



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**“Perfil Inflamatorio en la EPOC Secundaria a la Exposición
del Humo de Leña”**

Tesis que para optar por el grado de:
Doctora en Ciencias Biomédicas

Presenta:

QFB. Helena Solleiro Villavicencio

Tutora principal:

Dra. María Inés Vargas Rojas
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío
Villegas

Comité tutorial:

Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Edda Sciutto Conde
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

México, D.F., noviembre de 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos académicos

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca doctoral número 279864.

Asimismo, agradezco el apoyo económico recibido por la LXI Legislaturas de la Cámara de Diputados, a través de su Comisión de Equidad y Género, de la asignación presupuestaria para la Atención de las Enfermedades Usando madera asociadas en 2012.

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract.....	6
2. Introducción.....	8
3. Marco Teórico	
3.1 Definición.....	10
3.2 Epidemiología	
3.3 Factores de riesgo que influyen en el desarrollo y progresión de la EPOC.....	12
3.4 Patogenia.....	15
3.4.1 Inmunopatogenia de la EPOC.....	18
3.4.2.1 Origen de la inflamación sistémica en la EPOC.....	26
3.4.2.2 La fisiopatología de la inflamación sistémica.....	29
3.5 Diagnóstico de la EPOC.....	33
3.5.1 Sospecha clínica: signos y síntomas.....	33
3.5.2 Diagnóstico y estudio del paciente.....	35
4. La EPOC asociada a la exposición al humo de biomasa	
4.1 La exposición al humo de biomasa.....	39

4.2 La exposición al humo de biomasa en los países emergentes.....	40
4.3 Componentes del humo de biomasa y sus efectos en la salud.....	41
4.4 La respuesta inflamatoria de las vías aéreas y los pulmones asociada a la exposición al humo de biomasa.....	45
4.5 La EPOC asociada a la exposición al humo de biomasa.....	50
5. Justificación.....	53
6. Hipótesis.....	54
7. Objetivos	
7.1 Objetivo general.....	54
7.2 Objetivos particulares.....	54
8. Metodología	
8.1 Panorama general.....	55
8.2 Diagnóstico y factores de riesgo.....	55
8.3 Valoración.....	56
8.4 Sujetos.....	56

8.5 Procesamiento de las muestras sanguíneas.....	57
8.6 Evaluación de las células por citometría de flujo.....	59
8.7 Concentración de citocinas séricas.....	60
8.8 Análisis estadístico.....	61
9. Resultados	
9.1 Sujetos.....	63
9.2 Células T CD4 ⁺ y concentración de citocinas.....	65
10. Discusión.....	69
11. Conclusión.....	76
12. Perspectivas.....	76
13. Referencias.....	77
ANEXO I.....	101
ANEXO II.....	109
Cuadro suplementario I.....	111
Artículo original.....	112

1. Resumen

El tabaquismo y la exposición al humo de biomasa inducen la liberación de mediadores proinflamatorios y la activación de las células T cooperadoras (Th, por las siglas en inglés *T helper cells*). La respuesta inflamatoria resultante contribuye al desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Existe heterogeneidad clínica entre los pacientes con EPOC, en particular entre los pacientes con enfermedad asociada con el consumo de tabaco (EPOC-TAB) y las personas expuestas al humo de biomasa (EPOC-BM). El objetivo de este estudio fue identificar si la exposición a humos de tabaco y de biomasa promueve diferentes respuestas de tipo Th que contribuyen a la variabilidad clínica de la enfermedad. El estudio sólo incluyó a mujeres. La frecuencia de las células Th17 en pacientes con EPOC-TAB fue significativamente mayor que en pacientes con EPOC-BM y controles sanos (CS). En contraste, los pacientes con EPOC-BM tenían niveles más altos de células Th2 que EPOC-TAB y CS. En correlación, la concentración de la IL-4 en suero fue mayor en EPOC-BM que en EPOC-TAB. Estos datos sugieren que las diferentes respuestas inducidas por estos dos humos pueden subyacer a la heterogeneidad clínica entre los pacientes con EPOC-TAB y EPOC-BM.

Abstract

Smoking and exposure to biomass smoke induce the release of pro-inflammatory mediators and the activation of T helper cells. The resulting inflammatory response contributes to the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Clinical heterogeneity exists among COPD patients, particularly between patients with disease associated with tobacco smoking (TS-COPD) and those exposed to biomass smoke (BE-COPD). The aim of this study was to identify whether exposure to tobacco and biomass smokes promotes different Th responses that contribute to clinical variability. The study only included women. Frequency of Th17 cells in patients with TS-COPD was significantly higher than in patients with BE-COPD and healthy controls (HC). In contrast, patients with BE-COPD had higher levels of Th2 cells than TS-COPD and HC. In accordance, IL-4 serum concentration was higher in BE-COPD than in TS-COPD. Our data indicates that the different responses induced by these two irritants may underlie the clinical heterogeneity between TS- and BE-COPD patients.

2. Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un trastorno pulmonar y de las vías aéreas que se caracteriza por la persistencia de la limitación del flujo aéreo como resultado del daño de la vía aérea pequeña (bronquiolitis), la hipersecreción de moco y la destrucción del parénquima pulmonar (enfisema) ¹. Estas modificaciones provocan la aparición de los síntomas característicos de la EPOC: la tos crónica, la producción de esputo y la disnea.

Existen varios factores que influyen en el desarrollo de la EPOC, entre éstos se encuentran: la predisposición genética (por ejemplo, la deficiencia de la α 1-antitripsina, AAT), el desarrollo y crecimiento deficiente de los pulmones, y la exposición a partículas nocivas presentes en el humo de cigarro y biomasa. Se ha identificado al tabaquismo como la principal causa asociada al desarrollo de la EPOC; sin embargo, en países emergentes, como México, la exposición al humo de biomasa se considera un factor de riesgo importante ².

La EPOC es la tercera causa de muerte en el mundo, provocando el fallecimiento de aproximadamente 3 millones de personas al año ³. A nivel mundial, la prevalencia de esta enfermedad en adultos mayores de 40 años es superior al 10% ⁴, mientras que en México es del 7.8% ⁵. Alrededor de 65 millones de sujetos han sido diagnosticados con EPOC de los cuales entre el 60 y 70% de los casos se deben al tabaquismo, del 25 al 35% a la exposición crónica al humo de biomasa ⁶, del 1 al 5% a la deficiencia de la AAT ⁷, y el resto se debe a causas diversas.

A través de la práctica clínica se ha identificado que los pacientes con EPOC secundaria a la exposición a biomasa (EPOC-BM) presentan fenotipo clínico

particular, distinto al de la EPOC por tabaquismo (EPOC-TAB). Al comparar a ambos grupos, se ha observado que los pacientes con EPOC-BM presentan un mayor engrosamiento de las paredes bronquiales, más bronquiectasias e hiperreactividad bronquial, y una menor cantidad de signos de enfisema pulmonar. Por otro lado, la tomografía computarizada ha hecho evidente una mayor afectación de la vía aérea pequeña en los pacientes con EPOC-BM⁸⁻¹¹.

El humo de cigarro y de biomasa poseen varias moléculas tóxicas en común, las diferencias en su composición básicamente residen en la concentración de los compuestos. Ambos humos son capaces de estimular la secreción de mediadores inflamatorios que conducen a la activación y diferenciación de las células T cooperadoras (Th, por las siglas en inglés de *T helper cells*). Sin embargo, es probable que las diferencias clínicas entre EPOC-BM y EPOC-TAB se deban, por lo menos parcialmente, al predominio de cierta(s) subpoblacion(es) de células T CD4⁺, así como a un microambiente de composición distinta.

3. Marco Teórico

3.1 Definición

La EPOC es una enfermedad inflamatoria prevenible y tratable que se caracteriza por la obstrucción del flujo aéreo, por lo general progresiva, y parcialmente reversible ¹². Esta limitación respiratoria está asociada con la bronquiolitis y el enfisema. La respuesta inflamatoria exagerada y crónica, característica de la EPOC, provoca cambios estructurales, así como el engrosamiento de las paredes de la vía aérea pequeña (bronquiolos menores, conductos con un calibre menor a 2 mm de diámetro). El enfisema pulmonar, producido también por los mecanismos inflamatorios, conduce a la pérdida de las uniones entre los alvéolos y las vías aéreas, y reduce la elasticidad pulmonar. En consecuencia, estas modificaciones disminuyen la capacidad de las vías aéreas de permanecer dilatadas durante la espiración ¹.

3.2 Epidemiología

De acuerdo con informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la EPOC es la tercera causa de mortalidad a nivel mundial ³, provocando el deceso de más de 3 millones de personas al año. En México ocupa el séptimo lugar y causa anualmente la muerte de más de 19 mil mexicanos ¹³.

La prevalencia de esta enfermedad en la población de más de 40 años a nivel mundial es aproximadamente del 10% ³, en tanto que en México es del 7.8% ⁴. A pesar de la complejidad para medir su prevalencia, se puede afirmar que en muchos países está aumentando, que es mayor en fumadores que en exfumadores, en individuos de más de 40 años de edad, y predomina en el sexo

masculino. Sin embargo, el perfil etario ha cambiado a lo largo del tiempo, ya que anteriormente se consideraba a la EPOC una enfermedad de los fumadores de la tercera edad, y actualmente se ha observado un predominio de la enfermedad en personas en edad laboral, donde el 70% de los pacientes son menores de 65 años¹⁴.

A nivel mundial la EPOC se considera una enfermedad asociada al tabaquismo y con predominio en hombres; sin embargo, en países emergentes, la exposición al humo de biomasa constituye un factor de riesgo importante, principalmente para las mujeres¹².

Existen estudios internacionales que reportan que los pacientes con EPOC tienen una menor esperanza de vida en comparación con los sujetos de la misma edad que no tienen la enfermedad. En México se realizó un estudio de sobrevida en el cual se determinó que a 8 años el 26% de los pacientes con EPOC fallecen¹⁵. Asimismo, este estudio permitió comparar la sobrevida de los pacientes con EPOC-TAB y la EPOC-BM. En términos de sus características clínicas y los factores asociados a la mortalidad, aunque la afección funcional es menor en los sujetos con EPOC-BM, la calidad de vida, la capacidad de ejercicio y la sobrevida están afectadas de forma similar. En general, los factores más importantes que influyen en la sobrevida de las personas que padecen EPOC son la función pulmonar (medida por el volumen espiratorio forzado al primer segundo, VEF₁), la edad y el índice de masa corporal.

La EPOC produce impacto socioeconómico importante en los sistemas de salud, así como en la economía de las familias. En Estados Unidos se ha estimado que los costos anuales de la enfermedad ascienden a más de 24 millones de dólares¹⁶.

Por otro lado, a menor edad de inicio de la enfermedad, más son los años de esperanza de vida perdidos, llegando a reducir hasta en un 60% la esperanza de vida si la EPOC empieza a los 45 años ¹⁷, y esto es relevante pues afecta a la población económicamente activa ¹².

En cuanto al impacto económico de la EPOC en México, en un estudio de los costos de la atención médica atribuibles al tabaco realizado en el 2001 en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ¹⁸, la EPOC mostró que genera en promedio un gasto de 73 mil pesos mexicanos anuales por paciente. Esta cifra puede ascender hasta 140 mil pesos cuando el paciente es hospitalizado debido a una exacerbación del cuadro. Es decir que el costo de la EPOC varía de acuerdo al grado de gravedad de la enfermedad.

3.3 Factores de riesgo que influyen en el desarrollo y progresión de la EPOC

La EPOC surge como resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. A continuación se analizará cada uno de los factores de riesgo identificados que influyen en el desarrollo y progresión de la EPOC.

- Genes. El factor genético que mejor se ha documentado es la deficiencia de la α 1-antitripsina ¹⁹, que es uno de los principales inhibidores de las serina proteasas. Esta deficiencia afecta al 1-5% de los pacientes con EPOC ⁷.

Se ha relacionado a algunas variantes génicas con la caída de la función pulmonar. A pesar de que varios estudios del genoma completo (GWAS, por las siglas en inglés de *genome-wide association*) han sugerido la participación en el desarrollo de la EPOC a genes como el del receptor alfa-nicotínico de acetilcolina, aún persiste la controversia entre los resultados

obtenidos en el análisis de la EPOC y la función pulmonar, así como los análisis GWAS y de genes candidato²⁰.

- Edad y género. Se ha relacionado a la edad como un factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC. No es del todo claro si el envejecimiento como tal conduce a la EPOC, o si es la asociación con la edad es un reflejo de la suma acumulada de distintas exposiciones a lo largo de la vida¹. Hace tiempo varios estudios mostraban que la prevalencia y mortalidad de la EPOC era mayor en el género masculino que en el femenino¹⁵; sin embargo, en la actualidad los estudios realizados en países desarrollados muestran cifras similares entre hombres y mujeres, lo que refleja cambios en el patrón del consumo de tabaco. Por otro lado, existen estudios que sugieren que las mujeres son más susceptibles a los efectos del humo de tabaco que los hombres²¹; se ha demostrado que esto se debe a diferencias en la secreción hormonal²².
- Infecciones respiratorias y tos recurrente en la infancia. Las infecciones del tracto respiratorio inferior en la infancia se asocian con la presencia de síntomas respiratorios en la edad adulta y, en consecuencia, con el aumento de la probabilidad de desarrollo de la EPOC²³. Los eventos respiratorios que ocurren en etapas tempranas de la vida limitan el desarrollo del aparato respiratorio y la función pulmonar, y son un factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC.
- Bajo nivel socioeconómico. Los factores socioeconómicos (escolaridad, recursos económicos, entorno ambiental, etc) que operan desde etapas tempranas de la vida afectan el riesgo en la vida adulta de desarrollar

EPOC, independientemente del consumo de tabaco, tanto en hombres como en mujeres ²⁴. No es totalmente claro cómo influyen dichos factores, sin embargo, los bajos recursos se han asociado con la exposición crónica a contaminantes intradomiciliarios y laborales, el hacinamiento, el déficit alimentario y las infecciones recurrentes ¹, que podrían favorecer el desarrollo de la enfermedad.

