBA comparados con subagudos (CD4<sup>+</sup>: 6.7 ± 1.4 versus 1.8 ± 1% p<0.05), CD8<sup>+</sup>: 5.0 ± 3.3 versus 2.4 ± 0.8 p<0.05).

Por otro lado, la mayoría de los linfocitos de memoria que se encontraban en las células mononucleares de sangre periférica, tanto de pacientes subagudos como crónicos fueron efectoras y efectoras terminales sin mostrar diferencias significativas entre ambos tipos de pacientes. Sin embargo estas subpoblaciones se encontraron significativamente incrementadas comparadas con las células obtenidas de controles. (**Tabla 3**).

### **Análisis funcional de células T de memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>**

La caracterización funcional de las subpoblaciones de memoria se realizó en células mononucleares de sangre periférica y LBA de 5 pacientes subagudos y 5 crónicos mediante la estimulación en cultivo con PMA (10 ng/ml) e ionomicina (1  $\mu$ M) durante 6 horas. Como se muestra en las **figuras 3A y 3B**, los pacientes con NH subaguda mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectoras y TEMRA que producían IFN- $\gamma$  comparados con los pacientes crónicos. En contraste, las subpoblaciones de memoria obtenidas de células mononucleares de sangre periférica expresaron bajos niveles de IFN- $\gamma$  tanto en pacientes subagudos como crónicos.

Para evaluar la actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria obtenidas del LBA y de sangre periférica tanto en pacientes subagudos como crónicos, se analizó de manera simultánea la pérdida de perforina intracelular y el incremento en la expresión del marcador de superficie CD107a/b. Los resultados mostraron que únicamente las células de LBA de pacientes con NH subaguda presentaron una correlación entre el incremento en la expresión de CD107a/b y la pérdida de perforina intracelular, indicando que existe actividad funcional en las células T CD8<sup>+</sup> (**Figura 4**). No se encontraron diferencias en las células de memoria TCD8<sup>+</sup> de sangre periférica.

### **Linfocitos T $\gamma\delta$ , NK y NKT en lavados bronquioalveolares**

Como se muestra en la **figura 5**, los pacientes con NH crónica (n=20) mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> comparada con los pacientes subagudos (n=21) y controles (n=8), [mediana: 2.0% (rango, 0.5-3.4) *versus* subagudos, mediana: 10% (rango, 4.8-17) y controles, mediana: 15% (rango, 5-19), p < 0.01].

Por otro lado, las células  $T\gamma\delta^+$  intraepiteliales ( $CD103^+$ ) se encontraron incrementadas significativamente en pacientes con NH subaguda ( $n=21$ ) cuando se compararon con controles ( $n= 8$ ) y pacientes con NH crónica ( $n=30$ ) [mediana: 7.0% (rango, 3.4-12) versus controles, mediana 2.6% (rango, 1-3.4) y crónicos, mediana 1.0 (rango, 0.3-3.4) ( $p<0.01$ )].

La proporción de células NKT convencionales ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ) se encontró significativamente disminuida tanto en pacientes subagudos como crónicos en comparación con los sujetos sanos (controles ( $n=8$ ):  $13.1 \pm 3.0\%$ ; subagudos ( $n=21$ ):  $2 \pm 2.6\%$ ; crónicos ( $n=20$ ):  $7.3 \pm 4.1\%$   $p<0.01$  y  $p<0.05$  respectivamente).

También se cuantificó la subpoblación de células NKT que expresan la cadena invariante  $V\alpha 24$  ( $V\alpha 1NKT$ ) en tres controles, 5 pacientes subagudos y 15 crónicos. Se encontró que una pequeña subpoblación de células NKT expresaron dicha cadena y no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (controles:  $0.5 \pm 0.1\%$ , subagudos:  $0.5 \pm 0.4\%$ , crónicos:  $0.5 \pm 0.8\%$ ).

Finalmente, no se encontraron diferencias en el porcentaje de células NK (controles:  $5.4 \pm 1.5\%$ , subagudos:  $4.0 \pm 3.0\%$ , crónicos:  $4.8 \pm 2.7\%$ ).

### **Perfil Th1/Th2 en células obtenidas en lavados bronquioalveolares**

Con el objetivo de investigar el perfil Th1 o Th2 en las células T  $CD4^+$  se realizaron diversas determinaciones fenotípicas y funcionales en las células T provenientes de LBA. Se ha propuesto que la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 caracterizan a las células tipo Th1 mientras que los receptores CCR4 y CXCR4 se expresan en células tipo Th2 (60, 61) por lo que decidimos investigar la proporción de células T  $CD4^+$  que expresaban estos receptores de quimiocinas en 5 controles, 14 pacientes subagudos y 23 crónicos. Como se muestra en la **figura 6**, las células T  $CD4^+$  que expresaron el receptor CXCR3 se

encontraron significativamente incrementadas en pacientes subagudos [mediana: 37% (rango, 4.9-78%) versus controles: mediana 1.7% (rango, 1.4-2.3) y crónicos: mediana 4.3% (rango, 1.4-25);  $p < 0.01$ ], mientras que las células que expresaron CXCR4 se encontraron significativamente aumentadas en pacientes crónicos [mediana: 6% (rango, 1.7-36%) versus controles: mediana 0.7 (rango, 0.2-1.4) y subagudos: mediana: 2.2 (rango, 0.1-5.3  $p < 0.01$ )]. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CCR5 y CCR4 en células T CD4+ entre pacientes subagudos y crónicos; sin embargo, ambos grupos mostraron un incremento en el porcentaje de estos linfocitos en comparación con los controles.

Posteriormente se evaluó la presencia de los ligandos de CXCR3, IP-10/CXCL-10 y MIG/CXCL9, el ligando de CCR4, TARC/CCL17 así como el de CCR5, RANTES/CCL5 en líquido de LBA de los mismos pacientes a los cuales se midió la expresión de los receptores. Los ligandos de CXCR3 se encontraron significativamente incrementados en pacientes subagudos comparados con los pacientes crónicos y controles (IP-10/CXCL10:  $1147 \pm 837$  versus  $265 \pm 181$  (crónicos) y  $27.1 \pm 10.2$  (controles) pg/ml,  $p < 0.01$ ; MIG/CXCL9:  $646 \pm 389$  versus  $237 \pm 182$  pg/ml y  $24.7 \pm 5.63$ ,  $p < 0.01$ ). En contraste, la quimiocina TARC (ligando de CCR4) se encontró marginal pero significativamente incrementada en pacientes crónicos comparados con el grupo de pacientes subagudos (controles  $25 \pm 13.6$  pg/ml; subagudos:  $17.4 \pm 7.2$  pg/ml; crónicos:  $49.3 \pm 29.1$  pg/ml,  $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias en los niveles de RANTES/CCL5 entre pacientes subagudos y crónicos, sin embargo los pacientes subagudos mostraron un incremento comparado con controles (controles:  $19.8 \pm 9$  pg/ml; subagudos:  $337.8 \pm 181.6$  pg/ml; crónicos:  $199.3 \pm 161.3$  pg/ml) (**Figura 7**).

La identificación de las células que expresaban los ligandos de CXCR3 se realizó por inmunohistoquímica en tejidos pulmonares obtenidos por biopsia. Se encontró que MIG/CXCL9 se localizó preferentemente en células endoteliales y células musculares lisas de



vasos (**Figura 8A**), mientras que IP-10/CXCL10 se observó en células del epitelio alveolar y macrófagos alveolares (**Figuras 8B y 8C**). Ninguno de los dos ligandos fue observado en pulmones normales como se ejemplifica para IP-10 en la **figura 8D**.

El perfil Th1/Th2 se evaluó también a través de la expresión de citocinas intracelulares [IFN- $\gamma$ , (Th1) e IL-4, (Th2)] en células de LBA estimuladas con suero de paloma. Se observó que los pacientes con la forma subaguda de la enfermedad mostraron porcentajes mayores de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresaron INF- $\gamma$  (mediana: 6.0%, rango 4.1-19) comparado con los pacientes crónicos (mediana: 2.2%, de 0.4 a 5.2;  $p < 0.01$ ); (**Figura 9**). Por otro lado, no se encontraron diferencias en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> que expresaron IL-4 (subagudos: mediana: 1.8%, rango, 0-2.8; crónicos: mediana 2.8%, rango 0.4-5.1).

Se midió también el INF- $\gamma$  intracelular en células T CD8<sup>+</sup> no encontrando diferencias significativas entre pacientes subagudos y crónicos (subagudos: mediana: 12%, rango, 7.6-22.4; crónicos: mediana 7.8% rango 1.7-13.7). Sin embargo, los pacientes crónicos mostraron porcentajes significativamente mayores de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresaron IL-4 (crónicos: 6.3%, rango, 1.4-9.7; subagudos: 0.1% 0-1.7) (**Figura 9**).

Finalmente se evaluó la producción de citocinas en el sobrenadante de cultivo de las mismas células en las que se llevó a cabo la determinación de citocinas intracelulares. Los sobrenadantes de los pacientes crónicos mostraron niveles significativamente mayores de IL-4 comparado con aquellos que se obtuvieron de pacientes subagudos ( $80 \pm 63$  pg/ml vs  $25 \pm 7$  pg/ml  $p < 0.01$ ). En relación a la producción de INF- $\gamma$ , ésta se encontró significativamente incrementada en pacientes subagudos comparada con pacientes crónicos (INF- $\gamma$ :  $3818 \pm 1671$  pg/ml vs  $100 \pm 61$  pg/ml;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ).

### **Cuantificación del factor de crecimiento transformante beta**

El TGF- $\beta$ 1 total (activo y latente), un potente mediador pro-fibrótico fue medido en el líquido de LBA de 5 controles, 15 pacientes subagudos y 26 crónicos. No se encontraron diferencias entre los grupos (controles:  $43.4 \pm 3.3$ ; subagudos:  $57.1 \pm 15.9$ ; crónicos:  $67.6 \pm 43.8$  pg/ml).

## DISCUSIÓN

La neumonitis por hipersensibilidad es causada por la inhalación repetida de diferentes antígenos ambientales en individuos susceptibles. Puede presentarse en sus formas clínicas aguda y subaguda o bien evolucionar hacia una forma crónica potencialmente letal (1,2, 7). La enfermedad se caracteriza por una reacción inmunopatológica que afecta a las vías aéreas periféricas y el parénquima pulmonar y parece ser mediada, en especial en las formas subaguda y crónica por una hiperreactividad mediada por linfocitos T. Sin embargo, los mecanismos potenciales responsables de la evolución hacia la cronicidad no se conocen con precisión. En particular, la actividad funcional y la caracterización fenotípica de las diferentes subpoblaciones de células T dentro de las distintas formas clínicas no habían sido previamente estudiadas.