- Humo de tabaco. Es la principal causa de la EPOC. La OMS ha estimado que en los países desarrollados, alrededor del 73% de los decesos relacionados con la EPOC se deben a antecedentes de tabaquismo, mientras que en países en desarrollo esta proporción es del 40% ²⁵. El desarrollo de la EPOC por tabaquismo está parcialmente relacionado con la susceptibilidad genética, ya que no todos los fumadores desarrollan la enfermedad. Con respecto a la intensidad de la exposición al humo de tabaco, el haber fumado intensamente por lo menos 20 cigarros (una cajetilla) al día por más de 10 años, hace a una persona susceptible de desarrollar la enfermedad ¹².

La prevalencia del tabaquismo varía ampliamente según las regiones ²⁶. Los datos del Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar (PLATINO) ²⁷ muestran que la prevalencia del tabaquismo varía considerablemente entre ciudades, desde 23.9% en San Paulo a 38.5% en Santiago de Chile, predominando en hombres.

- Exposición al humo de biomasa. El término biomasa se define como “ el grupo de materiales biológicos (organismos vivos, animales y vegetales, y sus derivados) que están presentes en un área específica”. La mitad de la

población mundial (alrededor de 3 mil millones de personas) utiliza como combustibles a este tipo de materiales ⁶.

La leña es el tipo de biomasa más comúnmente utilizada en el mundo. Ésta se utiliza de manera no procesada o como carbón vegetal ²⁸. Generalmente el estiércol de los animales y los residuos de la cosecha, son los materiales menos utilizados, excepto en los lugares en donde la madera escasea.

Se ha encontrado una asociación directa entre el número de horas de exposición al humo de biomasa y la presencia de bronquitis crónica. Para las personas expuestas a más de 200 horas/año (índice que resulta de multiplicar el número de horas de exposición al día, por los años de haber estado expuesto al humo de biomasa) el riesgo de desarrollar EPOC es 75 veces mayor que en los sujetos no expuestos ²⁹.

3.4 Patogenia

La EPOC es una enfermedad inflamatoria que afecta la vía aérea, los alvéolos y la circulación pulmonar. El sitio principal de afectación es la vía aérea pequeña y el esqueleto elástico de los pulmones (fibras de elastina y colágeno) ³⁰. El daño de estas estructuras es precoz en la evolución de la enfermedad, y lleva a todas las alteraciones funcionales del aparato respiratorio, así como a sus manifestaciones clínicas. Al mismo tiempo y por diversos mecanismos, se activan manifestaciones sistémicas de la enfermedad que provocan efectos extrapulmonares (músculo esquelético, grasa corporal, etc.) ^{31,32} (*figura 1*).

Los mecanismos patogénicos mejor estudiados son los provocados por el humo del cigarro, mientras que todavía hay muy pocos trabajos relacionados con la

inhalación de productos derivados de la combustión de biomasa u otros inhalantes. Los diferentes agresores inhalados desencadenan un proceso inflamatorio crónico persistente en el tiempo ³¹ .

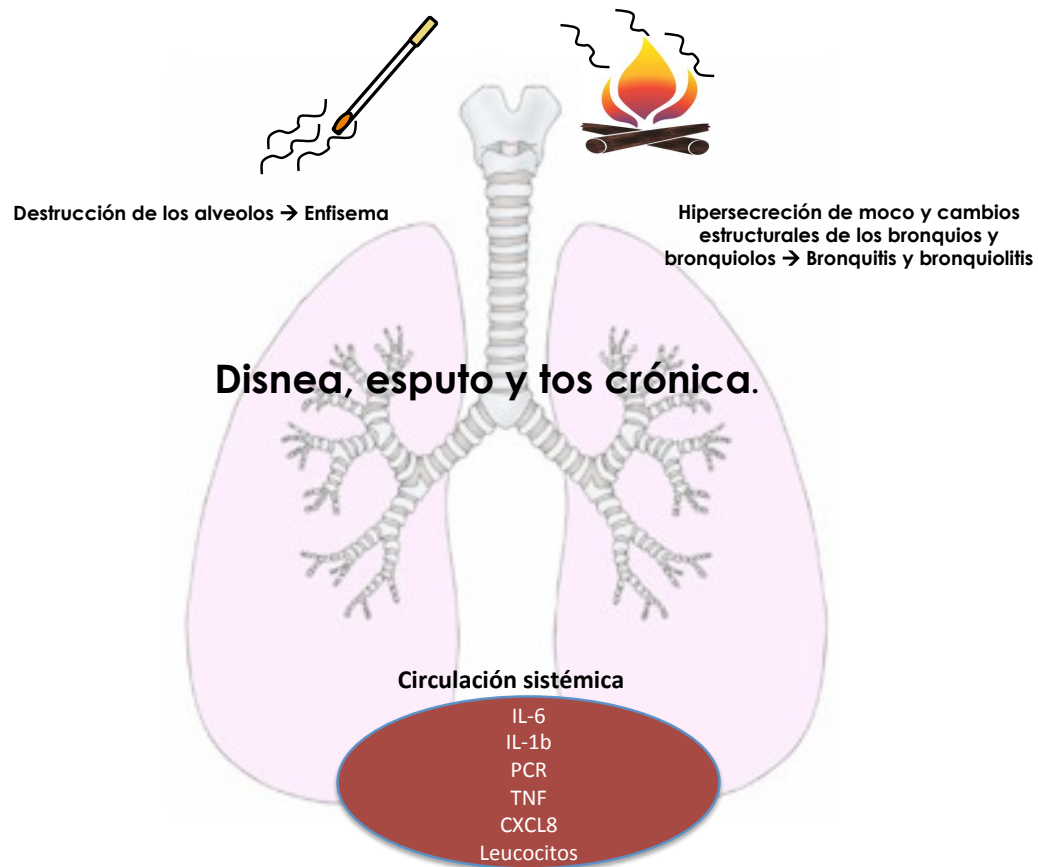


Figura 1. Patogenia de la EPOC. La exposición al humo de biomasa o el tabaquismo desencadenan mecanismos inflamatorios que, en algunos individuos, conducen al desarrollo de las patologías características de la EPOC: enfisema, bronquitis y bronquiolitis. Éstas favorecen la aparición de síntomas como la disnea, el esputo y la tos crónica. La inflamación en la EPOC, no sólo es local, sino que, en muchos casos, se extiende a la circulación sistémica.

El resultado final de la inflamación crónica es el engrosamiento de la pared bronquial con disminución del calibre (bronquitis y bronquiolitis), y la destrucción alveolar con agrandamiento de los espacios aéreos y pérdida de

los anclajes bronquiales (enfisema pulmonar). Las consecuencias funcionales son la obstrucción al flujo aéreo, la disminución de los espacios de intercambio aéreo, el colapso espiratorio del árbol bronquial y la pérdida del retroceso elástico.

La inflamación es un mecanismo activo y progresivo. La regulación de este mecanismo es cada vez más difícil a medida que la enfermedad progresa y se establece el daño estructural ³¹.

Si bien, las lesiones de la vía aérea y el parénquima pulmonar suelen coexistir, la distribución y combinación de las mismas son variables en las diferentes zonas del aparato respiratorio, y de un sujeto a otro. Los estudios con imágenes muestran que hay pacientes con daño predominante en la vía aérea (paredes bronquiales) y otros con daño predominante en los alvéolos. Las mujeres tienen más compromiso bronquial y los hombres más compromiso alveolar a igualdad de exposición, y esto es más notable en las personas que siguen fumando ³³⁻³⁵.

Los pacientes con EPOC además tienen evidencias de inflamación sistémica, que se manifiesta con el aumento de la concentración de factores proinflamatorios como citocinas (IL-6, TNF, IL-1 β), quimiocinas (CXCL8), proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), y cambios en el número y la funcionalidad de las células circulantes (neutrófilos, monocitos, linfocitos) ³².

3.4.1 Inmunopatogenia de la EPOC

Las células que desempeñan un papel importante en la fase efectora de la respuesta inflamatoria presente en la EPOC son los neutrófilos, los macrófagos, las células dendríticas (CD) y los linfocitos T y B. Varios estudios han revelado que en el lavado bronquioalveolar (LBA) y el músculo liso de las vías aéreas de los pacientes con EPOC se encuentra aumentado el número de neutrófilos ³⁶. Éstos estimulan la secreción de moco, ya que favorecen la expresión de mucina mediante la producción de elastasa y especies reactivas de oxígeno ³⁷.

Los macrófagos son los principales secretores de metaloproteinasas de matriz (MMP, las siglas en inglés de *matrix metalloproteinase*) particularmente la MMP-9; también secretan otras proteasas como las colagenasas 1 y 2, y las gelatinasas A y B ³⁸. Estas enzimas contribuyen en la destrucción del pulmón y el daño de las vías aéreas. Se ha observado que el número de macrófagos se encuentra aumentado en el esputo ³⁹ y el LBA ⁴⁰ de los pacientes con EPOC, al compararse con controles sanos.

Los estudios relacionados con la participación de los linfocitos T en la EPOC se han enfocado principalmente en los linfocitos T CD8⁺. Se ha demostrado que existe un aumento del número de estas células en las biopsias bronquiales de los pacientes con EPOC, al compararse con las de fumadores sin EPOC ⁴¹. La participación de estas células reside en la citotoxicidad mediada por granzimas y perforinas, ya que se ha demostrado que en el esputo y LBA de los pacientes con EPOC existe un aumento en la cantidad de perforinas ⁴².

Se ha observado que el número de células T CD4⁺ aumenta en las vías aéreas y la sangre periférica de los pacientes con EPOC ^{43, 44}. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13, y es mediante esta última que estimulan la secreción de moco ⁴⁵. Por su parte, las células Th1 son productoras del IFN- γ , que estimula la activación de macrófagos ⁴⁶. Se ha encontrado un incremento en la frecuencia de células Th17 en la sangre periférica de pacientes con EPOC-TAB; asimismo, se sabe que existe una correlación negativa entre la proporción de células Th17 y el grado de obstrucción pulmonar ⁴³. Estas células han sido identificadas por el papel crítico que juegan en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes ⁴⁷. Su nombre deriva de la capacidad que poseen de producir la IL-17A y la IL-17F, citocinas que normalmente no son secretadas por las células Th1 o Th2 ⁴⁸. La importancia de estas células en el desarrollo de la EPOC es que la IL-17A estimula a las células epiteliales y a los fibroblastos de la vía aérea, y las células del músculo liso del pulmón para que secreten las quimiocinas que favorecen el reclutamiento de neutrófilos ⁴⁹.

A pesar de que se ha observado un aumento significativo de las células T reguladoras (Treg) en la sangre periférica de pacientes con EPOC-TAB ⁵⁰, al compararse con fumadores sin EPOC y controles sanos, aparentemente éstas no actúan de manera eficiente, o bien, las células efectoras presentan cierta resistencia a ser reguladas ⁴³.

Las células B también se encuentran aumentadas en los pacientes con EPOC. Tal como se ha observado en otros tejidos, los folículos linfoides de los pacientes son el resultado de una neogénesis linfoide ⁵¹ y pertenecen al tejido linfoide asociado a bronquios. Este tejido recluta antígenos de las vías aéreas,

inicia respuestas inmunes locales, y mantiene células de memoria en los pulmones; también es aquí en donde ocurre el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas ⁵².

Con la información descrita previamente es posible deducir que los mediadores solubles son factores críticos en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en la EPOC, pues promueven el reclutamiento, la activación y la supervivencia de las células inflamatorias. En el **Cuadro 1** se muestra una breve descripción de los principales factores solubles involucrados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria presente en la EPOC.

Cuadro 1. Principales mediadores inflamatorios implicados en la EPOC

Mediador	Principales células productoras	Función
Citocinas inflamatorias		
TNF- α	Macrófagos y células epiteliales	Central en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria.
IL-1 β	Macrófagos y células epiteliales	Favorece la secreción de citocinas.
IFN- γ	T CD4+	Activa vías de proteólisis
IL-6	Células epiteliales	Interviene en la expansión de las células Th2 y Th17.
IL-17 a, IL-17 f	Th17	Participa en la liberación de quimiocinas de neutrófilos. Incrementa la expresión de genes relacionados con las mucinas.
Quimiocinas		
MCP-1 (CCL2)	Macrófagos y células epiteliales	Reclutamiento de monocitos circulantes a través de la barrera endotelial y epitelial.
MIP-1 α (CCL3)	Macrófagos y células epiteliales	Reclutamiento de monocitos circulantes a través de la barrera endotelial y epitelial.
IL-8	Macrófagos y células epiteliales	Quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos.
LTB ₄	Leucocitos	Quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos.
IP-10 (CXCL10)	Macrófagos y células epiteliales	Quimiotaxis de varios tipos de células.
Factores de crecimiento		
GM-CSF	Macrófagos	Supervivencia de macrófagos y neutrófilos.
TGF- β	Células epiteliales, T reg	Proliferación de fibroblastos. Secreción de colágeno. Inhibe la secreción de citocinas.
EGF	Células epiteliales	Secreción de moco.

Modificado de: *Arch Bronconeumol.* 2010;46(Supl 11): 2-7.

La inflamación pulmonar mediada por las células T, persiste incluso después de dejar de fumar o exponerse al humo de biomasa; lo anterior pone de manifiesto el papel crítico de estas células en la inmunopatogénesis de la

EPOC. Cosío y col.³¹ han propuesto un mecanismo de 3 pasos para el desarrollo de la EPOC (**figura 2**). El primer paso consiste en la respuesta inicial al estímulo externo que es orquestada por los componentes de la respuesta inmune innata. Las moléculas nocivas inhaladas pueden ser directamente reconocidas por receptores de reconocimiento de patrón (PRR, las siglas en inglés de *pattern-recognition receptor*), que al ser activados estimularán la translocación del factor NF- κ B al núcleo, de tal manera que se expresan varios mediadores inflamatorios. Además de las señales producidas por la presencia de factores ambientales nocivos, las infecciones recurrentes, la exposición a partículas ambientales, el trauma tisular, el estrés oxidativo, la muerte celular, la modificación de la estructura de las proteínas, el daño mitocondrial, y la liberación de DNA de las células apoptóticas pueden promover la captura y reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño celular (DAMP, las siglas en inglés de *damage-associated molecular patterns*) y autoantígenos. Las células de la inmunidad adaptativa son capaces de reconocer éstos como antígenos extraños y montar una respuesta en su contra. Este tipo de mecanismos han sido identificados en varias enfermedades autoinmunes.

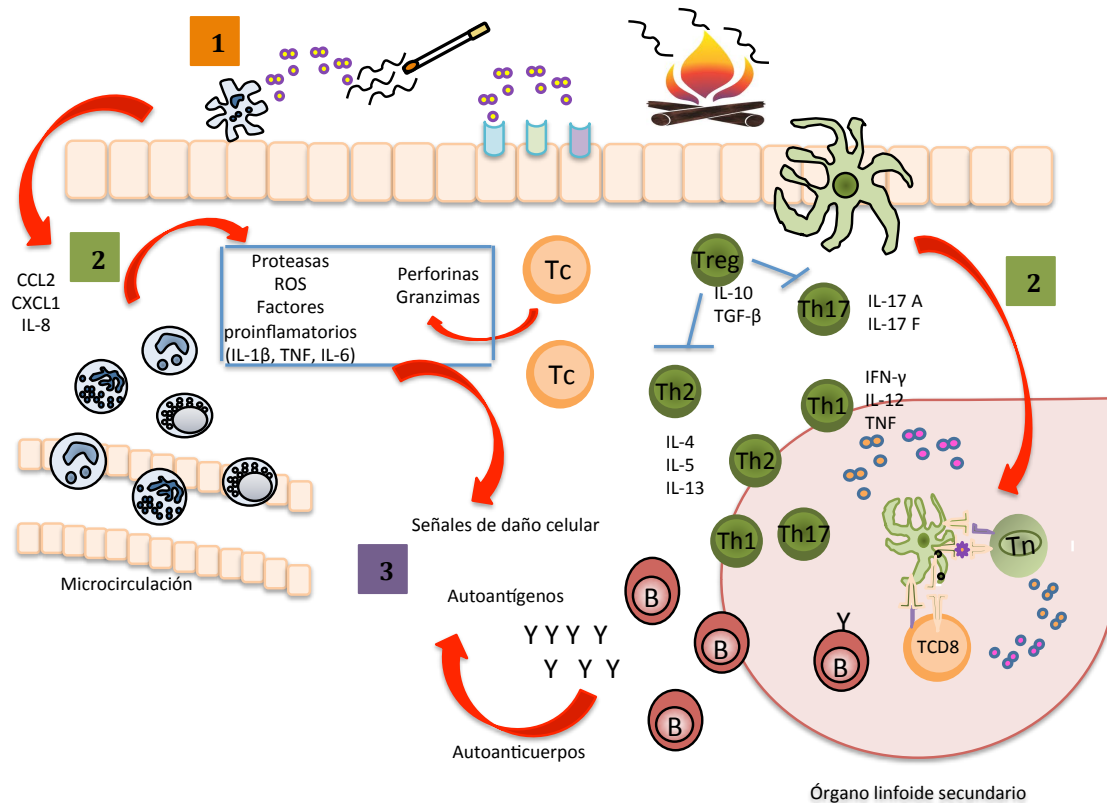


Figura 2. Mecanismos inflamatorios que conducen al desarrollo de la EPOC. Paso 1: las partículas nocivas presentes en el humo de cigarro o biomasa ingresan a las células por difusión o se unen a los PRR, activando una respuesta de la inmunidad innata. Paso 2: la respuesta inicial producirá señales de daño celular y autoantígenos que pueden ser reconocidos por células como las dendríticas; éstas al migrar a los órganos linfoides secundarios tienen la capacidad de promover la diferenciación y proliferación de los linfocitos T vírgenes. En función de la composición del microambiente, será el tipo de respuesta que predomine. La falla de los mecanismos de tolerancia puede conducir a la progresión de la enfermedad. Paso 3: la presencia de autoantígenos favorece la secreción de autoanticuerpos de las células B, un mecanismo que retroalimenta de manera positiva la cascada inflamatoria, y que describe una evidencia indirecta del componente autoinmune de la EPOC. Modificado de *N Engl J Med.* 2009; 360: 2445-2454.

En la segunda etapa, las CD maduras alertan a los linfocitos sobre la presencia de patógenos o señales de daño tisular. Estas CD tienen alta expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II, las siglas en inglés de *major histocompatibility complex class II*), así como de moléculas de coestimulación (CD80 y CD86), las cuales permiten que la presentación antigénica a linfocitos vírgenes resulte en la diferenciación y proliferación de los mismos. Una vez que las células T fueron activadas, ingresan al tejido pulmonar gracias a la atracción inducida por la unión de algunas quimiocinas con sus receptores expresados en estas células, por ejemplo, CXCR3, CCR5 y CXCR6. En esta etapa de la respuesta inflamatoria, la progresión y gravedad de la EPOC dependerá de la capacidad de las CD de estimular a los linfocitos T, así como de la eficiencia de los mecanismos inmunorreguladores.

En la tercera etapa, ante la deficiencia de los mecanismos de tolerancia periférica (ignorancia, eliminación, inhibición, regulación), la inflamación será orquestada por la inmunidad adaptativa, en la cual participan linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como células plasmáticas secretoras de IgG. Estas células activan a las del sistema inmune innato que producen especies oxidantes y proteasas que, junto con la acción citolítica de las células T CD8⁺, conducen a mecanismos de necrosis y apoptosis celular; activación del complemento; daño y remodelación celular; enfisema, y liberación de material antigénico, que perpetúan la respuesta inflamatoria. En esta etapa se aprecian características de un proceso autoinmune, el cual produce una mayor gravedad de la enfermedad.

3.4.2 La inflamación sistémica en la EPOC

Se piensa que muchos de los efectos extrapulmonares de la EPOC están mediados por la inflamación sistémica. La inflamación local de las vías aéreas y el parénquima pulmonar han sido reconocidos como características de la patogenia de la EPOC; sin embargo, cada vez es más evidente que la respuesta inflamatoria es sistémica ⁵³.

Algunos estudios han demostrado el aumento de las citocinas proinflamatorias, no sólo en el pulmón, sino también a nivel sistémico, por ejemplo, el TNF ⁵⁴, la IL-6, la IL-8 ⁵⁵ y la PCR ⁵⁶. Asimismo, múltiples grupos de trabajo han sugerido que la presencia de inflamación sistémica en la EPOC favorece la aparición de múltiples complicaciones como la pérdida de peso, la depresión, la osteoporosis, la disfunción del músculo esquelético, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes ⁵⁷⁻⁷².

En esta sección se revisarán los orígenes y la patogenia de la inflamación sistémica en la EPOC (**figura 3**).

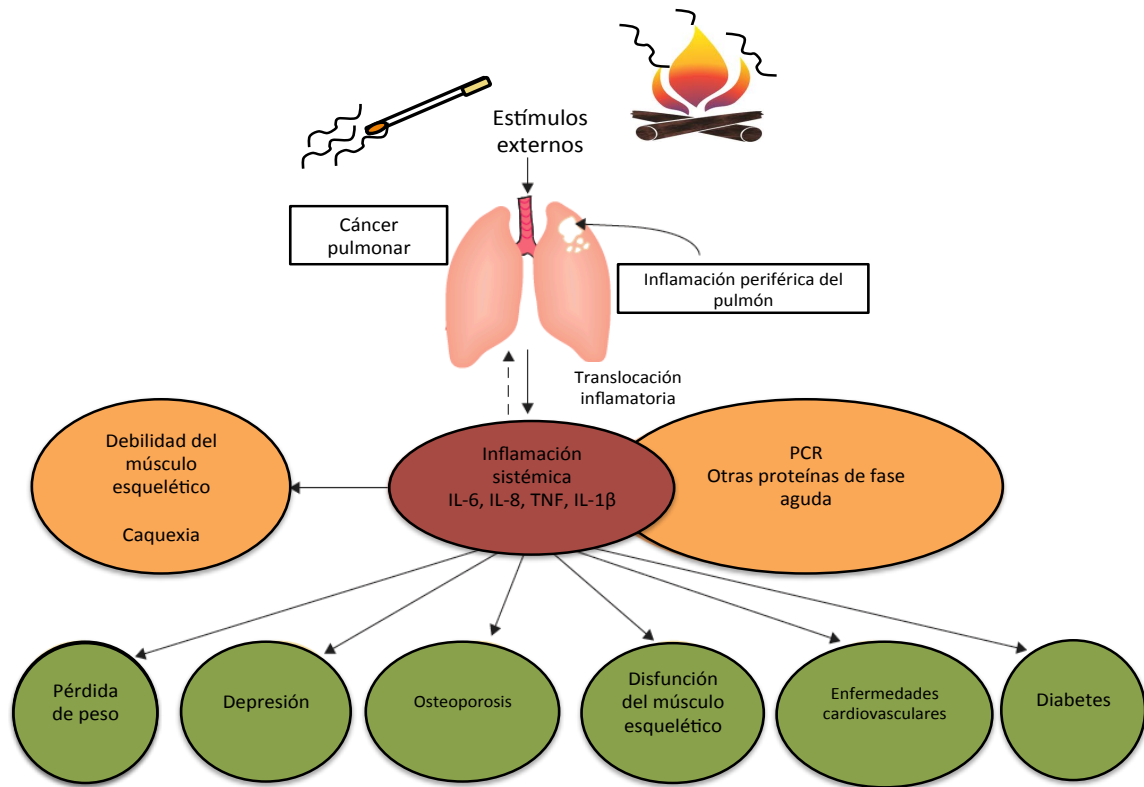


Figura 3. Efectos sistémicos y comorbilidades de la EPOC. Modificado de: *Eur Respir J* 2009; 33: 1165–1185.

3.4.2.1 Origen de la inflamación sistémica en la EPOC

Existen múltiples teorías que intentan explicar los mecanismos que conducen a la inflamación sistémica asociada a la EPOC. No hay consenso sobre qué teoría es correcta, pero es probable que varios mecanismos contribuyan. Uno de los mecanismos propuestos sugiere que el proceso inflamatorio se origina en las vías respiratorias y el parénquima pulmonar, y posteriormente se transloca a la circulación sistémica⁵⁷. En ese sentido, se piensa que la inflamación sistémica debería correlacionar directamente con inflamación pulmonar, no obstante, esto no ha sido demostrado. Kido y col.⁷⁴ llevaron a cabo un estudio diseñado para determinar si el pulmón es una fuente importante

de mediadores inflamatorios sistémicos, para el cual utilizaron IL-6 como marcador sustituto y materia particulada (PM, por las siglas en inglés de *particulate matter*) respirable (diámetro <10 µm, PM₁₀) como estímulo externo. Los ratones evaluados fueron expuestos por vía intratraqueal a una sola instilación de PM₁₀ o solución salina; 4 ó 24 horas después de la exposición, se recolectaron muestras de sangre arterial o venosa. Las concentraciones de IL-6 fueron medidas en el LBA y el suero. Las concentraciones de la IL-6 en el LBA se incrementaron a las 4 y 24 horas después de la exposición a la PM₁₀. A nivel basal, las concentraciones de la IL-6 en sangre venosa fueron más altas que los de la sangre arterial. La exposición a la PM₁₀ revirtió este gradiente arterio-venoso 4 horas después de la exposición. Por otro lado se observó que en los ratones *knockout* para la IL-6, la instilación de la IL-6 recombinante aumentó la concentración de dicho marcador en la sangre periférica. Estos hallazgos sugieren que el pulmón es una fuente importante de mediadores inflamatorios sistémicos después de la exposición a la PM₁₀. Sin embargo, la translocación de los diferentes mediadores inflamatorios puede implicar diferentes cinéticas que afecten su capacidad para trasladarse a la circulación. Se necesitan más estudios para abordar aspectos relacionados con la fisiopatogenia de esta enfermedad.

Otro mecanismo propuesto es que la inflamación sistémica es causada por el humo del tabaco. Ésta es una teoría atractiva porque el humo de tabaco ha sido implicado como una causa de otras enfermedades inflamatorias sistémicas, tales como la aterosclerosis y la enfermedad de la arteria coronaria ⁷⁵. De hecho, en la exposición pasiva al humo, se ha observado aumento del estrés oxidativo

sistémico y disfunción endotelial vascular ⁷⁶. Sin embargo, varios estudios demuestran que los exfumadores presentan evidencia de inflamación persistente ⁷⁷. Esto implica que el consumo de tabaco puede iniciar la inflamación, mas no explica la inflamación sostenida característica en la EPOC.

Es posible que los cambios fisiopatológicos que se producen en los pulmones debidos a la EPOC, puedan conducir a la inflamación sistémica. Algunos de los procesos que han sido implicados incluyen a la hipoxia y la hiperinflación.