Los resultados de este estudio revelan un número importante de diferencias asociadas las distintas subpoblaciones de células T entre pacientes con neumonitis por hipersensibilidad subaguda y crónica. Los pacientes crónicos muestran un número menor de linfocitos T en el lavado bronquioalveolar, asociado con un incremento en la relación  $CD4^+/CD8^+$  en comparación con los pacientes que presentaron una forma clínica subaguda de la enfermedad. Más aún, los pacientes subagudos que empeoraron, también mostraron un incremento significativo de la relación  $CD4^+/CD8^+$ . Estos hallazgos sugieren que el predominio de linfocitos  $CD4^+$  se asocia con cronicidad mientras que el predominio de las células T  $CD8^+$  previamente reportado en esta enfermedad, se relaciona principalmente con la fase activa de ésta (predominantemente inflamatoria y potencialmente tratable) (62). Apoyan esta hipótesis los reportes que indican que los linfocitos T  $CD8^+$  se encuentran significativamente incrementados en pacientes con NH aguda, mientras que en la etapa fibrótica se ha observado un aumento en los linfocitos T  $CD4^+$  en líquido de LBA (63). La

razón por la cual el incremento de células T CD4<sup>+</sup> se asocia a etapas crónicas/fibróticas de la NH es incierta. Resultados similares han sido descritos en algunos modelos experimentales de lesión pulmonar. Por ejemplo, recientemente se reportó que ratas agredidas con la instilación traqueal de contenido gástrico desarrollaron bronquiolitis linfocítica y obliterativa así como fibrosis y en el LBA el hallazgo más importante fue el aumento de células T con un incremento en la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (64). Sin embargo, los mecanismos moleculares se desconocen. El efecto profibrosante podría estar relacionada con un cambio de polaridad Th1/Th2. En este contexto, un incremento de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y el cambio en la respuesta inmune de Th1 a Th2 en pacientes crónicos parecen ser parte del patrón inmunopatológico que caracteriza a la etapa tardía de la enfermedad.

Adicionalmente, los pacientes con NH crónica mostraron una disminución en el porcentaje de linfocitos T  $\gamma\delta$ , sin cambios en el número de células T  $\gamma\delta$  intraepiteliales, mientras que se observó un incremento de estas últimas en pacientes con enfermedad subaguda. Los linfocitos T  $\gamma\delta$  constituyen un linaje de células T que difieren de los linfocitos convencionales  $\alpha\beta$  en que se distribuyen en tejidos de manera específica. De manera importante, las células T  $\gamma\delta$  poseen diferentes actividades reguladoras y son parte integral de los mecanismos epiteliales de defensa (65-68).

Las células epiteliales (en piel, intestino, aparato respiratorio) son constantemente renovadas con el fin de mantener una barrera protectora y de defensa del huésped contra los desafíos ambientales (69). En este contexto, la importancia de las células  $\gamma\delta$  en la homeostasis tisular ha sido demostrada en diferentes estudios realizados en ratones deficientes en los cuales la ausencia de de linfocitos T  $\gamma\delta$  intraepiteliales provoca alteraciones en la función de barrera de las células epiteliales y en la capacidad de restringir la trans migración de agentes infecciosos

(70). Además, estas células pueden expresar la molécula de superficie NKG2D, la cual participa en mecanismos de citotoxicidad y se ha relacionado con la defensa contra tumores (71).

En este estudio se encontró que las células  $\gamma\delta$  intraepiteliales en pacientes crónicos no se incrementan como sucede en los subagudos cuando se compara con controles, lo cual sugiere que en los pacientes subagudos existe un mecanismo de reparación activo, lo cual no ocurre en los pacientes con NH crónica, y que se traduce en un deterioro en los mecanismos de re-epitelización del pulmón como se ha reportado previamente en fibrosis pulmonar idiopática (72). Por otro lado, las alteraciones en la actividad de esta subpoblación celular pueden ejercer un efecto sobre las funciones de las células T CD4+ y CD8+. En este contexto, ensayos funcionales en ratones normales y deficientes de células  $\gamma\delta$  han demostrado que la exposición crónica a antígenos bacterianos resulta en el desarrollo de inflamación peribroncovascular, con incremento en células T CD4+ y CD8+. Además, los ratones deficientes en células  $\gamma\delta$ , tratados con *B. subtilis*, mostraron un depósito acelerado de colágena, lo cual sugiere que estas células tienen un papel protector antifibrótico (72).

Por otro lado, existen evidencias clínicas y experimentales recientes que sugieren que las citocinas tipo Th1 desempeñan un papel importante en el desarrollo de la NH (73-74). También se ha sugerido, aunque no había sido consistentemente demostrado, que una disminución de la actividad tipo Th1 con incremento de la actividad tipo Th2 en NH puede provocar el desarrollo de fibrosis pulmonar (36). En este sentido, se ha demostrado que las citocinas IL-4 e IL-13, típicas de una respuesta tipo Th2, tienen un efecto profibrosante ya que inducen la proliferación de fibroblastos e incrementan la síntesis de colágena (75), mientras que el INF- $\gamma$ , que es una citocina tipo Th1, inhibe estos procesos (74). En relación a patologías que afectan al aparato respiratorio se ha demostrado recientemente que los ratones que sobre-expresan GATA-3, un factor de transcripción que dirige la respuesta Th2 (76-79),

desarrollan una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina mucho más grave que los ratones normales lo que se acompaña de una disminución significativa de la producción de IFN- $\gamma$  (36). Con esta hipótesis en mente evaluamos, utilizando diferentes aproximaciones metodológicas, que tipo de respuesta inmune relacionada con la polarización hacia Th1 o Th2 predominaba en los pacientes con NH subaguda y crónica. Nuestros resultados mostraron que en los pacientes con la enfermedad subaguda predominaba una respuesta tipo Th1 mientras que los crónicos expresaban una respuesta predominantemente tipo Th2. Así, los linfocitos obtenidos de los lavados bronquioalveolares de pacientes con enfermedad subaguda estimulados *in vitro* con suero de paloma expresaron y liberaron niveles significativamente mayores de citocinas tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) así como niveles menores de citocinas tipo Th2 (IL-4) en comparación con los pacientes con NH crónica. También encontramos un incremento significativo en el número de linfocitos que expresaron el receptor CXCR3 así como los niveles de sus ligandos, IP-10/CXCL10 y MIG/CXCL9, en el líquido de los LBA de pacientes subagudos. Estas quimiocinas pueden contribuir a dirigir la migración y activación de células T así como la acumulación de linfocitos T en el pulmón en etapas tempranas de la enfermedad. En contraste, las células que expresaron CXCR4 (Th2) y TARC se encontraron incrementadas en pacientes crónicos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el cambio en el perfil funcional tipo Th1 a Th2 puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de la respuesta fibrótica que caracteriza a la NH crónica.

Para tener un perfil más completo del tipo de respuesta inmune e inflamatoria en ambos grupos de pacientes, se analizaron también las subpoblaciones de células NK y NKT. No se observaron diferencias en el número de células NK obtenidas en los lavados bronquioalveolares. En cambio, tanto los pacientes subagudos como crónicos mostraron una disminución en el porcentaje de células NKT en comparación con los sujetos sanos sin

mostrar ningún cambio en la subpoblación de células NKT ( $V\alpha 24i$ ). El papel fisiológico de las células NKT es incierto, sin embargo, se han asociado a un número importante de respuestas benéficas, incluyendo la protección del hospedero frente a una gran variedad de agentes infecciosos, así como la prevención de enfermedades autoinmunes y el mantenimiento de la tolerancia (80). Además, se ha descrito un papel modulador para las células NKT en la respuesta tipo Th1 o Th2, incrementando o favoreciendo en cada caso una respuesta anti-inflamatoria (81, 82). De este modo, la disminución de este subtipo celular podría estar implicada en el desarrollo de la reacción inmune desordenada que caracteriza a la NH.

Fortalecen esta hipótesis estudios recientes que demuestran que las células NKT atenúan la inflamación y fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, así como el hallazgo de que la deficiencia de células NKT y  $i$ NKT en ratón agravan la alveolitis inducida por *Saccharopolyspora rectivirgula*. (83, 84). En este modelo los autores inducen la NH por inhalación repetida del antígeno en ratones deficientes en NKT y CD1d así como en ratones B6 que desarrollan la NH en respuesta a la agresión. Las lesiones que mostraron los ratones  $NKT^{-/-}$  o  $CD1d^{-/-}$  fueron más intensas y extensas aún después de la transferencia adoptiva de células NKT funcionales provenientes de ratones B6, lo que indica que la presencia de CD1d es indispensable para la activación y proliferación de las células NKT.

Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias en la subpoblación  $V\alpha 24i$  NKT entre controles y ya sea pacientes subagudos o crónicos. Esta subpoblación reconoce glucolípidos ( $\alpha$ -GalCer) presentados por CD1d. Por el contrario, las células NKT convencionales son células restringidas a la presentación vía complejo principal de histocompatibilidad clase I ó II y regulan positivamente la activación de marcadores de células NK (85). Las células NKT parecen regular la vigilancia inmunológica y otros procesos inmunopatológicos aunque los mecanismos y ligandos involucrados en dichos procesos se

desconocen. Se requieren entonces, estudios más amplios para determinar si la disminución en el número de células NKT contribuye al desarrollo de la NH.

Por otro lado también exploramos las características fenotípicas y funcionales de las células de memoria. Se ha observado que éstas poseen distintas vías de diferenciación después de una infección viral aguda y crónica (85). Las células de memoria que se generan después de una infección aguda poseen características funcionales importantes, y constituyen también un componente fundamental de la respuesta inmune protectora. En contraste, las infecciones crónicas, se caracterizan por una variedad de respuestas funcionales alteradas que impiden la eliminación del patógeno. Se ha sugerido que a pesar de que las células T efectoras se generan inicialmente durante las etapas tempranas de la infección, éstas pierden gradualmente su función durante el desarrollo de la etapa crónica. Este *agotamiento* funcional de células T específicas para un virus en particular, se ha observado durante la infección en ratones a los que se les provoca coriomeningitis linfocítica (86). También se ha descrito en otros modelos animales así como en enfermedades humanas (87-89).

En este contexto, los datos obtenidos en este estudio demuestran diferencias cuantitativas y cualitativas en la distribución de estas subpoblaciones de memoria entre pacientes con NH subaguda y crónica. Los pacientes con NH crónica mostraron un incremento en el porcentaje de células de memoria efectoras terminales (TEMRA) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> comparados con los pacientes con enfermedad subaguda. Sin embargo se observó que las células TEMRA CD4<sup>+</sup> mostraban una disminución en la expresión de IFN- $\gamma$ .

Este resultado sugiere que a pesar del incremento en el número de las células TEMRA, estas son funcionalmente deficientes.