Se ha observado que en pacientes con EPOC leve que se someten a un reto hipóxico, hay un aumento en los niveles séricos de la IL-6 ⁷⁸. Por otro lado, existe una correlación entre la concentración sérica de TNF y el grado de hipoxemia de los pacientes con EPOC ⁷⁹. Asimismo, en los experimentos con animales, la hipoxia conduce a un aumento del TNF, MIP-1b, y la MCP-1 ⁸⁰. La hiperinflación es también un hallazgo común en la EPOC, ya que resulta de la obstrucción crónica de las vías aéreas. La hiperinflación puede conducir al incremento sistémico del TNF, la IL-8 ⁸¹, la IL-6 y la IL-1 β ⁸².

Se ha sugerido que el incremento en la inflamación sistémica en la EPOC se debe, al menos en parte, al proceso normal del envejecimiento. La EPOC es una enfermedad crónica, que progresa lentamente, y la mayoría de los pacientes que la padecen son de la tercera edad. El envejecimiento normal se ha asociado con un aumento moderado de la inflamación sistémica, incluyendo la producción de citocinas tales como la IL-6 y el TNF ⁸³. También hay un incremento en el óxido nítrico y ROS ⁸⁴.

Se ha sugerido que la EPOC puede desencadenar la producción de mediadores inflamatorios sistémicos en otras partes del cuerpo, tales como el músculo

esquelético y la médula ósea. Al comparar a controles sanos con pacientes con EPOC, éstos últimos presentan concentraciones mayores de marcadores de inflamación sistémica, por ejemplo el TNF ⁸⁵. Inicialmente se pensó que la fuente del TNF podría ser el músculo esquelético ⁸⁶. Sin embargo, en un estudio controlado se demostró que la concentración del TNF muscular en sujetos con EPOC, en realidad, era menor que la de los sujetos control ⁸⁷, estudio con el cual se descartó dicha hipótesis.

Otra posibilidad es que la médula ósea puede estar involucrada en la iniciación de la inflamación sistémica. Esta es una teoría atractiva debido a que la médula ósea es el sitio de producción de células inflamatorias. Fumar o la contaminación del aire pueden estimular indirectamente la médula ósea, lo que probablemente resulte en la liberación acelerada de las células maduras e inmaduras ⁸⁸⁻⁹⁰.

3.4.2.2 La fisiopatología de la inflamación sistémica

Una parte integral de la respuesta inflamatoria sistémica es la activación de la médula ósea, lo que resulta en la liberación de leucocitos en la circulación, incluyendo neutrófilos, monocitos/macrófagos, y linfocitos. Los pacientes con EPOC presentan varias anormalidades en estos leucocitos circulantes.

➤ Células circulantes

- **Neutrófilos.** En los pacientes con EPOC, los neutrófilos circulantes presentan mayor actividad quimiotáctica, capacidad para digerir tejido conectivo, y expresión de moléculas de adhesión de la superficie celular mayor comparado con los controles sanos ⁹¹. Se ha observado que el

número de neutrófilos circulantes correlaciona de manera negativa con el valor del VEF_1 ⁹².

Los neutrófilos de los pacientes con EPOC producen una mayor concentración de ROS que los fumadores con función pulmonar normal y los no fumadores sanos ⁹¹. El estrés oxidativo sistémico puede regular positivamente la expresión de moléculas de adhesión, facilitando el reclutamiento en el pulmón ⁹³.

- **Linfocitos.** Las características de los linfocitos circulantes en pacientes con EPOC han sido poco estudiadas, además de que los resultados obtenidos son discrepantes.

En un estudio se realizó una evaluación de los linfocitos de la sangre periférica de pacientes con EPOC con el propósito de determinar si las características de estas células podrían ser el reflejo de la obstrucción respiratoria del aire que define a esta enfermedad ⁹⁴. Se encontró que las células T circulantes de los pacientes con EPOC son activadas y producen citocinas proinflamatorias que tienen relevancia en la patogenia de esta enfermedad. Algunas mediciones de la funcionalidad de las células T efectoras muestran correlación negativa con la gravedad de la enfermedad y, al menos en algunos casos, parecen ser afectadas por el tabaquismo y el uso de glucocorticosteroides inhalados (ICS). Además estos resultados implican que los linfocitos que circulan podrían ser útiles para el estudio de la patogénesis de la enfermedad y/o posiblemente utilizados como biomarcadores en los ensayos de fase temprana de las nuevas terapias para la EPOC. Vargas-Rojas y col. encontraron predominio

de la población Th17 en la sangre periférica de sujetos con EPOC-TAB, y que la frecuencia de estas células correlaciona negativamente con el VEF₁⁴³.

- **Monocitos/macrófagos.** Los macrófagos juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria responsable de la fisiopatología de la EPOC.

Los monocitos de los pacientes con EPOC muestran una respuesta exagerada a la CXCL1 y la CXCL7, al compararse con la de fumadores sin EPOC y no fumadores sanos⁹⁵. Esta anomalía sugiere que probablemente existan anormalidades intrínsecas de los monocitos circulantes que promueven una mayor acumulación de macrófagos en los pulmones de los pacientes con EPOC. Por otro lado, los monocitos de sangre periférica de los pacientes con EPOC secretan mayor cantidad de MMP-9 tras ser expuestos a lipopolisacárido (LPS), al ser comparados con los de fumadores sin EPOC y no fumadores sanos⁹⁶. Los monocitos de los sujetos con EPOC poseen un potencial fagocítico similar al de los pertenecientes a sujetos fumadores sin EPOC y no fumadores sanos; sin embargo, cuando éstos se transforman en macrófagos, muestran deficiencias en la fagocitosis, consistente con la observada en los macrófagos alveolares (MA)⁹⁷.

➤ **Factores solubles**

- **IL-6.** Esta citocina se encuentra incrementada en el suero de los pacientes con EPOC, particularmente durante las exacerbaciones, y quizá esté relacionada con el aumento de las proteínas de fase aguda circulantes, tales como la PCR⁹⁸. Los efectos funcionales de la concentración

aumentada de la IL-6 no son claros, sin embargo, se han asociado con la atrofia del músculo esquelético ⁹⁹.

- **TNF.** El TNF plasmático y su receptor soluble se encuentran en concentraciones elevadas en los pacientes con EPOC ¹⁰⁰; éstas se han asociado a la caquexia, la atrofia del músculo esquelético y la debilidad de las personas que presentan la enfermedad. Se ha encontrado que el TNF es secretado por las células circulantes en los pacientes caquécicos con EPOC ¹⁰¹. Es probable que el TNF circulante esté relacionado, por lo menos parcialmente, con la hipoxemia ¹⁰².
- **IL-8.** Esta quimiocina se encuentra aumentada en la circulación de los pacientes con EPOC y se ha relacionado con la debilidad muscular ¹⁰³.
- **PCR.** En los pacientes con EPOC estable en un estadio de gravedad de moderado a grave, la alta concentración de PCR se ha relacionado con la mortalidad de los sujetos ¹⁰⁴. El incremento de esta proteína también ha sido relacionada con el estado de salud y la tolerancia al ejercicio, y es un buen predictor del índice de masa corporal (IMC). A pesar de que la PCR se ha asociado negativamente con el VEF₁, en estudios longitudinales se ha comprobado que lo anterior no es aplicable en el declive progresivo de dicho parámetro respiratorio ¹⁰⁵.
- **IL-1β.** Esta citocina se ha asociado con la caquexia. Diferentes concentraciones del antagonista del receptor para la IL-1 no se han encontrado en la EPOC. Sin embargo, se ha observado una asociación entre la EPOC y un polimorfismo en el gen que codifica para la IL-1β ¹⁰⁶.

3.5 Diagnóstico de la EPOC

Se ha estandarizado que a todo paciente mayor de 40 años con antecedentes de exposición a algún factor de riesgo de EPOC, con o sin síntomas respiratorios, se le debe solicitar una espirometría con broncodilatador para descartar o confirmar el diagnóstico de la EPOC ²³.

El grado de obstrucción espirométrica, sumado al impacto de la enfermedad, permiten definir la gravedad de la EPOC y el nivel de asistencia médica que se requiere.

Ningún síntoma o signo clínico es exclusivo de la EPOC; otras enfermedades se manifiestan con síntomas semejantes y limitación crónica al flujo aéreo, por ejemplo el asma, la tuberculosis, las bronquiectasias, la bronquiolitis y la obstrucción de la vía aérea alta. Algunas de ellas pueden coexistir al mismo tiempo que la EPOC, principalmente en los ancianos. La edad de inicio de los síntomas, intermitencia de la disnea, presencia de síntomas alérgicos, aumento progresivo en el volumen del esputo o los antecedentes personales y familiares de enfermedad respiratoria pueden ayudar a confirmar o descartar la sospecha diagnóstica. El diagnóstico diferencial con asma bronquial es muy importante, porque a pesar de sus similitudes, el pronóstico y el enfoque terapéutico son diferentes ²³.

3.5.1 Sospecha clínica: signos y síntomas

La EPOC se caracteriza con frecuencia por un periodo asintomático, por lo que pueden pasar varios años entre la aparición de la limitación al flujo aéreo y el desarrollo de las manifestaciones clínicas. Por esta razón, el médico debe

buscar sistemáticamente la presencia de síntomas que puedan pasar inadvertidos para el paciente, ser atribuidos a la edad, al sedentarismo y particularmente al hecho de fumar.

La disnea, la tos y la hipersecreción de esputo son los síntomas característicos de la EPOC. La disnea es el motivo de consulta más frecuente, y generalmente se asocia con el diagnóstico tardío de la enfermedad. Por otro lado, es frecuente que los pacientes con disnea grave y persistente tengan mayor grado de obstrucción y peor pronóstico. Ante la progresión de la disnea, los pacientes adoptan un estilo de vida sedentario que progresivamente se asocia con disfunción de los músculos periféricos. En el caso de la disnea progresiva en los adultos jóvenes con historia familiar de EPOC, ésta puede sugerir la deficiencia congénita de la α 1–antitripsina ¹⁹.

La percepción de la disnea tiene variaciones de un sujeto a otro, por lo que se ha estandarizado su medición con escalas indirectas como la escala modificada del Medical Research Council (mMRC) ¹⁰⁷ (**Cuadro 2**).

La tos crónica es frecuentemente productiva con expectoración. A medida que la enfermedad progresa, la intensidad de la tos y la expectoración aumentan.

Otros síntomas como la anorexia y la pérdida de peso son más frecuentes en la enfermedad avanzada y se asocian a un peor pronóstico ⁵⁹.

El examen físico puede ser normal en las fases iniciales de la enfermedad. La presencia e intensidad de los signos clínicos (cianosis, respiración con labios fruncidos, uso de músculos accesorios, tiempo espiratorio prolongado, tórax en tonel y limitación para la expansibilidad del tórax) se asocian generalmente con mayor obstrucción e hiperinflación pulmonar, y con la presencia de compromiso

del ventrículo derecho por hipertensión pulmonar. No siempre la intensidad de los signos clínicos se asocia con mayor gravedad de la enfermedad ²³.

Cuadro 2. ESCALA DE DISNEA mMRC	
Grado	Características
0	Ahogo o falta de aire ante actividad física o ejercicio intenso.
1	Ahogo o falta de aire al caminar rápido en lo plano o al subir una escalera o una pendiente suave.
2	Ahogo o falta de aire que le hace caminar en lo plano más despacio que otra persona de la misma edad o debe detenerse por disnea al caminar a su propio paso en lo plano.
3	Ahogo o falta de aire que obliga a detenerse al caminar una cuadra (100m) o después de unos minutos en lo plano.
4	Ahogo o falta de aire al bañarse o vestirse que no le permite salir de casa.

3.5.2 Diagnóstico y estudio del paciente

A partir de la sospecha de EPOC, la evaluación clínica y funcional del paciente deberá incluir ²³:

- a) Historia clínica detallada que incluya factores de riesgo, presencia o ausencia de los síntomas cardinales (disnea, tos, expectoración) y de los signos clínicos descritos.
- b) Medición del índice de masa corporal ($IMC = \text{peso [kg]} / \text{talla [m]}^2$), teniendo en cuenta que los valores menores a 20 kg/m^2 se asocian con mal pronóstico en la EPOC.
- c) Evaluación de la frecuencia e impacto de las exacerbaciones y

hospitalizaciones en el año anterior, así como la coexistencia de comorbilidades.

d) Determinación de la gravedad de la disnea con la escala mMRC (**cuadro 1**).

e) Oximetría de pulso en reposo, que mide la saturación de oxígeno de la hemoglobina sanguínea (SaO_2), y la frecuencia cardíaca (FC); asimismo, evaluar el efecto de la administración de oxígeno.

f) Espirometría pre y posterior al uso de un broncodilatador (400 μ g de salbutamol o equivalente). La evaluación espirométrica realizada a todo sujeto con sospecha de tener la EPOC permite descartar o confirmar el diagnóstico, y ayuda a definir el grado de la obstrucción. El diagnóstico se confirma con la presencia de la limitación del flujo aéreo, que se caracteriza por una relación VEF_1/CVF menor del 70% del predicho (ajustado a la edad, IMC, sexo y grupo étnico) después de la administración de un broncodilatador inhalado, generalmente un β_2 -adrenérgico.

El VEF_1 , expresado como porcentaje del valor esperado, es la variable espirométrica que define la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo en la EPOC. El **cuadro 3** muestra los criterios para estratificar la gravedad de la obstrucción espirométrica.

En algunos pacientes con EPOC se puede observar aumento de la CVF y el VEF_1 después de la inhalación de broncodilatadores. Se considera un cambio significativo cuando la CVF y/o el VEF_1 aumentan 12% y más de 200 mL ¹⁰⁸.

Una espirometría con una relación basal $VEF_1/CVF < 70\%$ pre-broncodilatador, pero $\geq 70\%$ después del broncodilatador, sugiere una obstrucción reversible, y la posibilidad de asma en presencia de un cuadro clínico compatible.