Se evaluó también la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> para degranular monitoreando la expresión en la superficie de las células del marcador CD107 a/b así como la pérdida



intracelular de perforina después de estimulación antígeno específica. Esta correlación únicamente se observó en las células de LBA de pacientes con NH subaguda. Un comportamiento similar se ha descrito en un modelo en ratón del virus de la coriomeningitis el cual se atribuye la disfunción a la sobre regulación del receptor de muerte programada 1 (PD-1) (86).

Nuestros datos sugieren que los pacientes crónicos (> 2 años de síntomas), pueden presentar esta disminución o declinación de la respuesta de las células T CD8+, lo cual se puede atribuir a la cronicidad del proceso patológico o bien a que los pacientes continúan expuestos al antígeno aviario. Desafortunadamente, a pesar de las recomendaciones para retirar el contacto con el antígeno agresor (usualmente aves), algunos pacientes continúan con la exposición. También, existen muchos espacios públicos en México donde las aves llegan y se establecen, incrementando la exposición de los pacientes con el antígeno.

Estudios experimentales han demostrado que tras la clonación de células T citotóxicas y su posterior cultivo y estimulación, éstas son incapaces de controlar o eliminar infecciones virales perdiendo su actividad citotóxica y de secreción de citocinas (90).

Estas observaciones en infecciones crónicas y los resultados obtenidos en este estudio pueden ayudar a entender la dinámica entre las subpoblaciones de células T citotóxicas y la exposición crónica a antígenos en la enfermedad pulmonar humana.

## **Conclusiones**

Los resultados de este estudio indican que los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad crónica poseen subpoblaciones de células T pulmonares que son fenotípica y funcionalmente diferentes comparadas con las subpoblaciones de pacientes con la enfermedad crónica.

Estas diferencias incluyen un incremento en la relación de linfocitos CD4+/CD8+, una disminución en las células T  $\gamma\delta$ , un cambio del perfil de citocinas hacia una respuesta tipo Th2 así como una declinación funcional de las células T CD8+ efectoras. Estos hallazgos pueden contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas como por ejemplo, la inhibición del factor de transcripción GATA-3 que modifica la respuesta Th1/Th2 o bien el bloqueo del receptor PD-1 para restaurar la función de células T, que sean de utilidad para el tratamiento de la NH crónica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin Chest Med* 25:531-547, 2004.
2. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y; HP Study Group. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:952-958, 2003.
3. Selman, Pérez-Padilla R. Airflow obstruction and airway lesions in hypersensitivity pneumonitis. *Clin Chest Med* 1993 14:699-714, 1993.
4. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, et al. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 148:49-53, 1993.
5. Ohtani Y, Saiki S, Sumi Y, et al. Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung. *Ann Allergy Asthma Immunol* 90:604-610, 2003.
6. Vourlekis JS, Schwarz MI, Cherniack RM, et al. The effect of pulmonary fibrosis on survival in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Am J Med* 116:662-668, 2004.
7. Perez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Sanchez M, Carrillo G, Perez R, Sansores R, Gaxiola M, Selman M. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 148:49-53, 1993.
8. Lacasse Y, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Orphanet J Rare Dis* 1:25, 2006.
9. Christensen LT, Schmidt CD, Robbins L. Pigeon breeders' disease: a prevalence study and review. *Clin Allergy* 5:417-430, 1975.
10. Hendrick DJ, Faux JA, Marshall R. Budgerigar-fancier's lung: The commonest variety of allergic alveolitis in Britain. *Br Med J* 2:81-84, 1978.
11. Suda T, Sato A, Ida M, Gemma H, Hayakawa H, Chida K. Hypersensitivity pneumonitis associated with home ultrasonic humidifiers. *Chest* 107:711-717, 1995.
12. Camarena A, Juarez A, Mejia M, et al. Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163 (7), 1528-1533.
13. Schaaf BM, Seitzer U, Pravica V, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in farmer's lung patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163 (2), 379-382.

14. Kondoh K, Usui Y, Ohtani Y, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in hypersensitivity pneumonitis. *J Med Dent Sci* 2006, 53 (1), 75-83.
15. Cormier Y, Samson N, Israel-Assayag E. Viral infection enhances the response to *Saccharopolyspora rectivirgula* in mice prechallenged with this farmer's lung antigen. *Lung* 1996, 174 (6), 399-407.
16. Gudmundsson G, Monick MM, Hunninghake GW. Viral infection modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 1999, 162 (12), 7397-7401.
17. Dakhama A, Hegele RG, Laflamme G, et al. Common respiratory viruses in lower airways of patients with acute hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159 (4), 1316-1322.
18. Israël-Assayag E, Dakhama A, Lavigne S, et al. Expression of costimulatory molecules on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159 (6), 1830-1834.
19. Allen DH, Basten A, Williams GV, et al. Familial hypersensitivity pneumonitis. *Am J Med* 1975, 59 (4), 505-514.
20. Hoppin JA, Umbach DM, Kullman GJ, et al. Pesticides and other agricultural factors associated with self-reported farmer's lung among farm residents in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* 2007, 64 (5), 334-341.
21. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2007, 28 (1), 1-6.
22. Lapaire O, Hösli I, Zanetti-Daellenbach R, et al. Impact of fetal-maternal microchimerism on women's health--a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007, 20 (1), 1-5.
23. Bustos ML, Frías S, Ramos S, et al. Local and circulating microchimerism is associated with hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176 (1), 90-95.
24. Selman M. Hypersensitivity Pneumonitis. In: *Interstitial Lung Disease*. Schwarz M, and King T, eds. B.C. Decker Inc., Hamilton Ontario, 2003; pp. 454-484.
25. Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G, McSharry C, Baldwin CI, Calvert JE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J Suppl.* 2001; 32:81s-92s.
26. McSharry C, Anderson K, Bourke SJ, Boyd G. Takes your breath away--the immunology of allergic alveolitis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128(1):3-9.
27. Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, Sawada M, Inase N, Miyake S, et al. Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung. *Chest* 2000; 118(5):1382-9.

28. Fournier E, Tonnel AB, Gosset P, Wallaert B, Ameisen JC, Voisin C. Early neutrophil alveolitis after antigen inhalation in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1985; 88(4):563-6.
29. Vogelmeier C, Krombach F, Munzing S, Konig G, Mazur G, Beinert T, et al. Activation of blood neutrophils in acute episodes of farmer's lung. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148(2):396-400.
30. Salvaggio JE, Millhollon BW. Allergic alveolitis: new insights into old mysteries. *Respir Med* 1993; 87(7):495-501.
31. Schuyler M, Gott K, Cherne A, Edwards B. Th1 CD4+ cells adoptively transfer experimental hypersensitivity pneumonitis. *Cell Immunol* 1997; 177(2):169-75.
32. Schuyler M, Shopp G, Crooks L, Crooks L. CD3+ and CD4+ cells adoptively transfer experimental hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146(6):1582-8.
33. Laflamme C, Israel-Assayag E, Cormier Y. Apoptosis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2003; 21(2):225-31.
34. Dakhama A, Israel-Assayag E, Cormier Y. Altered immunosuppressive activity of alveolar macrophages in farmer's lung disease. *Eur Respir J* 1996; 9(7):1456-62.
35. Facco M, Trentin L, Nicolardi L, Miorin M, Scquizzato E, Carollo D, et al. T cells in the lung of patients with hypersensitivity pneumonitis accumulate in a clonal manner. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb 13 [Epub ahead of print]
36. Yamasaki H, Ando M, Brazer W, Center DM, Cruikshank WW. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 1999; 163(6):3516-23.
37. Gudmundsson G, Hunninghake GW. Interferon- $\gamma$  is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 1997; 99(10):2386-90.
38. Mestas J, Hughes CC. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol* 2004; 172(5):2731-8.
39. Saikai T, Tanaka H, Sato N, Abe S, Matsuura A. Mushroom plant workers experience a shift towards a T helper type 2 dominant state: contribution of innate immunity to spore antigen. *Clin Exp Immunol* 2004; 135(1):119-24.
40. Ohtani Y, Saiki S, Sumi Y, Inase N, Miyake S, Costabel U, et al. Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90(6):604-10.
41. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Carrillo G, Pérez R, Sansores R, et al. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148(1):49-53.

42. Murayama J, Yoshizawa Y, Ohtsuka M, Hasegawa S. Lung fibrosis in hypersensitivity pneumonitis. Association with CD4+ but not CD8+ cell dominant alveolitis and insidious onset. *Chest*. 1993; 104(1):38-43.
43. Lynch DA, Newell JD, Logan PM, King TE Jr, Muller NL. Can CT distinguish hypersensitivity pneumonitis from idiopathic pulmonary fibrosis? *AJR* 1995; 165(4):807-11.
44. Foster PS, Yang M, Herbert C, Kumar RK. CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma. *Lab Invest* 2002; 82(4):455-62.
45. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, et al. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(1):19-26.
46. Coleman A, Colby TV. Histologic diagnosis of extrinsic allergic alveolitis. *Am J Surg Pathol* 1988, 12 (7), 514-518.
47. Marras TK, Wallace RJ, Koth LL, et al. Hypersensitivity pneumonitis reaction to *Mycobacterium avium* in household water. *Chest* 2005, 127 (2), 664-671.
48. Reyes CN, Wenzel FJ, Lawton BR, et al. The pulmonary pathology of farmer's lung disease. *Chest* 1982, 81 (2), 142-146.
49. Pérez-Padilla R, Gaxiola M, Salas J, et al. Bronchiolitis in chronic pigeon breeder's disease. Morphological evidence of a spectrum of small airway lesions in hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigens. *Chest* 1996, 110 (2), 371-377.
50. Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, et al. Chronic bird fancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005, 60 (8), 665-671.
51. Vourlekis JS, Schwarz MI, Cool CD, et al. Nonspecific interstitial pneumonitis as the sole histologic expression of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Med* 2002, 112 (6), 490-493.
52. Ohtani Y, Saiki S, Sumi Y, et al. Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003, 90 (6), 604-610.
53. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, et al. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148 (1), 49-53.
54. Hayakawa H, Shirai M, Sato A, et al. Clinicopathological features of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respirology* 2002, 7 (4), 359-364.