Cuadro 3. CLASIFICACIÓN DE LA GRAVEDAD FUNCIONAL DE LA EPOC SEGÚN EL VEF₁	
Gravedad	VEF ₁ post broncodilatador (% del valor predicho)*
Leve	VEF ₁ ≥ 80%
Moderada	Ahogo o falta de aire al caminar rápido en lo plano o al subir una escalera o una pendiente suave.
Grave	Ahogo o falta de aire que le hace caminar en lo plano más despacio que otra persona de la misma edad o debe detenerse por disnea al caminar a su propio paso en lo plano.
Muy grave	Ahogo o falta de aire que obliga a detenerse al caminar una cuadra (100m) o después de unos minutos en lo plano.

En cualquier grado se asume que la relación VEF₁ /CVF es < 70%.

Al confirmar el diagnóstico de la EPOC, se sugiere, de forma individualizada, complementar la evaluación a partir de la realización de estudios adicionales, que además son útiles en el seguimiento del paciente:

- Caminata de 6 minutos (C6M). Es la expresión de la distancia recorrida (en metros) en ese periodo, reflejando la capacidad funcional del paciente ¹⁰⁹⁻¹¹¹.
- Índice BODE. Se trata de un índice multidimensional, BODE (acrónimo que incluye las iniciales B= índice de masa corporal [IMC], O= obstrucción al flujo aéreo medido como el porcentaje del VEF₁ esperado, D= disnea en la escala mMRC y E= esfuerzo con los metros recorridos en la C6M). Es un indicador que se desarrolló en respuesta al interés de encontrar un modelo para predecir

con mayor certeza la mortalidad en la EPOC. En una escala de 1 a 10 se puede predecir la probabilidad de sobrevida del paciente ¹¹².

4. La EPOC asociada a la exposición al humo de biomasa (EPOC-BM)

4.1 La exposición al humo de biomasa

La exposición al humo de biomasa continúa siendo uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades respiratorias. Una proporción importante de la población mundial emplea biomasa para cocinar o calentar sus hogares; en su mayoría son de un estrato económico bajo y viven en países económicamente emergentes ¹¹³. El humo producido en la combustión de la biomasa suele permanecer en espacios interiores, y está compuesto por diversos contaminantes nocivos para la salud, tales como partículas finas que penetran profundamente en el tracto respiratorio y los pulmones ^{114,115}. En viviendas mal ventiladas, el humo produce concentraciones de partículas pequeñas 100 veces mayores a las permitidas por los organismos internacionales ¹¹³.



Cocina rural con estufa de leña. Zinacantán, Chiapas.

Anualmente ocurren alrededor de 3.8 millones de muertes prematuras por enfermedades relacionadas con la contaminación intradomiciliaria del aire debido al uso de combustibles sólidos; aproximadamente el 44% de éstas son por neumonía, el 54% por la EPOC y el 2% por cáncer pulmonar ¹¹³.

Los contaminantes presentes en el humo doméstico tienen la capacidad de activar a las células efectoras, e inducir la secreción de mediadores inflamatorios, generando una respuesta inflamatoria local y sistémica ^{113, 116, 117}.

4.2 La exposición al humo de biomasa en los países emergentes

En las zonas rurales de los países emergentes se ha calculado que la proporción del tiempo que permanecen las mujeres en espacios interiores es aproximadamente del 75% ^{118, 119}. Es frecuente que la población rural se exponga a una alta concentración de contaminantes que se originan en las diversas actividades cotidianas. Las fuentes de donde provienen dichos contaminantes se pueden clasificar en las siguientes categorías: humo de biomasa o cigarro, contaminantes biológicos (insectos, microorganismos y sus derivados), compuestos orgánicos volátiles, radón y asbesto. Los contaminantes surgen de los procesos de combustión empleados para cocinar y calentar la casa, de actividades humanas como fumar, la presencia de agentes biológicos, y de la emisión de materiales de construcción y mobiliario ¹¹⁹. Este trabajo se centrará en la exposición al humo de biomasa.

En la actualidad, la quema de biomasa constituye una importante fuente de exposición a diversos agentes nocivos. El porcentaje de la población que la utiliza varía dependiendo de la región: el 77% en África subsahariana, el 74%

en el sureste asiático, el 36% en Europa del este, y el 16% en Latinoamérica, el Caribe y Europa central ¹²⁰. Esto evidencia la asociación entre el uso de biomasa y el desarrollo socioeconómico de los países, y resulta alarmante que debido a la reciente crisis económica, se cree que el uso de combustibles sólidos continuará a lo largo de las décadas.

4.3 Componentes del humo de biomasa y sus efectos en la salud

La leña (el tipo de biomasa más utilizado para combustión) está compuesta en gran proporción por dos tipos de polímeros: celulosa (50-70% del peso) y lignina (aproximadamente 30% del peso) ¹²¹. Otros combustibles orgánicos también contienen estos polímeros, sin embargo las proporciones en las que se encuentran son variables. Adicionalmente, la leña posee trazas de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (resinas, ceras y azúcares) ¹²², así como sales inorgánicas. Es común observar que los combustibles sólidos son consumidos de forma incompleta en fuegos abiertos, con una alta emisión de sustancias, lo que resulta en concentraciones muy elevadas de contaminantes. El humo de biomasa es una mezcla de más de 200 compuestos químicos: gases, partículas finas y ultrafinas respirables que son de distinto diámetro, de tipo orgánico o inorgánico. La PM presente en este humo, posee cantidades importantes de PM₁₀ y otras partículas de menor tamaño (PM_{2.5}) que son capaces de ingresar a sitios muy estrechos del pulmón. Varios de los contaminantes presentes en el humo de biomasa son típicos de cualquier combustión, por ejemplo el monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, dióxido de azufre e hidrocarburos aromáticos policíclicos (**cuadro 4**). Estos

compuestos actúan como contaminantes primarios, irritantes y carcinógenos o cocarcinógenos ¹²⁰. Adicionalmente, el humo de biomasa está enriquecido con diversos contaminantes del aire, por ejemplo potasio, metoxifenoles, levoglucosano, reteno y ciertos ácidos de resinas ¹²⁰.

Actualmente se cuenta con pocos estudios controlados que evalúen los efectos en la salud provocados por la exposición controlada al humo de biomasa. En un trabajo realizado en los Estados Unidos, 13 sujetos fueron expuestos a concentraciones “reales” de humo de leña (200–300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$) durante dos sesiones de 4 horas de duración cada una (con una semana de espacio entre una y otra) ¹²³. Los resultados indicaron que la exposición aguda al humo de leña se relaciona con cambios en los niveles de mediadores inflamatorios y factores de la coagulación presentes en el suero de los sujetos. Otro efecto observado en 9 de los 13 sujetos fue el incremento de la peroxidación de los lípidos mediada por radicales libres. Este estudio pone de manifiesto la asociación entre el humo de leña y los efectos inflamatorios sistémicos en el organismo.

La mayor parte de la información sobre los efectos del humo de biomasa en la salud humana se ha obtenido de estudios epidemiológicos y metaanálisis. A pesar de sus limitaciones, éstos abarcan un amplio gradiente de efectos, que van desde el aumento de los síntomas respiratorios y la disminución de la función pulmonar, hasta mayor frecuencia en hospitalizaciones. La variabilidad entre los resultados registrados se debe, en gran medida, a la concentración y al tiempo de exposición de los individuos en los distintos estudios.

Cuadro 4. Compuestos tóxicos presentes en el humo de biomasa y sus efectos en la salud humana

Compuesto	Ejemplo	Fuente ^a	Límite permitido (directrices) por la OMS (mg/m ³) ^c	Contaminación intradomiciliaria promedio en espacios en donde se utiliza la biomasa como combustible (mg/m ³) ^b	Efectos tóxicos ^a
Gases inorgánicos					
	CO	Combustión incompleta.	10(8h)	6.6-15.3 (24 h)	-Asfixiante. -Mayor número de exacerbaciones de asma. -Disminuye la capacidad de hacer ejercicio.
	NO ₂	Oxidación a altas temperatura del nitrógeno del aire. Nitrógeno presente en el combustible.	0.2 (1h)	97 (24 h)	-Irritante. -Mayor número de exacerbaciones de asma. -Sibilancias. -Aumenta las infecciones respiratorias.
Hidrocarburos					
	Saturados, insaturados, HAP	Combustión incompleta.	NR	HAP: 3.7 (45-60 min cocinando)	-Irritantes, carcinogénicos, mutagénicos.
Compuestos orgánicos oxigenados					
	Aldehídos, alcoholes, fenoles, quinonas	Combustión incompleta.	Formaldehído: 0.1 (30 min)	0.2-5.0 (24 h)	- Irritantes, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. -Aumentan el estrés oxidativo.
Materia particulada					
	Partículas inhalables (PM ₁₀)	Condensación de los gases de combustión, combustión incompleta.	0.5(24 h)	8.2 (45-60 min cocinando)	-Interferencia en los mecanismos de defensa pulmonar, fagocitosis y depuración mucociliar. -Síndrome bronquial obstructivo.
	Partículas respirables (PM _{2.5})	Condensación de los gases de combustión, combustión incompleta.	0.25(24 h)	8.2 (45-60 min cocinando)	-Interferencia con los mecanismos de defensa pulmonar, fagocitosis y depuración mucociliar. -Síndrome bronquial obstructivo.

^a Naeher et al. Inhalation Toxicology, 19:67–106, 2007; ^b WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000; ^c WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants. World Health Organization, 2010.

En el caso particular de los estudios realizados en los países en desarrollo, se ha encontrado que una proporción importante de las familias cocinan diariamente con estufas ubicadas en espacios sin ventilación, es decir, que las

emisiones permanecen dentro de la vivienda. El tiempo de preparación de los alimentos va desde 30 min hasta 3 horas (por cada comida), y en esta actividad tienen mayor participación las mujeres y los niños que las acompañan ¹¹⁹.

En el 2002 la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó al humo de biomasa dentro de la lista de los 26 factores de riesgo que aparecen en la evaluación comparativa de riesgos (CRA, las siglas en inglés de *Comparative Risk Assessment*) ¹¹⁴. La inclusión del humo de biomasa a esta lista se justifica por los efectos adversos que éste puede producir, los cuales han sido englobados en 3 categorías ^{124, 125}: la EPOC, las infecciones agudas del tracto respiratorio bajo (ALRI, las siglas en inglés de *acute low respiratory infections*) y el cáncer pulmonar. Cerca del 50% de las muertes por las ALRI en niños menores de 5 años ocurren como resultado de la inhalación de PM proveniente de la contaminación intradomiciliaria. Las mujeres expuestas al humo de biomasa tienen un riesgo 3 veces mayor de padecer EPOC que las no expuestas, en tanto, que en los hombres (quienes presentan un mayor riesgo relativo para desarrollar EPOC que las mujeres) el riesgo se duplica. Por otro lado, alrededor del 1.5% de las muertes por cáncer pulmonar son atribuibles a la exposición a carcinógenos provenientes de los contaminantes intradomiciliarios ¹¹³.

En general, la PM y otros contaminantes presentes en el humo de biomasa provocan la inflamación de las vías aéreas y los pulmones, afectando la respuesta inmune y reduciendo la oxigenación. También se ha evidenciado la relación entre la exposición al humo de biomasa y el bajo peso al nacer, la tuberculosis, la isquemia cardiaca y el cáncer nasofaríngeo ¹¹³.

4.4 La respuesta inflamatoria de las vías aéreas y los pulmones asociada a la exposición al humo de biomasa

Los estudios en los que se evalúa la respuesta inflamatoria que desencadena el humo de biomasa se iniciaron en la década de los 80. En 1982, Thorning y col.¹²⁶ describieron los efectos de la inhalación del humo de leña en las células pulmonares de conejos. Los animales eran colocados de 25 a 45 minutos dentro de una cámara y se les exponía al humo de leña con concentraciones de 285 a 1707 ppm de aldehídos. Los conejos expuestos mostraban daño del epitelio traqueobronquial después de 24 horas de exposición. Estos resultados sugerían que la exposición aguda al humo de leña tiene efectos similares a los observados con el humo de tabaco, y se concluyó que los aldehídos son los compuestos que principalmente producen las lesiones. En otro modelo practicado en conejos, se encontró que el humo de leña disminuía la actividad mucociliar de los sujetos expuestos¹²⁷. Por otro lado, se reportaron alteraciones en los MA de los conejos expuestos al humo de leña, similares a las observadas en fumadores crónicos; entre otras cosas, mostraban menor expresión de ciertos marcadores de activación¹²⁸.

En un estudio en el que se exponía a ratones a dosis altas de humo de leña¹²⁹, se observaron alteraciones histológicas pulmonares, así como una respuesta inflamatoria incrementada con mayor concentración de citocinas y células. Estos cambios son consistentes con las alteraciones observadas en la patología pulmonar. Con este estudio se concluyó que la PM del humo de biomasa es la responsable de la mayor parte de las enfermedades pulmonares asociadas a la exposición.

En los estudios relacionados con el humo de biomasa, se ha dado un particular seguimiento a los efectos provocados por la PM. La exposición a la PM estimula la respuesta de los MA y los monocitos en el pulmón. Los MA expuestos *ex vivo* a partículas ambientales secretan una amplia variedad de factores proinflamatorios como el TNF, el GM-CSF, la IL-6, la IL-8 y la IL-1 β , y esta respuesta es dependiente de la dosis de exposición ¹³⁰.