56. Bustos M, Frías S, Ramos S, Estrada A, Arreola JL, Mendoza F, Gaxiola M, Salcedo M, Pardo A, Selman M. Local and circulating microchimerism is associated with hypersensitivity pneumonitis. *Am J Resp Crit Care Med*, 176: 90-95, 2007.
57. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173:188-198, 2006.
58. Sandoval J, Bañales JL, Cortés J, Mendoza F, Selman M. Detection of antibodies against avian antigens in bronchoalveolar lavage from patients with Pigeon Breeder's Disease: usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme immunotransfer blotting. *J. Clin. Lab. Anal.* 4:81-85, 1990.
59. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards T, Yang Y, Yousem S, Becerril C, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Upregulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Medicine* Sep;2(9):e251, 2005.
60. D'Ambrósio D, Mariani M, Panina-Bordignon P and Sinigaglia F. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 164: 1266-1275, 2001.
61. Sallusto F, Lening D, Mackay Ch and Lanzavechia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 187: 875-883, 1998.
62. Keller R, Swartz S, Schlueter D, Bar-Sela S and Fink J. Immunoregulation in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional studies of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Am Rev Respir Dis.* 130:766-771, 1984.
63. Ando M, Konishi K, Yoneda R, Tamura M. Difference in the phenotypes of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, farmer's lung, ventilation pneumonitis, and bird fancier's lung: report of a nationwide epidemiologic study in Japan. *J Allergy Clin Immunol* 87:1002-1009, 1991.
64. Appel JZ 3rd, Lee SM, Hartwig MG, Li B, Hsieh CC, Cantu E 3rd, Yoon Y, Lin SS, Parker W, Davis RD. Characterization of the innate immune response to chronic aspiration in a novel rodent model. *Respir Res* 2007 Nov 27;8 (1):87 [Epub ahead of print]
65. Boismenu R and Harvan W. An innate view of  $\gamma\delta$  T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:57-63, 1997.
66. Goodman T and Lefrancois L. Expression of the  $\gamma\delta$  T cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature.* 333: 855-858, 1988.
67. Itohara S et al. Homing of a  $\gamma\delta$  thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature.* 343:754-757, 1990.

68. Jameson J, Ugarte K, Chen N, et al. A role for skin  $\gamma\delta$  T cells in wound repair. *Science*. 296:747-749. 2002.
69. Komori HK, Meehan TF, Havran WL. Epithelial and mucosal gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 18:534-538, 2006.
70. Dalton JE, Cruickshank SM, Egan CE, Mears R, Newton DJ, Andrew EM, Lawrence B, Howell G, Else KJ, Gubbels MJ, Striepen B, Smith JE, White SJ, Carding SR. Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. *Gastroenterology* 131:818-829, 2006.
71. Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol* 126:25-31, 2006.
72. Simonian PL, Roark C, Diaz Del Valle F, Palmer B, Douglas I, Ikuta K, Born W, O'Brien R, Fontenot A. Regulatory role of gd T cells in the recruitment of CD4+ and CD8+ T cells to lung and subsequent pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2006;177: 4436–4443.
73. Schuyler M, Gott K, Cherne A, Edwards B. Th1 CD41 cells adoptively transfer experimental hypersensitivity pneumonitis. *Cell Immunol* 1997; 177:169–175.
74. Gudmundsson G, Hunninghake G. Interferon-g is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 1997;99:2386– 2390.
75. Rennard S. Th2 cytokine regulation of type I collagen gel contraction mediated by human lung mesenchymal cells. *Am J Physiol* 2002;282:L1049–L1056.
76. Zhang D, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 1997; 272:21597–21603.
77. Zheng D, Flavell R. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587–596.
78. Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rb2 chain or T-bet. *Immunity* 2003;18:415–428.
79. Kimura T, Ishii Y, Yoh K, Morishima Y, Iizuka T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Homma S, Nomura A, Sakamoto T, et al. Overexpression of the transcription factor GATA-3 enhances the development of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2006; 169: 96–104.
80. Kim J, Kim Y, Kim S, Chung J, Park W, Chung D. Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon-g. *Am J Pathol* 2001;167:1231–1241.



81. Hwang S, Kim S, Park W, Chung D. IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-g producing neutrophils. *J Immunol* 2006;177:5258–5268.
82. Kim CH, Butcher EC, Johnston B. Distinct subsets of human Va24- invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol* 2002;23:516–519.
83. Kim J, Kim Y, Kim S, Chung J, Park W, Chung D. Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon-g. *Am J Pathol* 2001;167:1231–1241.
84. Hwang S, Kim S, Park W, Chung D. IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-g producing neutrophils. *J Immunol* 2006;177:5258–5268.
85. Zajac A. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998;188:2205–2213.
86. Gallimore A. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class-1 peptide complexes. *J Exp Med* 1998;187:1383–1393.
87. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med* 2004;10:806–810.
88. Letvin N, Walker B. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 2003;9:861–866.
89. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:215–229.
90. Zhou S, Ou R, Huang L, Price GE, Moskophidis D. Differential tissuespecific regulation of antiviral CD81 T-cell immune responses during chronic viral infection. *J Virol* 2004;78:3578–3600.

# **ANEXOS**

**Tabla 1**

**Fuentes y antígenos involucrados en Neumonitis por Hipersensibilidad**

<b>FUENTE DEL ANTÍGENO</b>	<b>ANTÍGENO</b>	<b>ENFERMEDAD</b>
<b>HONGOS Y BACTERIAS</b>		
Heno enmohecido	<i>Micropolyspora faeni</i>	Neumonitis alérgica por <i>M. faeni</i> o pulmón del granjero
	<i>Termonoactinomyces vulgaris</i>	Neumonitis alérgica por <i>T. vulgaris</i> o pulmón del granjero
Bagazo enmohecido	<i>Termonoactinomyces vulgaris</i>	Neumonitis bagazótica o bagazosis
Abono para champiñones	<i>Micropolyspora faeni</i>	Neumonitis alérgica por <i>M. faeni</i> o pulmón del cultivador de setas
	<i>Termonoactinomyces vulgaris</i>	Neumonitis alérgica por <i>T. vulgaris</i> o pulmón del cultivador de setas
Corcho enmohecido	<i>Penicillium frequentan</i>	Neumonitis alérgica por polvo de corcho o suberosis
Corteza de arce húmeda	<i>Cryptostroma corticale</i>	Neumonitis alérgica por corteza de arce o enfermedad de los descortezadores de arce
Esparto	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Pulmón de los trabajadores de esparto o Estipatosis
Serrín de secuoya	<i>Graphium, Pullularia pullulans</i>	Neumonitis alérgica por <i>Graphium</i> o sequoiosis
Pulpa de madera	<i>Alternaria</i>	Neumonitis alérgica por pulpa de madera o enfermedad de los trabajadores de la pulpa de madera
Cebada enmohecida	<i>Aspergillus clavatus, Aspergillus fumigatus</i>	Aspergilosis alérgica o pulmón de los trabajadores de la malta
Paja enmohecida	<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspergilosis alérgica
Harina de trigo	<i>Sitophilus granarius</i>	Neumonitis alérgica por <i>S. granarius</i> o enfermedad de los molineros
Soja	Polvo de soja	Neumonitis alérgica por polvo de soja
Grano de café	Polvo de grano de café	Neumonitis alérgica por polvo de grano de café
Pimentón molido	<i>Mucor</i>	Neumonitis alérgica por polvo de pimentón

Moho de queso	<i>Penicillium casei. Acaro siro</i>	Pulmón de los lavadores de queso
Tabaco	<i>Aspergillus</i>	Enfermedad de los procesadores de tabaco
Basura de plantas	<i>Streptomyces albus</i>	Enfermedad de los trabajadores de fertilizantes
Embutidos humedecidos	<i>Penicillium. Aspergillus</i>	Pulmón de los limpiadores de embutidos
Harina de pescado	Harina de pescado	Pulmón de los trabajadores de harina de pescado
Acondicionadores y humidificadores. Proteínas de protozoos	<i>Termoactinomyces</i>	Alveolitis por acondicionadores de aire
Caña de azúcar	<i>Termoactinomyces</i>	Pulmón de los cultivadores de caña de azúcar
<b>PROTEÍNAS ANIMALES</b>		
Excremento de paloma, loro y otras. Sueros, proteínas y excrementos aves	<i>Termoactinomyces vulgaris</i>	Neumonitis alérgica por antígenos aviarios o pulmón del cuidador de aves
<b>COMPUESTOS QUÍMICOS</b>		
«Mezcla de Burdeos»	Solución de sulfato de cobre	Pulmón de los rociadores de viñas
Pieles de astracán y zorro	Polvo de la piel	Pulmón de los peleteros
Detergentes enzimáticos	<i>Bacillus subtilis</i>	Pulmón de los detergentes
Pinturas, espumas y adhesivos	Isocianatos, colofonia, Anhídridos ftálicos y trimetílico	Neumonitis alérgica del pintor
Plásticos	Plásticos, colofonia	Pulmón de trabajadores de plástico

**Tabla 2**

**Características demográficas clínicas y funcionales de los pacientes estudiados**

<b>Variable</b>	<b>NH subaguda (n=25)</b>	<b>NH crónica (n=30)</b>	<b>P</b>
Edad	42.1 ± 10.9	50.3 ± 8.1	< 0.01
Sexo (F/M)	22/3	28/2	
Tiempo de síntomas antes del diagnóstico (meses)	3.8 ± 1.6	46.4 ± 16.6	< 0.01
Tabaquismo	3/25	5/30	
Hipocratismo	3/25	14/30	< 0.01
CVF %	61.9 ± 18.7	59.6 ± 17.9	
VEF <sub>1</sub> %	64.5 ± 17.4	61.8 ± 16.0	
VEF <sub>1</sub> /CVF %	92.2 ± 6.9	86.6 ± 15.6	
PaO <sub>2</sub>	53.2 ± 8.2	48.8 ± 8.9	< 0.05
LBA macrófagos %	26.9 ± 12.9	41.5 ± 17.2	< 0.01
LBA linfocitos %	71.2 ± 13.1	56.7 ± 17.3	< 0.01
LBA neutrófilos %	0.9 ± 1.2	1.0 ± 1.8	
LBA eosinófilos %	0.9 ± 2.0	0.6 ± 1.1	
<b><i>Seguimiento (2 años):</i></b>			
Curación/mejoría	16	5	
Estables	6	13	
Empeoraron	3	8	
Defunción	0	4	

CVF= capacidad vital forzada

VEF<sub>1</sub>= volumen espiratorio forzado en el primer segundo

LBA= lavado bronquioalveolar

**Tabla 3**

**Distribución de las subpoblaciones vírgenes y de memoria en las células T de lavado bronquioalveolar y sangre periférica en controles y pacientes con NH subaguda y crónica**

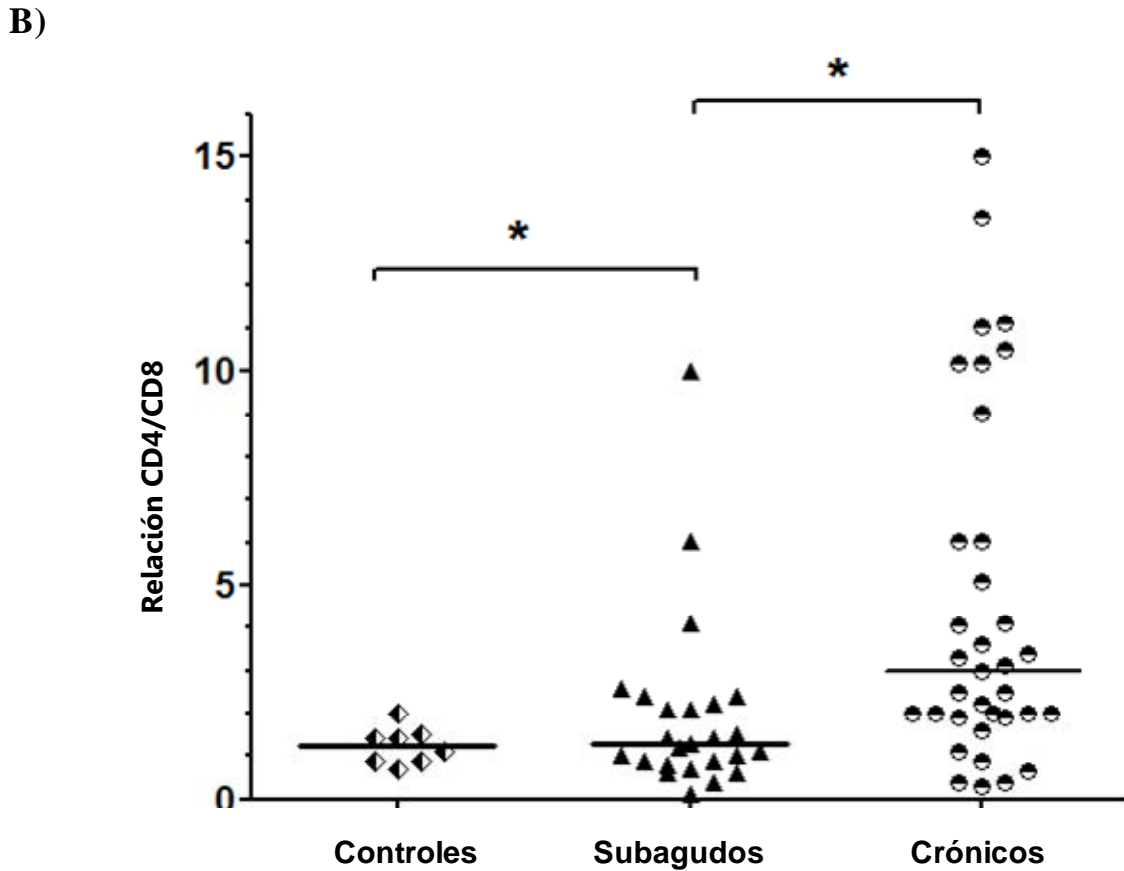
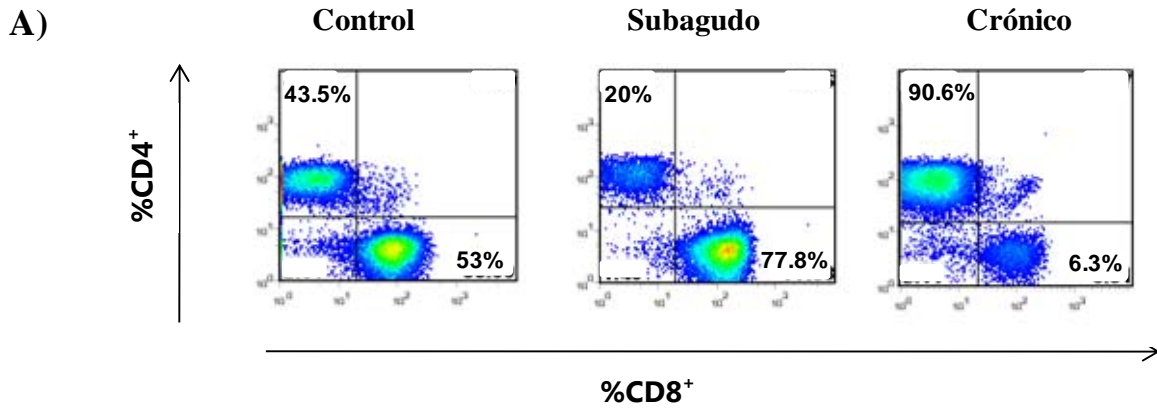
	<b>Controles (n = 8)</b>	<b>NH Subaguda<sup>‡‡</sup> (n = 21)</b>	<b>NH Crónica<sup>‡‡</sup> (n = 20)</b>
<b>Subpoblación CD4<sup>+</sup></b>			
<b>LBA</b>	% células	% células	% células
Vírgenes	1.8 ± 1.1	1.6 ± 1.3	2.0 ± 1.8
Centrales	4.1 ± 2.8	1.4 ± 0.9	2.1 ± 1
Efectoras	93.4 ± 8.9	95 ± 8.0	90 ± 9.3
TEMRA*	0.65 ± 0.1	1.8 ± 1.0	6.7 ± 1.4**
<b>PBMC</b>			
Vírgenes <sup>#</sup>	52.6 ± 3.7	7 ± 3.0	13.0 ± 4.0
Centrales <sup>#</sup>	20.8 ± 4.0	2.3 ± 2.2	3.4 ± 2.6
Efectoras <sup>#</sup>	10.3 ± 1.5	56 ± 10.4	50 ± 8.7
TEMRA <sup>#</sup>	16.1 ± 1.8	35.0 ± 8.0	34.0 ± 13.0
<b>Subpoblación CD8<sup>+</sup></b>			
<b>LBA</b>			
Vírgenes	0	0.4 ± 0.3	1 ± 0.4
Centrales	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.9	1.8 ± 0.6
Efectoras	97.8 ± 2.1	96 ± 7	92 ± 3.4
TEMRA*	1.8 ± 1.7	2.4 ± 0.8	5.0 ± 3.3**
<b>PBMC</b>			
Vírgenes <sup>#</sup>	53.0 ± 6.1	5.0 ± 2.4	6.2 ± 3.0
Centrales <sup>#</sup>	21.7 ± 3.8	1.0 ± 0.9	1.6 ± 1.2
Efectoras <sup>#</sup>	10.5 ± 3.1	48.0 ± 11.0	45.0 ± 6.0
TEMRA <sup>#</sup>	15.2 ± 1.8	47.0 ± 11.0	48.0 ± 5.0

<sup>‡‡</sup> Neumonitis por Hipersensibilidad

\* Efectoras terminales CD45RA+

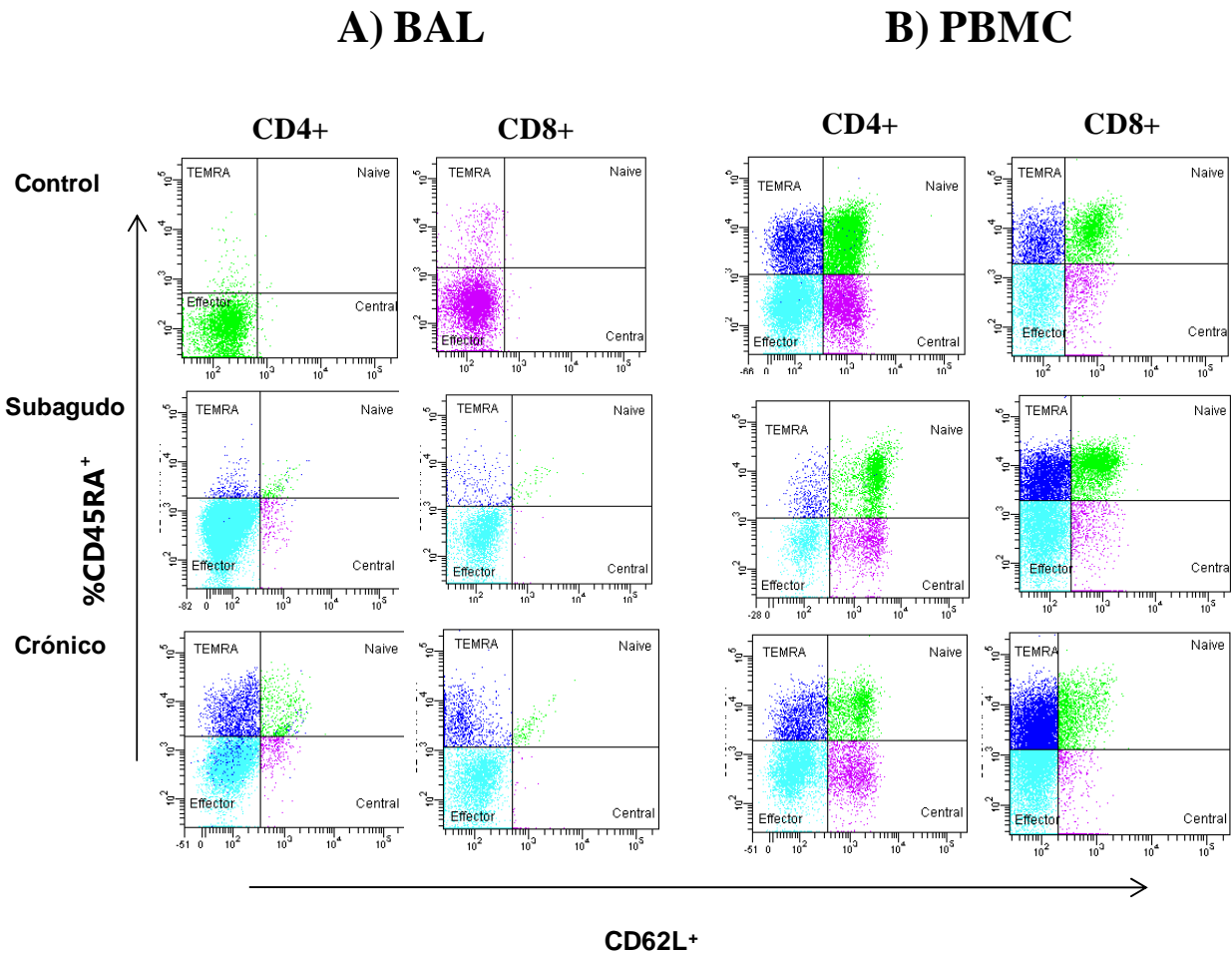
\*\*  $p < 0.05$ , pacientes crónicos comparados con pacientes subagudos y controles