Cabe destacar que la exposición al humo de biomasa compromete la capacidad fagocítica de los MA, por lo que la respuesta a agentes infecciosos se hace deficiente ¹³¹. En este sentido, es preciso reconocer que un PRR importante en la detección de la PM, es el receptor de tipo “scavenger” de clase A (SR-A, por las siglas en inglés de *Scavenger Receptor-A*), que tiene la capacidad de identificar un componente inorgánico de la PM ¹³². El SR-A se expresa principalmente en los macrófagos, y desempeña un papel importante en la fagocitosis de las partículas ambientales. La activación del SR-A provoca la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias, y previene la infiltración de células mononucleares al tejido pulmonar. No se conocen con claridad los mecanismos mediante los cuales el SR-A atenúa la respuesta inflamatoria; sin embargo, se han propuesto dos hipótesis. La primera establece que el SR-A reduce la respuesta inflamatoria debido a la interacción directa de la PM con el dominio TRAF-C del receptor 6 asociado a TNF (TRAF6), que produce el bloqueo de la dimerización y ubiquitinación de TRAF6 ¹³³. La segunda establece que, debido a que el SR-A es un receptor de tipo “scavenger”, al eliminar a los patógenos por internalización se minimizan las lesiones provocadas por una respuesta inflamatoria exacerbada tras el

contacto prolongado del antígeno con los MA y las células epiteliales pulmonares.

Las moléculas que permiten la sinapsis inmunológica influyen en el desarrollo de una respuesta inflamatoria por parte de la inmunidad adaptativa. En ese sentido, se ha reportado el aumento moderado de la expresión de las moléculas del MHC II en MA de sujetos sanos expuestos a la PM ¹³⁴. La PM estimula la maduración de las células presentadoras de antígeno en términos de la expresión de las moléculas de coestimulación. Algunos grupos de investigación han demostrado que la expresión de las moléculas CD80/86 y CD40-L incrementa tras la exposición a la PM ¹³⁵. La mayor parte de las evidencias que sustentan esta idea provienen de estudios con células dendríticas (CD). Por ejemplo, los progenitores de CD de sangre periférica se incubaron con PM a una concentración de 100 µg/mL por 48 h, y posteriormente se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD80/86 y CD40L. La expresión de estas moléculas aumentó al compararse con CD sin estímulo, y el nivel de expresión resultó ser muy similar al de las CD incubadas con LPS ¹³⁶. Esto sugiere que la expresión incrementada de estas moléculas de coestimulación es a través de una vía que regula la expresión del MHC II.

Se piensa que la activación del NF-κB inducida por PM es dependiente de la dosis ¹³⁷. En consecuencia, la sobreexpresión del MHC II y/o las moléculas de coestimulación podría ser dependiente de la dosis de exposición.

Se ha demostrado que los sujetos asmáticos o atópicos son más vulnerables a los daños provocados por la inhalación del humo de biomasa ¹³⁸. En el trabajo realizado por Barret y col. ¹³⁹ se examinó la capacidad que tiene la exposición

repetida al humo de leña de exacerbar las respuestas alérgicas en ratones sensibilizados. Se encontró que en ausencia de inflamación tisular, la exposición durante 3 días al humo de leña puede incrementar la respuesta inflamatoria de las vías aéreas: mayor número de eosinófilos y aumento en la concentración de IgE en lavado LBA.

El potencial proinflamatorio de la PM presente en el humo de biomasa depende de las características físicas y químicas de las partículas presentes, que a su vez, están en función de la fuente de emisión. Para demostrar dicha hipótesis, Bolling y col.¹⁴⁰ observaron las partículas de las diferentes fases de la combustión, y encontraron que todas inducen una producción similar de ciertos mediadores proinflamatorios, citotoxicidad y proliferación celular; sin embargo, las partículas procedentes de la combustión con temperatura media mostraron mayor citotoxicidad que las presentes en la combustión con temperatura elevada. Por otro lado, se encontró que la fracción orgánica es la que principalmente estimula los efectos tóxicos del humo de leña. Si bien este estudio no demuestra los mecanismos que conducen al desarrollo de la EPOC, los resultados sugieren que las condiciones de la combustión de la biomasa son factores críticos en la aparición de determinados efectos nocivos. Más adelante es importante evaluar si dichas condiciones conducen a características clínicas e inflamatorias distintas entre los pacientes con EPOC-BM.

El grupo de Mehra y col.¹⁴¹ realizó una comparación entre los mecanismos biológicos de daño pulmonar inducidos por el humo de biomasa y cigarro. En este trabajo, se cultivaron células epiteliales humanas de la vía aérea pequeña

(SAEC, las siglas en inglés de *small airway epithelial cells*) con los extractos de ambos humos; asimismo, ratones C57/Bl6 fueron expuestos directamente al humo de biomasa y cigarro, y posteriormente se cuantificó la expresión de ciertas proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK, por las siglas en inglés de *mitogen-activated protein kinases*), quimiocinas y proteasas que se han asociado con el desarrollo de la EPOC. Se demostró que la exposición *in vitro* a ambos humos activa a las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, por las siglas en inglés de *extracelular signal-regulated kinases*) y, en consecuencia, hay un incremento de la IL-8 y la MMP-1 en las SAEC. En contraste con el humo de cigarro, el de biomasa también activa a p38 y a las cinasas c-Jun N-terminal (JNK, por las siglas en inglés de *c-Jun N-terminal kinases*), e inhibe la expresión del inhibidor tisular de la MMP-1 (TIMP-1, por las siglas en inglés de *tissue inhibitor of MMP-1*). De forma similar, en los pulmones de los ratones, tanto el humo de biomasa como el de cigarro producen un incremento en el número de macrófagos, activan a ERK y p38, y aumentan la expresión de las MMP 9 y 12. A diferencia de los ratones expuestos al humo de cigarro, los de biomasa presentaron mayor inflamación perivascular, y concentración de G-CSF y GM-CSF en el LBA. Este trabajo es el primero en demostrar que el humo de biomasa y cigarro producen sutiles diferencias en los mecanismos inflamatorios en ratones. En el futuro, este modelo puede ser extrapolado a cultivos de células humanas.

A pesar de los múltiples avances, aún se cuenta con poca información acerca de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición al humo de biomasa. La principal limitación que presentan los estudios realizados en humanos es la

variabilidad entre los resultados registrados, que en gran medida, se debe a la concentración y al tiempo de exposición de cada individuo, el tipo de estufa utilizado, y la fase de la combustión.

4.5 La EPOC asociada a la exposición al humo de biomasa

En el estudio de la Carga Mundial de la Enfermedad del 2010 se reportó que 1.1 millones de las muertes asociadas a la EPOC eran atribuibles al consumo de tabaco, y 850 000 a la contaminación intradomiciliaria ¹⁴². Se ha calculado que la exposición al humo de biomasa incrementa de 2 a 3 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad ¹⁴³. Por otro lado, se ha estimado que el aumento de $7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de la PM en el ambiente (a lo largo de 5 años) se asocia con disminución más rápida de la función pulmonar, y un OR de 1.33 para el desarrollo de la EPOC ¹³⁰.

Al comparar la EPOC-TAB con la EPOC-BM, se distinguen diferencias en la patogénesis, que conducen a las distintas características clínicas, respuesta al tratamiento y pronóstico de la enfermedad ¹⁴⁴. A pesar de que la información es escasa, recientemente se han descrito las características principales de las personas con EPOC-BM, que permiten establecer una comparación con los sujetos con EPOC-TAB, a través de la cual se han identificado dos fenotipos clínicos de la enfermedad (**cuadro 5**).

Cuadro 5. Características de los pacientes con EPOC secundaria al tabaquismo y EPOC asociada a la exposición al humo de biomasa

Característica	EPOC-TAB	EPOC-BM	Referencia
Mujeres (%)	24	84	Ramírez-Venegas et al. <i>Am J Respir Crit Care Med.</i> 2006. 15;173(4):393-7.
VEF ₁ (% del predicho)	46±21	55±21	Ramírez-Venegas et al. <i>Am J Respir Crit Care Med.</i> 2006. 15;173(4):393-7.
Hipertensión pulmonar (% de pacientes que la presentan)	27.7	52.2	González-García et al. <i>Arch Bronconeumol.</i> 2004; 40(2):54-61.
Hiperreactividad bronquial	Leve	Leve-moderada	González-García et al. <i>Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.</i> 2012; 7: 367-73.
Enfisema (puntuación por TC)	2.33 ±1.53	0.67± 0.80	Camp et al. <i>Eur Respir J.</i> 2014; 43(3):725-34.

VEF₁= Volumen Espiratorio Forzado al primer segundo. TC= Tomografía Computarizada.

En el caso de los sujetos con EPOC-BM, la exposición suele iniciarse en la etapa prenatal y en la infancia ¹⁴⁵, lo que probablemente impacte en el desarrollo de los pulmones, y los haga susceptibles de contraer infecciones respiratorias; en consecuencia, incrementa el riesgo de daño de la vía aérea. En la vida adulta, una vez que la EPOC se ha desarrollado, los individuos expuestos al humo de biomasa experimentan síntomas de bronquitis crónica, disnea, mayor hiperreactividad bronquial y engrosamiento de las paredes bronquiales, más bronquiectasias, y una menor cantidad de signos de enfisema pulmonar que los sujetos con EPOC-TAB ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

Se conoce poco acerca de las diferencias en la patogénesis de la EPOC provocada por el humo de biomasa. Se ha observado que el humo de biomasa produce estrés oxidativo en los pacientes con EPOC al mismo nivel que lo hace el humo de cigarro ¹⁵⁰. En comparación con los individuos sanos, los sujetos con EPOC-BM presentan un incremento en la concentración de malonaldehído y superóxido dismutasa, y esto se correlaciona inversamente con la función respiratoria. En un estudio en el que se evaluó el LBA de pacientes con EPOC-BM, se encontró la expresión y actividad incrementada de las MMP 12 y 9 ¹⁵¹. Lo anterior sugiere, que en la EPOC-BM existe un mayor desequilibrio entre los mecanismos oxidantes y antioxidantes, así como entre las proteasas y antiproteasas, favoreciéndose la secreción de los factores oxidantes y las proteasas que conducen al daño tisular.

Para esclarecer los efectos inflamatorios del humo de biomasa, en estudios realizados en India, se encontró que en el esputo de individuos expuestos al humo de distintos combustibles sólidos combinados (leña, estiércol y residuos de sembradíos) existe un aumento en el número de células inflamatorias (leucocitos), y en la concentración de ciertos marcadores proinflamatorios (IL-6, IL-8, TNF y ROS) ¹⁵²⁻¹⁵⁴.

Hasta el momento no existen estudios publicados que expliquen si existen diferencias en la respuesta inmune adaptativa de ambos tipos de pacientes.

5. Justificación

La EPOC ocupa los primeros cinco lugares de morbilidad y mortalidad en el mundo. Esta enfermedad se caracteriza por la limitación poco reversible del flujo aéreo que tiene origen en la inflamación de los pulmones, las vías aéreas, y sistémica. El principal factor de riesgo identificado para desarrollar la EPOC es el consumo de tabaco, sin embargo, la exposición al humo de biomasa es otro factor de riesgo importante, sobre todo en países emergentes.

A pesar de que los pacientes con EPOC-TAB y EPOC-BM han sido clasificados dentro de una misma enfermedad, en la práctica médica se han observado diferencias clínicas y radiológicas entre ambos tipos de pacientes, lo cual ha llevado a la identificación de dos fenotipos de la enfermedad.

Las células T CD4⁺, con la polarización de la subpoblación Th17, ejercen un papel importante en el desarrollo de la inflamación de la EPOC-TAB; sin embargo, se desconoce cuál es el tipo de respuesta que predomina en la EPOC-BM, y si las características de ésta podrían explicar, por lo menos parcialmente, las diferencias clínicas de la enfermedad. En el presente trabajo se explorará el tipo de respuesta T CD4⁺ predominante en la EPOC-BM, permitiéndonos tener una mayor comprensión de las características de la inmunopatogenia de este fenotipo clínico de la enfermedad. A futuro, esto nos dará las herramientas para desarrollar tratamientos más específicos y eficientes para cada tipo de paciente.

6. Hipótesis

Existen diferencias en el perfil inflamatorio y la polarización de las células T CD4⁺ entre la sangre periférica de pacientes con EPOC-BM y EPOC-TAB.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Identificar si existen diferencias en el tipo de polarización de las células T CD4⁺ y la concentración de citocinas (características de cada linaje celular) en la sangre periférica de pacientes con EPOC-BM y EPOC-TAB.

7.2 Objetivos particulares

1. Analizar la distribución fenotípica de las subpoblaciones de células T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 y Treg) en la sangre periférica de pacientes con EPOC-BM, EPOC-TAB y controles sanos (CS).
2. Cuantificar las citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento en el suero de los sujetos de los distintos grupos de estudio.

8. Metodología

8.1 Panorama general

El estudio fue realizado en el Departamento de Investigación en Tabaquismo y EPOC del Instituto Nacional de Investigaciones Respiratorias (INER) en la Ciudad de México. La Ciudad de México tiene una altitud media de 2240 m sobre el nivel del mar; las PaO₂ y PaCO₂ en adultos jóvenes oscilan entre 66 y 72 mmHg, y de 28 a 32 mmHg, respectivamente ¹⁵⁵.

8.2 Diagnóstico de EPOC y factores de riesgo

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de EPOC basado en los estándares establecidos por la Sociedad Americana de Tórax (ATS, por las siglas en inglés de *American Thorax Society*) y la Sociedad Respiratoria Europea (ERS, las siglas en inglés de *European Respiratory Society*) ¹⁵⁶. Los factores de riesgo para el desarrollo de la EPOC (exposición a humo de biomasa y tabaquismo) fueron definidos durante una entrevista clínica, para la cual se utilizó una versión estandarizada de la versión en español del cuestionario de la ATS, al que se le adicionaron algunas preguntas sobre el uso de combustibles de biomasa. La exposición al humo de biomasa se consideró significativa y como posible factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC, cuando los pacientes habían utilizado la biomasa para cocinar por lo menos 6 meses continuos. La exposición acumulativa se expresó en horas/año (h/ año): el producto de multiplicar el número de años de exposición por el promedio de horas al día que permanecía en la cocina con estufa de leña ¹⁵.

El consumo acumulativo de cigarro se expresó como paquetes/ año (paq/ año), que equivale al promedio de cigarros consumidos al día multiplicado por el número de años fumando, y este producto dividido entre 20¹⁵⁷.

8.3 Valoración

En la consulta inicial, a todos los pacientes se les hacía una anamnesis y examen físico, se les realizaban los siguientes estudios: espirometría, placa de tórax, electrocardiograma, gasometría arterial, prueba de C6M, índice de BODE (predicción de sobrevida de pacientes con EPOC), y prueba de calidad de vida (cuestionario de St. George para enfermedades respiratorias crónicas).

8.4 Sujetos

Se reclutaron a 37 mujeres con EPOC. Se excluyó a los pacientes con antecedentes de exacerbación en las 6 semanas previas al estudio. Diecisiete pacientes fueron clasificadas en el grupo de EPOC-BM debido a que cumplían con el criterio de ≥ 100 h/año de exposición a humo de biomasa y ningún registro de tabaquismo. Por su parte, 20 pacientes se catalogaron en el grupo de EPOC-TAB, con un índice tabáquico ≥ 10 paq/año, y no tenían antecedente de exposición a humo de biomasa. Se incluyó a 20 controles sanos (CS): mujeres sin EPOC, sin antecedentes de tabaquismo, ni exposición a humo de biomasa y con función respiratoria normal para su edad, talla, peso y grupo étnico (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Diseño experimental y grupos de estudio

Tipo de diseño: comparativo, transversal.

CASOS INCLUSIÓN: Diagnóstico de EPOC ($FEV1/FVC \leq 70\%$), >40 años, síntomas y factores de riesgo. NO INCLUSIÓN: Exacerbación en las 6 semanas previas, comorbilidades (enfermedades cardíacas, respiratorias o autoinmunes).		CONTROL SIN EXPOSICIÓN Sin EPOC, sin antecedentes de exposición a humo de biomasa, ni tabaquismo, >40 años.
EPOC-BM IEHB ≥ 100 h/año *IEHB= horas de exposición al día x años de exposición	EPOC-TAB IT ≥ 10 paq/año *IT=(cigarros al día x años fumando)/20	

Todas las participantes firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética del INER (protocolo B26-12), y una muestra de sangre periférica fue recolectada por cada individuo.

8.5 Procesamiento de las muestras sanguíneas

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por las siglas en inglés de *peripheral blood mononuclear cells*) fueron aisladas por el protocolo de Ficoll-Hypaque¹⁵⁸. La viabilidad celular fue verificada por el método de tinción por exclusión con azul de tripano, con el cual se buscó al menos el 98% de células viables. Se realizó marcaje extracelular, utilizando los anticuerpos APC anti-CD3, APC-Cy7 anti-CD4, FITC anti-CD127 (sólo en los tubos que identificaron a las células Treg) (**cuadro 7**). Las muestras se incubaron durante 20 min a 4°C en oscuridad, y posteriormente se les efectuaron 2 lavados con

PBS. El marcaje intracelular ¹⁵⁹ se realizó utilizando el paquete comercial para permeabilización celular Cytotfix/Cytoperm (BD, Biosciences). Se utilizaron los siguientes anticuerpos para caracterizar a las células tipo Th1, Th2 y Th17, respectivamente: PE anti-IFN- γ , PE anti-IL-4 y PE anti-IL-17A. Para identificar a las células Treg (CD3⁺ CD4⁺ CD127^{lo} FOXP3⁺) se llevó a cabo el marcaje intranuclear con PE anti-FOXP3, para el cual se utilizó el paquete FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (Biolegend), y se siguieron las instrucciones del fabricante

160

(Ver **Anexo I**)

Cuadro 7. Características de los anticuerpos utilizados para el marcaje celular

Célula identificada	Analito	Detector	Fluorocromo	Fabricante	No de catálogo/ Clona	No de lote
Linfocitos T	CD3	Anti-CD3	APC	Biolegend	300312 / HIT3a	B138701
Linfocitos T helper y reguladores	CD4	Anti-CD4	APC-Cy7	Biolegend	300518 / RPA-T4	B140369
Th1	IFN- γ	Anti-IFN- γ	FITC	BD Pharmigen	340449 / -	78862
Th2	IL-4	Anti-IL-4	PE	BD Pharmigen	559333/ -	67943
Th17	IL-17a	Anti-IL-17a	PE	Biolegend	512306/ SCPL1362	B133191
Treg	FOXP3	Anti-FOXP3	PE	Biolegend	320208 / 259D	B134860
Treg	CD127	Anti-CD127	FITC	Biolegend	351312 / A019D5	n/a

8.6 Evaluación de las células por citometría de flujo

Las células marcadas fueron evaluadas mediante el citómetro de flujo FACS Aria I (BD, Biosciences) (**Anexo II**). La adquisición de células fue controlada por el programa DiVa (BD, Biosciences), y los datos colectados se exportaron al programa de análisis FlowJo (Treestar, Ashland, Ore). Cincuenta mil eventos fueron adquiridos por cada tubo analizado.

Para ajustar las ventanas de los gráficos de citometría, se utilizaron controles de tipo “fluorescencia-menos-uno” (FMO, por las siglas en inglés de *fluorescence minus one*) (**figura 4**).

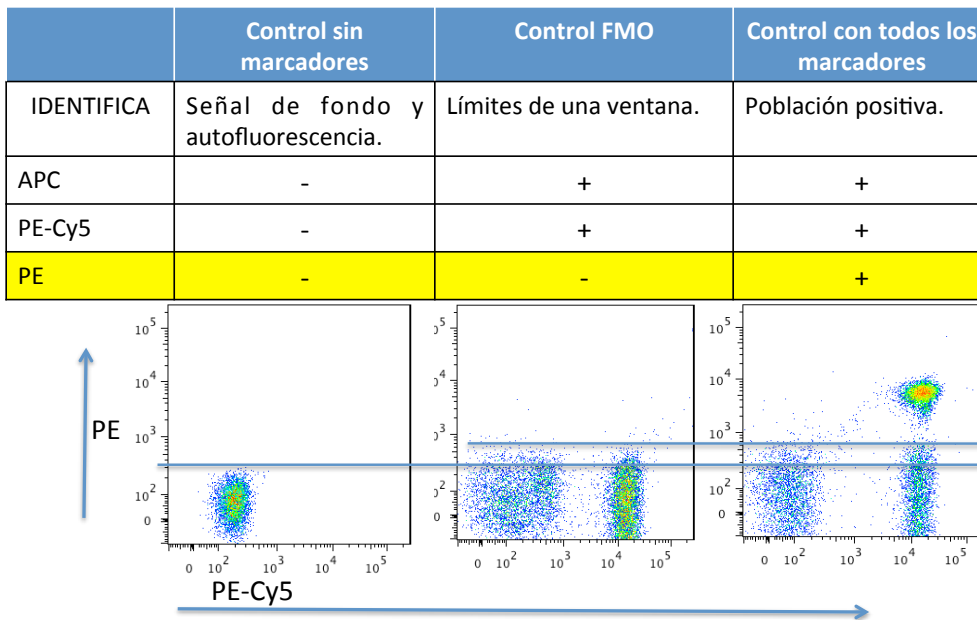


Figura 4. FMO para ajustar las ventanas de los marcadores con el fluorocromo PE.

Para presentar los datos utilizamos las frecuencias celulares (%), de acuerdo con el algoritmo de análisis que se presenta a continuación (**figura 5**):

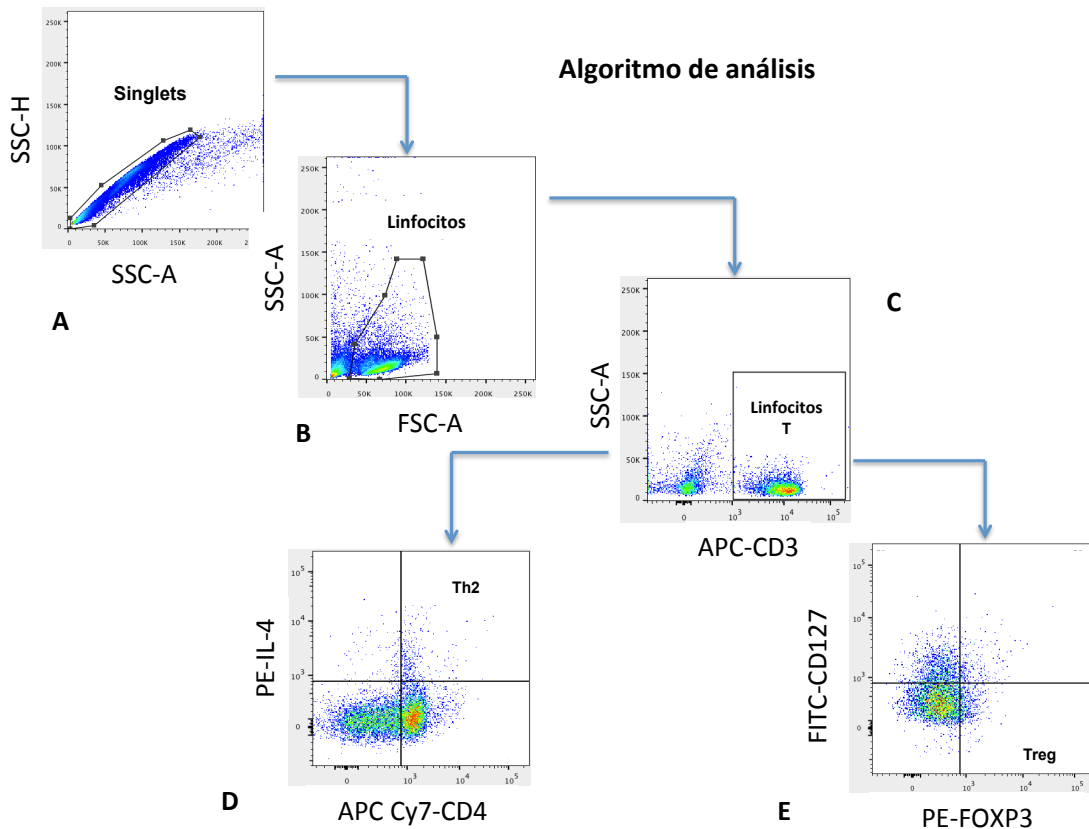


Figura 5. Algoritmo de análisis de los datos de citometría de flujo. Posterior a la discriminación de dobletes (A), las células linfoides fueron seleccionadas (B) y las células T fueron identificadas con base en la expresión de CD3 (C). La frecuencia de las células T CD4⁺ productoras de IFN γ , IL-4 e IL-17A fue cuantificada (D). Las células CD4⁺ FOXP3⁺ CD127^{lo} fueron consideradas Treg.

8.7 Concentración de citocinas séricas

Las muestras de suero fueron preservadas a -30°C; posteriormente, éstas se descongelaron en Baño María a 37°C. Las citocinas se cuantificaron por medio del equipo Bio-Plex (LUMINEX, BioRad), utilizando un paquete comercial para

26 analitos (Millipore) ¹⁶¹ (**figura 6**). Las curvas estándar se elaboraron con estándares premezclados incluidos en el paquete. La intensidad media de fluorescencia de las muestras fue interpolada por medio del método de ajuste logístico de cinco parámetros integrado en el programa Bioplex Manager v.5.0 (BIORAD Hercules CA, USA).

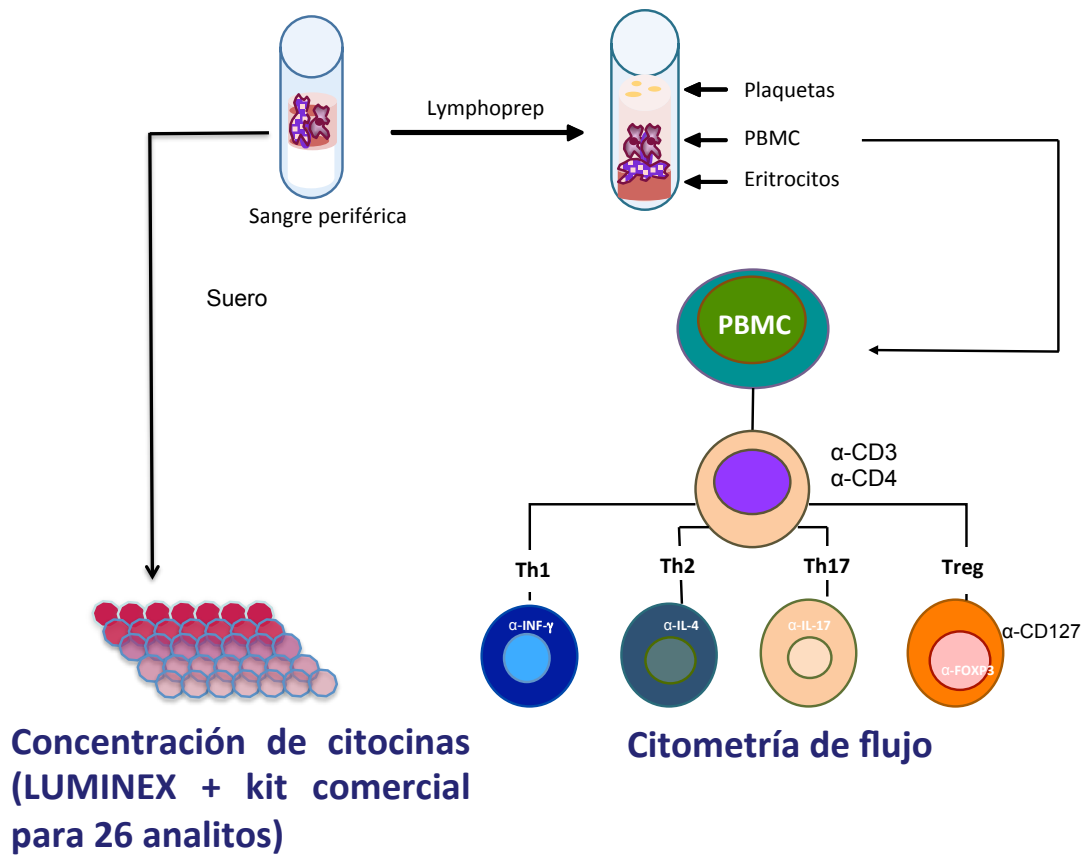


Figura 6. Diagrama esquemático de la metodología.