#  $p < 0.01$ , controles versus subagudos y NH crónica



**Figura 1. Relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de controles, pacientes subagudos y crónicos.**

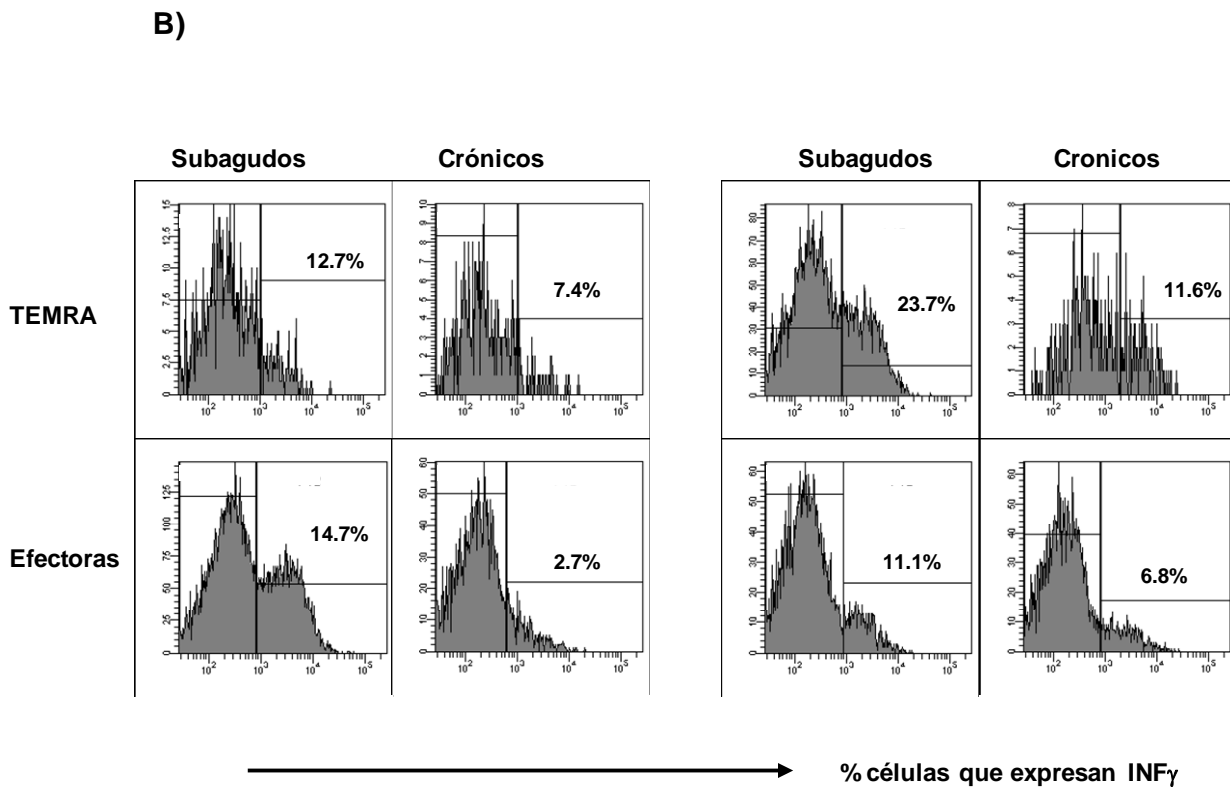
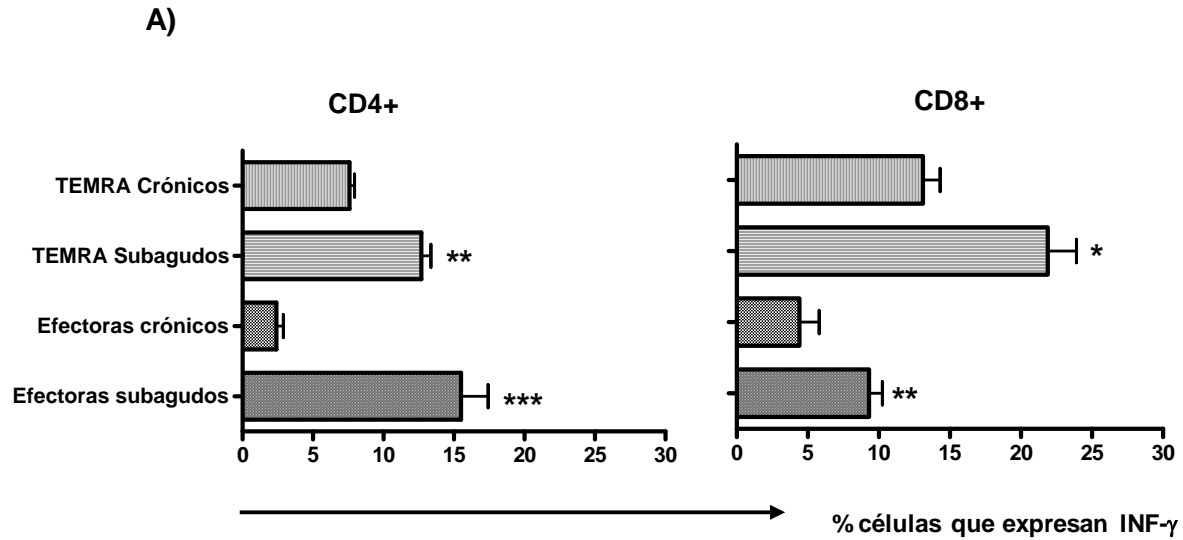
Panel A: Análisis por citometría de flujo representativa de linfocitos T de LBA. Se muestra el porcentaje de células CD4 y CD8 positivas. Panel B: Relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en controles y los grupos de pacientes subagudos y crónicos. Las líneas representa la mediana. \*  $p < 0.01$ .



**Figura 2. Perfil fenotípico de las subpoblaciones de memoria en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> determinado por citometría de flujo**

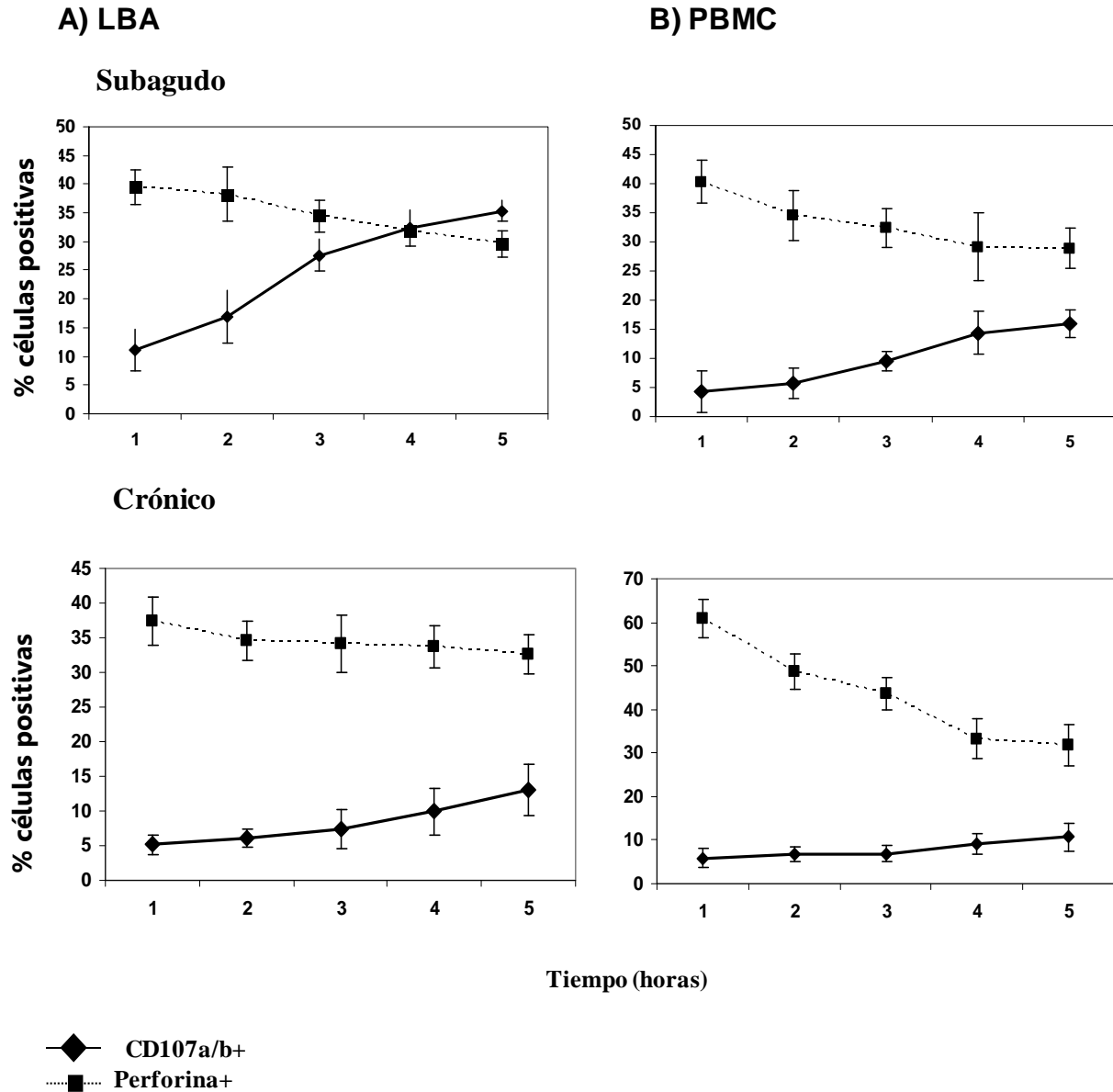
Se tiñeron células de LBA (A) PBMC (B) de 8 controles, 21 pacientes con NH subaguda y 20 crónicos con anticuerpos monoclonales contra CD3, CD4, CD8, CD45RA, y CD62L en un experimento de 5 colores para citometría de flujo. La identificación de las subpoblaciones se basó primero en sus propiedades de dispersión lateral de luz (SSC) contra CD3, posteriormente se realizó un ventana en las células CD4<sup>+</sup> o bien CD8<sup>+</sup>. Por último se analizó la abundancia relativa de cuatro subpoblaciones basada en la presencia de los marcadores CD62L y CD45RA: células T vírgenes (CD45RA+CD62L+), células T de memoria central (CD45RA-CD62L+), células T efectoras (CD45RA-CD62L-) y células T de memoria efectoras terminales (TEMRA) (CD45RA+CD62L-). Se analizaron al menos 10<sup>5</sup> eventos por experimento. Se muestra un ejemplo representativo de cada uno de los grupos analizados.



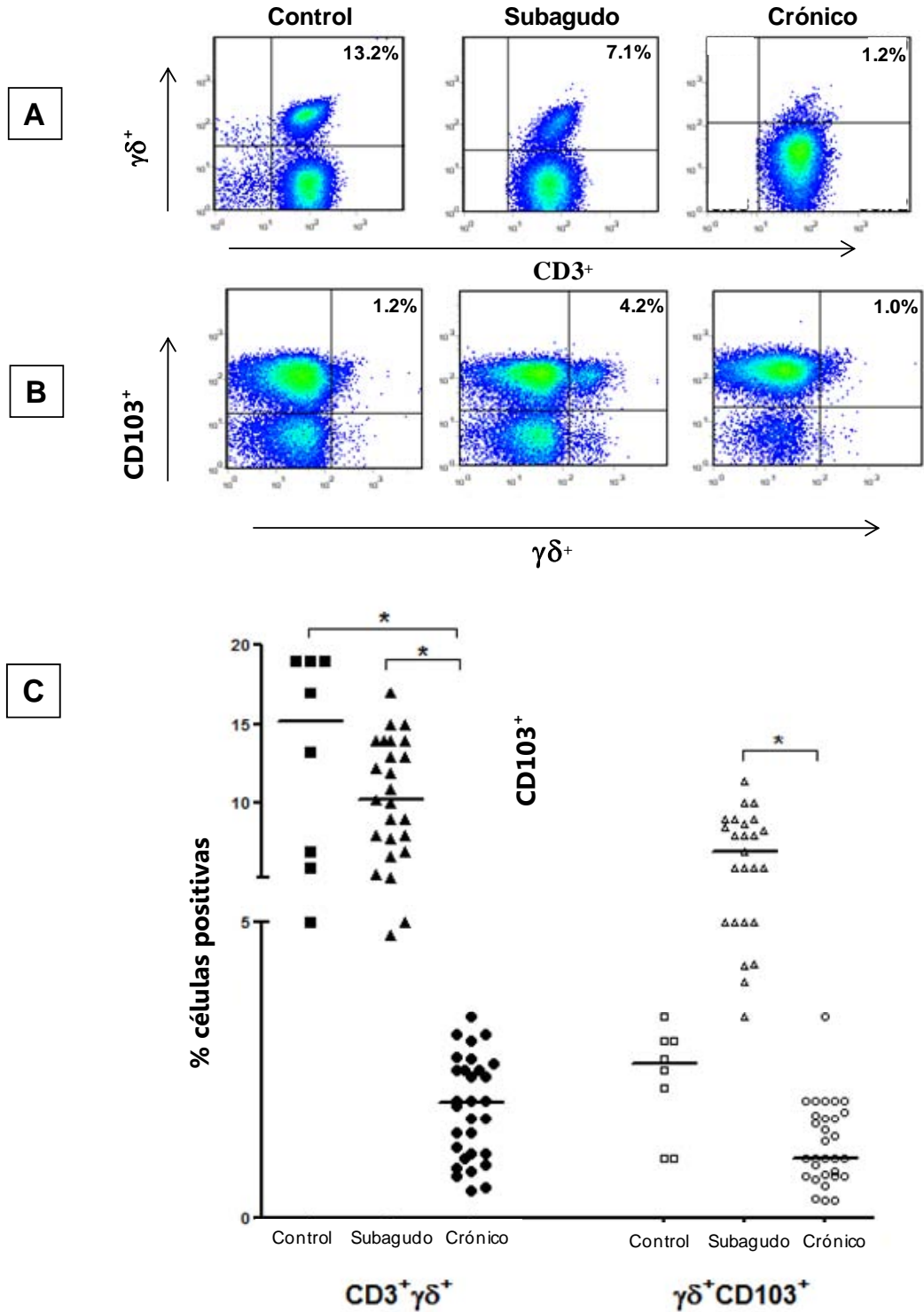


**Figura 3. Ensayo funcional de células T de LBA efectoras y TEMRA**

A) Las subpoblaciones de células efectoras y TEMRA se analizaron con respecto a su expresión de INF-g después de 6 horas de estimulación con PMA/Ionomicina. Las células INF-g positivas se expresan como porcentaje de las células T CD4+ o CD8+ efectoras y TEMRA. Las barras de error indican la desviación estándar (D.E.) de cinco experimentos. B) gráfica de puntos representativa que muestra el incremento de las células INF-g positivas en pacientes con NH subaguda y crónica. \* $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.05$

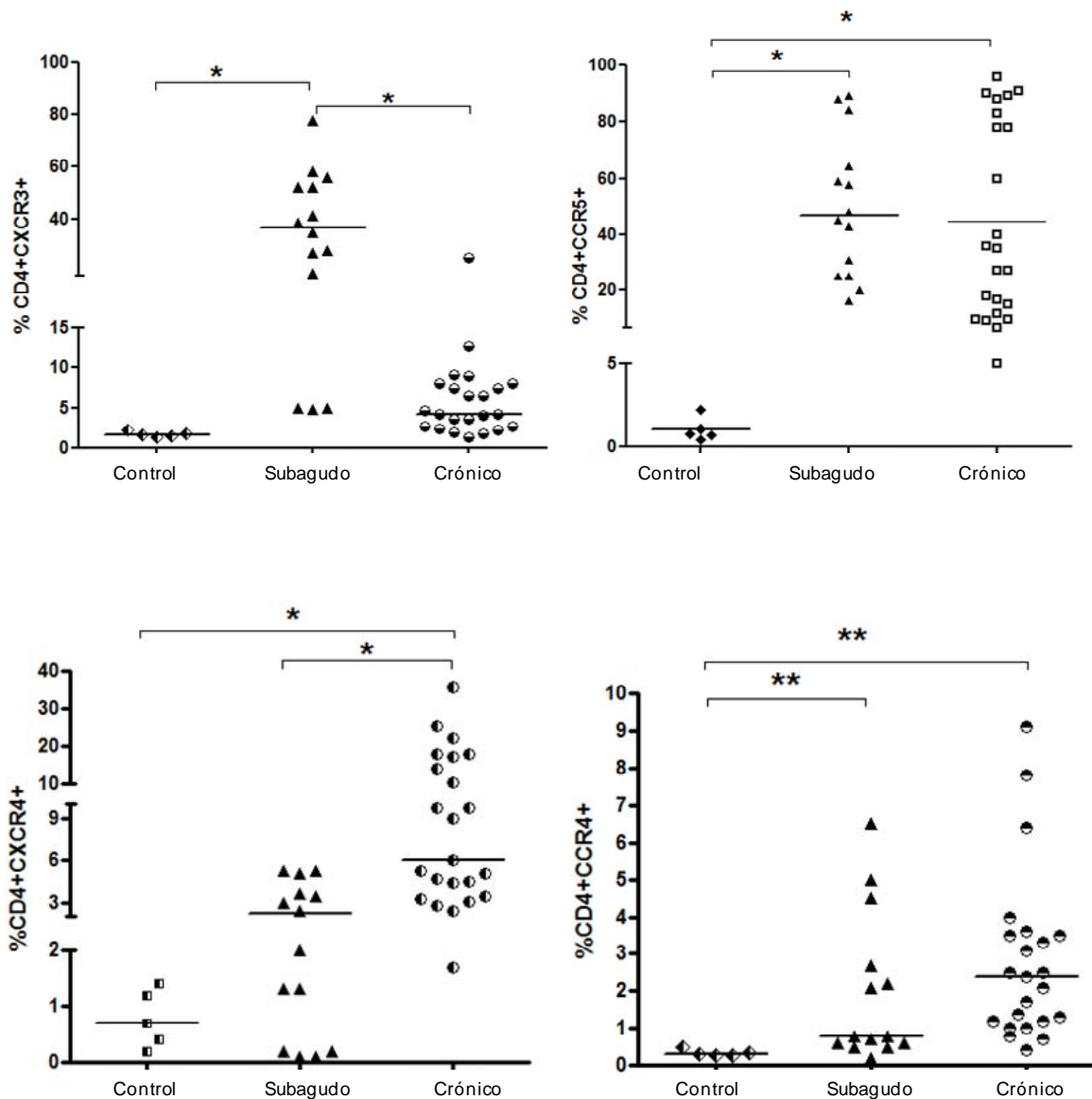


**Figura 4: Liberación de perforina y su correlación con la expresión del marcador de superficie CD107 en células de LBA (A) y PBMC (B).** Las células T de pacientes con NH subaguda y crónica se estimularon con PMA/Ionomicina *in vitro* durante 5 horas en presencia de anti-CD107a/b y brefeldina/monesina. En cada tiempo que se muestra en la figura, se obtuvieron alícuotas de células de cultivo que se lavaron y permeabilizaron para posteriormente teñirlas con perforina, CD3 y CD8. Se muestran los datos promedio de cuatro experimentos diferentes.



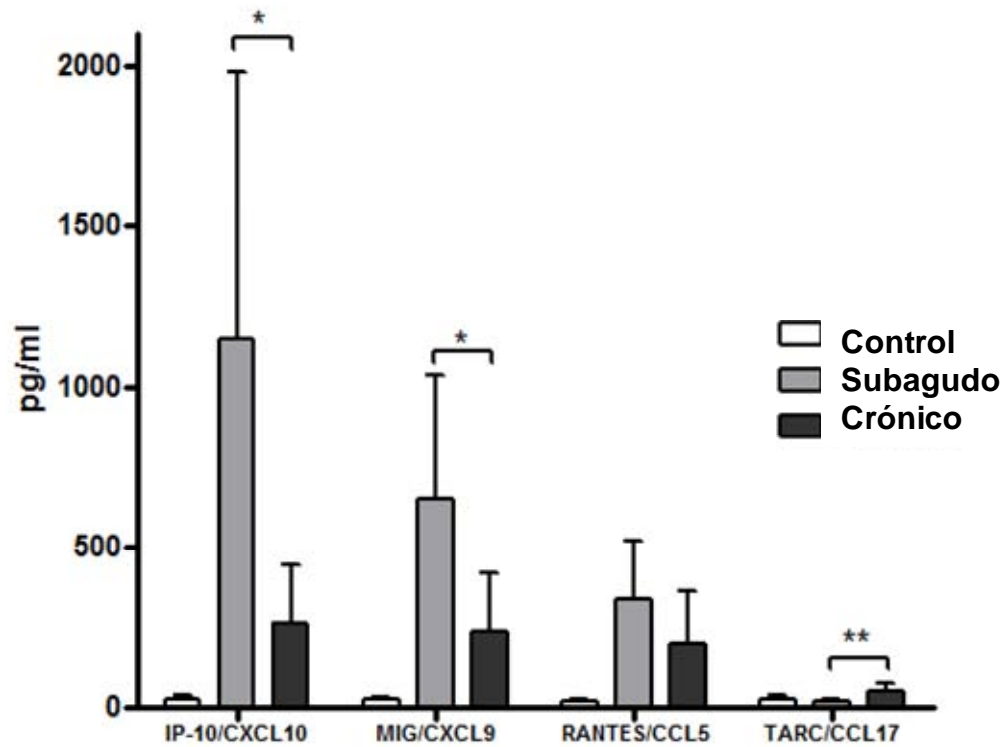
**Figura 5. Células T  $\gamma\delta$  y  $\gamma\delta$  intraepiteliales de LBA.**

Paneles A y B: Gráfica de puntos representativa de las subpoblaciones de células T  $\gamma\delta$  y  $CD103^+$  de 8 controles, 25 pacientes con NH subaguda y 30 crónicos. Panel C: Gráfica vertical que muestra los porcentajes individuales de células T  $\gamma\delta^+$  y  $CD103^+$ . Las líneas horizontales representan la mediana; \* $p < 0.01$ .



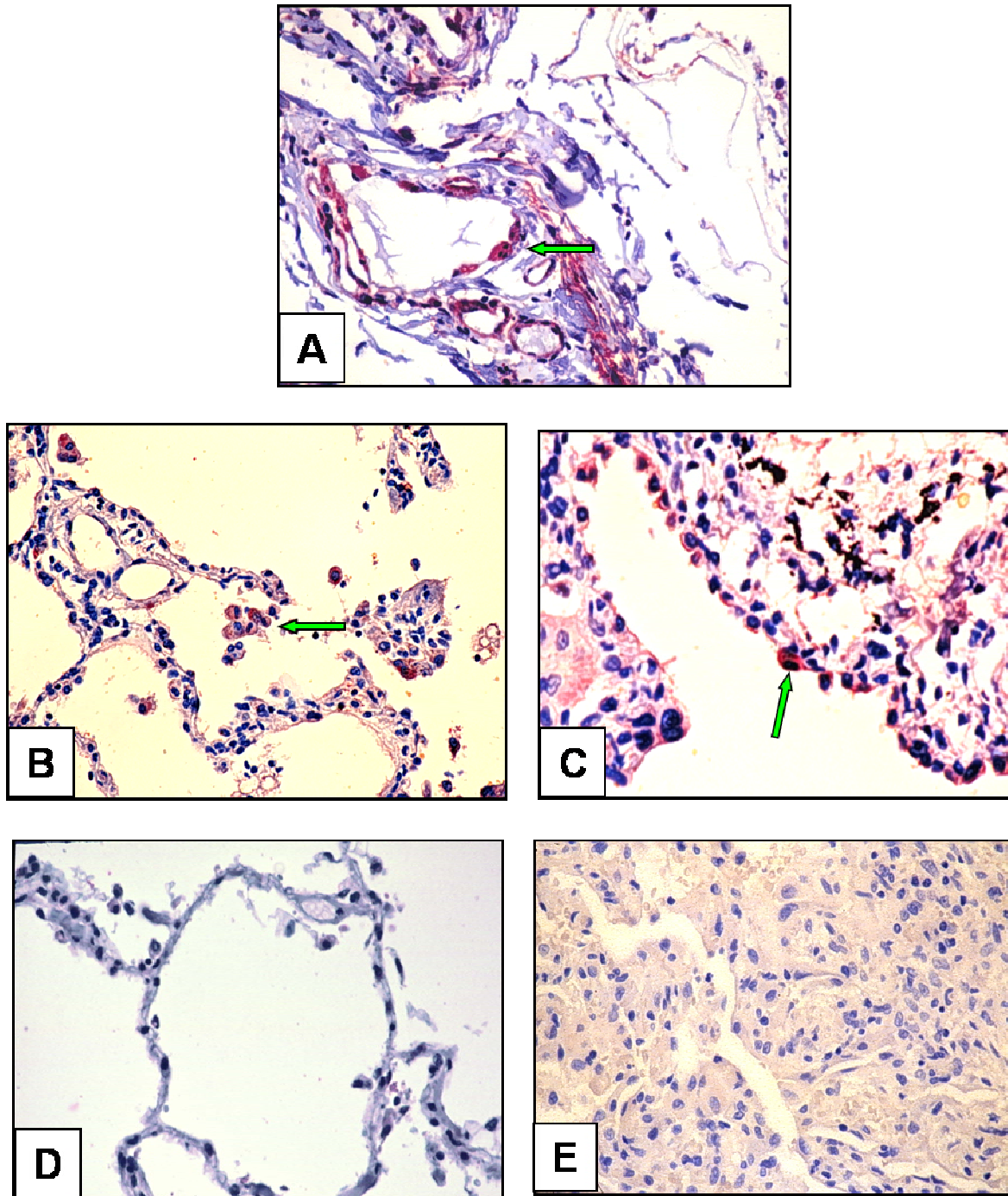
**Figura 6. Expresión de CXCR3, CCR5, CXCR4 y CCR4 en células T de LBA de controles, pacientes con NH subaguda y crónica.**

Las células de LBA fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales específicos y fijadas en paraformaldehído al 1% en un experimento de 6 colores por citometría de flujo. Las líneas horizontales representan las medianas. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.05$ .

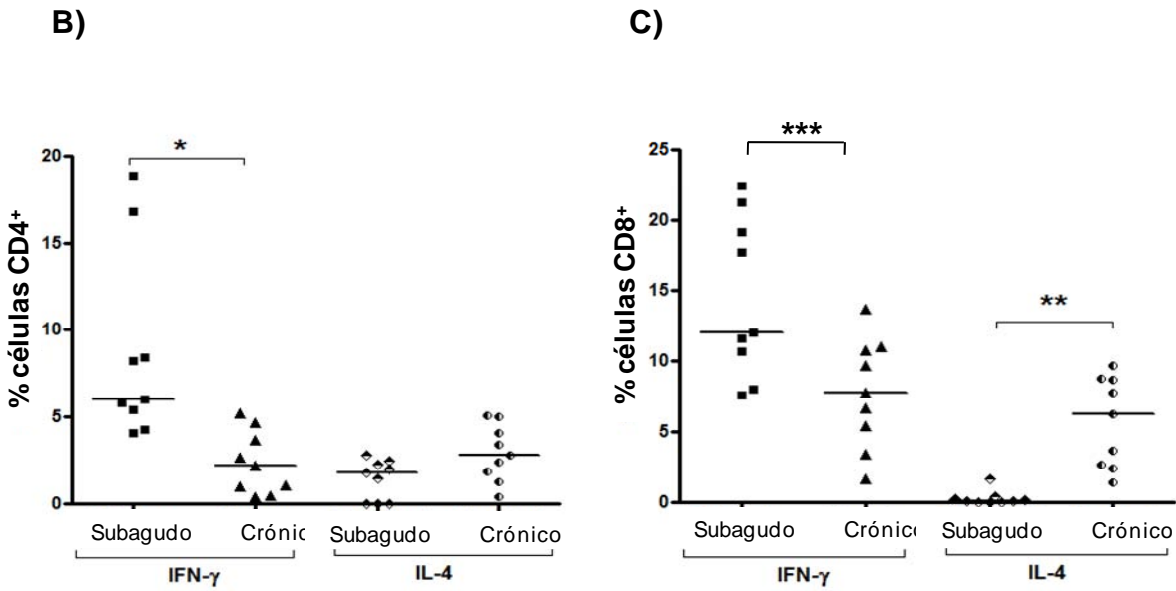
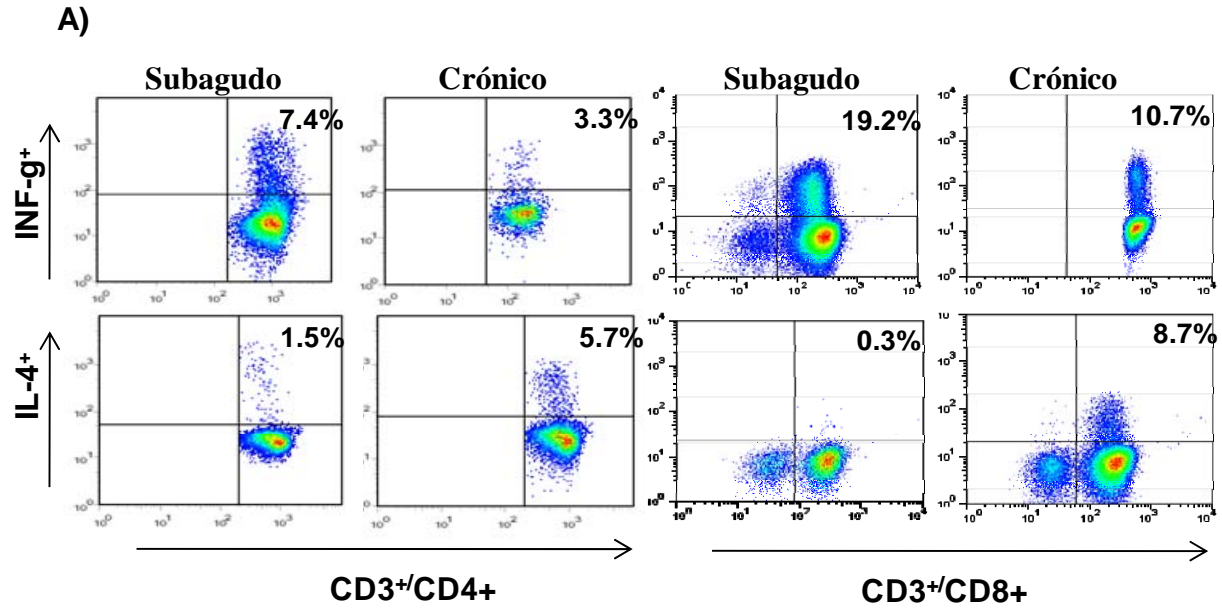


**Figura 7. Concentraciones de IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, RANTES/CCL5 y TARC/CCL17.**

Gráfica vertical que muéstralas concentraciones de las diferentes quimiocinas medidas en líquido de LBA en controles, pacientes con NH subaguda y crónica. Los niveles de las quimiocinas se midieron por ELISA como se describe en los métodos. Los datos se representan como medias y D.E. \*P, 0.01; \*\*P, 0.05



**Figura 8.** Inmunolocalización de IP-10/CXCL10 y MIG/ CXCL9 en pulmones con NH. Las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 inmunoreactivas se tiñen con 3-amino-9-etil-carbazol y hematoxilina. (A) La quimiocina CXCL9 se observa principalmente en la células endoteliales (flecha). (B) La quimiocina CXCL10 se tiñe en macrófagos (flecha). (C) Se observa una fuerte tinción de CXCL10 en células epiteliales alveolares (flecha). (D) En el pulmón normal no se observa marcaje de CXCL10. (E) Control negativo en pulmón con NH donde se omitió el anticuerpo primario durante el marcaje. Aumento original, 340.



**Figura 9. Expresión intracelular de citocinas en células T de LBA de pacientes con NH subaguda y crónica.**

Panel A: Gráfica de puntos representativa de la producción de INF-g e IL-4 por linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con NH subaguda y crónica. Se presentan los resultados como porcentajes de linfocitos T CD4+ dobles positivos para cada citocina. Panel B y C: Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ que produjeron INF-g e IL-4 tras la estimulación antígeno específica con suero de paloma durante 6 horas. Cada símbolo representa un paciente individual. Las líneas representan las medianas; \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.05$