8.8 Análisis estadístico

Se realizaron los análisis estadísticos con el programa informático GraphPad Prism versión 6.00 para Mac. Para las variables continuas con distribución normal, como las demográficas, se aplicó la prueba t no pareada o un análisis

ANOVA de una vía según lo apropiado, y los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis para encontrar diferencias entre grupos de variables continuas con una distribución asimétrica (frecuencia de células T CD4⁺ y las concentraciones de citocinas); un análisis post-hoc se realizó mediante la prueba de U de Mann-Whitney, y los datos se presentan como mediana (rango intercuartílico). Las $p < 0.01$ se consideraron estadísticamente significativas.

9. Resultados

9.1 Sujetos

En el **cuadro 8** se presentan las características clínicas y demográficas de los sujetos incluidos en el estudio. No se encontraron diferencias significativas en la edad ni el IMC de los 3 grupos. Entre los grupos de EPOC no se encontraron diferencias significativas en los datos de la gasometría arterial (saturación de O₂ y presión parcial de CO₂), índice de disnea (mMRC) y tolerancia al ejercicio (C6M).

Las pacientes de ambos grupos de EPOC pertenecían a estadios similares de la gravedad de la enfermedad (moderado a grave), pues no existen diferencias estadísticamente significativas en los valores del VEF₁. El pronóstico de supervivencia (índice BODE) es mayor en el grupo de EPOC-BM, misma situación observada con el VEF₁/CVF, es decir que estas pacientes presentan menor nivel de obstrucción pulmonar que las de EPOC-TAB. Estas diferencias eran esperadas y se relacionan con una etiología distinta de los 2 grupos de pacientes con EPOC ¹⁶².

Cuadro 8. Características clínicas y demográficas

	EPOC-TAB (n=20)	EPOC-BM (n=17)	CS (n=20)	p
Edad (años)	67 ± 8	70 ± 8	65 ± 8	0.171*
IT (paq/año)	32 ± 22	-	-	
IEBM (h/año)	-	226 ± 145	-	
VEF ₁ pb (% predicho)	40 ± 21	49 ± 14	-	0.189**
CVF pb (% predicho)	72±18	73±19	-	0.441***
VEF ₁ /CVF pb (% predicho)	42 ± 14	51 ± 11	-	0.036**
PaCO ₂ (mmHg)	29 ± 6	29 ± 5	-	0.973***
SaO ₂ (%)	87 ± 6	89 ± 5	-	0.256***
Disnea (puntuación mMRC)	2.05 ± 1.22	1.63 ± 0.81	-	0.225**
Índice de BODE	6 ± 3	3 ± 1	-	0.001**
IMC (kg/m ²)	25 ± 5	29 ± 4	27 ± 3	0.086*
C6M (m)	323 ± 131	338 ± 71	-	0.745**

Los resultados se expresan como media ± DE.

CS: VEF₁/CVF pb (% predicho) > 70%, CVF y VEF₁ pb (% predicho) > 80%. Las pruebas complementarias a la espirometría sólo se realizaron en los pacientes con diagnóstico espirométrico de EPOC.

*ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los 3 grupos; ** Aproximación de Welch; *** Prueba t-student no pareada.

Abreviaciones: a) IT= Índice Tabáquico; b) IEBM= Índice de Exposición a Biomasa; c) VEF₁ pb= Volumen Espiratorio Forzado en 1 s post broncodilatador; d) CVF= Capacidad Vital Forzada; e) PaCO₂= Presión parcial de dióxido de carbono; d) SaO₂= nivel de saturación de oxígeno; e) Puntuación mMRC = modified Medical Research Council; Índice BODE = Body-mass index, airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise; IMC= Índice de Masa Corporal; f) C6M= Caminata de 6 minutos.

9.2 Células T CD4⁺ y concentración de citocinas

La frecuencia de las células Th1, Th2 y Th17 en sangre periférica es mayor en los pacientes que en los controles. Es probable que esto refleje la presencia de una respuesta inflamatoria en la EPOC. Asimismo, la IL-8 está aumentada en ambos grupos de pacientes; esto es importante, ya que es uno de los principales factores quimiotácticos de los neutrófilos, células que ejercen un papel crítico en el desarrollo de la EPOC.

Los pacientes con EPOC presentaron una frecuencia 2 veces mayor de las células Th1 al compararse con los CS. Esto es consistente con estudios previos, en donde se ha reportado una proporción incrementada de células Th1 en los pulmones, el LBA y la sangre periférica de los pacientes con EPOC-TAB 43,163, 164 .

No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de células Th1 entre los pacientes de los grupos EPOC-BM y EPOC-TAB, y en concordancia con esto, tampoco se observaron diferencias en la concentración sérica de IFN- γ de estos dos grupos (**cuadro suplementario 1**). La frecuencia elevada de las células Th1 encontradas en ambos grupos de pacientes puede indicar una activación similar de la respuesta inflamatoria, sin afectar el sesgo Th1/Th2.

Las células productoras de IL-4, a las cuales denominamos Th2, también se encontraron aumentadas en ambos grupos de pacientes, al compararse con el grupo de CS. Sin embargo, su aumento fue significativamente mayor en el grupo de EPOC-BM (**figura 7**). Además, este incremento se vio acompañado de una mayor concentración de la IL-4 en el suero de ese mismo grupo de pacientes, al compararse con el de EPOC-TAB y los CS (**figura 8**). Este

hallazgo es de particular importancia pues la EPOC-BM se ha asociado a ciertas características clínicas, tales como la hiperreactividad bronquial y la obstrucción de la vía aérea, que recuerda al asma como la enfermedad donde las respuestas de tipo Th2 se consideran un elemento patogénico clave.

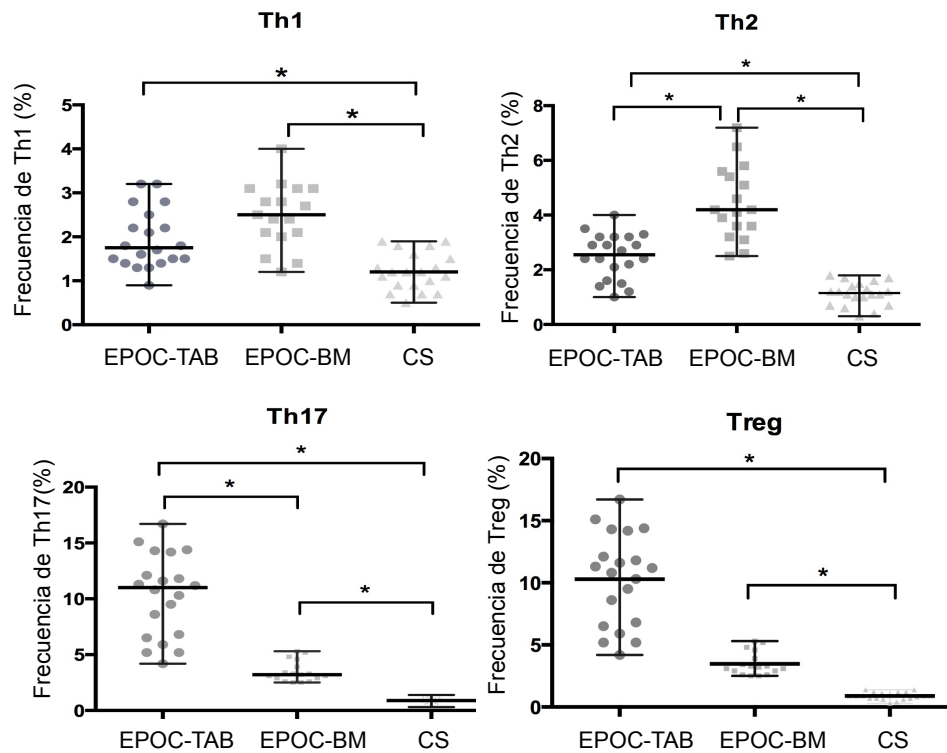


Figura 7. Frecuencia de las subpoblaciones de células T CD4⁺. Las células Th1, Th2, Th17 y Treg fueron analizadas en los pacientes con EPOC secundaria al tabaquismo e inducida por el humo de biomasa (EPOC-TAB y EPOC-BM, respectivamente) y controles sanos (CS). Cada punto representa a un paciente o control. En el gráfico se indican la mediana y el intervalo intercuartílico

* p<0.01.

Las células Th17 producen citocinas (por ejemplo, IL-17A-F, IL-22, etc.) que ejercen fuertes efectos sobre las células epiteliales, en los fibroblastos de las vías aéreas, y en las células del músculo liso para inducir la producción y secreción de quimiocinas que promueven el reclutamiento de neutrófilos ¹⁶⁵; éstos estimulan a las células del epitelio bronquial y los fibroblastos a producir la IL-6 ¹⁶⁶. Se ha encontrado un número mayor de células Th17 en la mucosa bronquial, así como en la sangre periférica de pacientes con EPOC estable ^{43,167}. En este estudio confirmamos el incremento en la frecuencia de las células Th17 en los pacientes con EPOC (**figura 7**). Sin embargo, estos resultados indican que el aumento de la población Th17 es una característica primordialmente asociada con el humo de tabaco, ya que el incremento de las células productoras de la IL-17 es considerablemente mayor que en los sujetos con EPOC-BM. En concordancia con estos resultados, la IL-6 (citocina necesaria para la polarización de células de la Th-17) incrementó de forma significativa sólo en los pacientes con EPOC-TAB (**figura 8**).

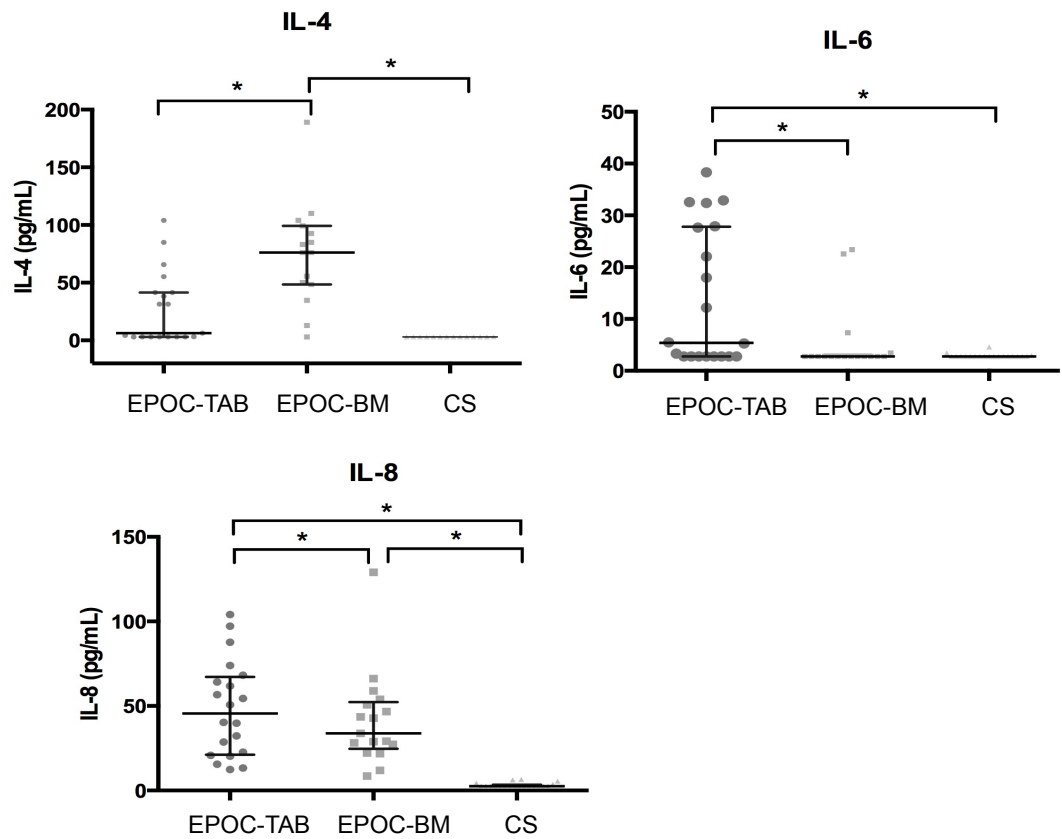


Figura 8. Concentración de las citocinas séricas de pacientes y controles. Las citocinas IL-4, IL-6 e IL-8 fueron cuantificadas en el suero de los pacientes con EPOC secundaria al tabaquismo e inducida por el humo de biomasa (EPOC-TAB y EPOC-BM, respectivamente) y controles sanos (CS). Cada punto representa a un paciente o control. En el gráfico se indican la mediana y el intervalo intercuartílico

* $p < 0.01$.

10. Discusión

En este estudio se evaluó la frecuencia de distintas subpoblaciones de células T CD4⁺ en dos tipos de EPOC. En estudios previos se ha reportado un incremento en la frecuencia de las células Th1, Th2 y Th17 de pacientes con EPOC, sin embargo, este trabajo demuestra que la distribución de estas subpoblaciones funcionales difiere dramáticamente dependiendo del agente causal de la EPOC. Los resultados expuestos en este documento ofrecen una posible explicación a las diferencias clínicas que existen entre los pacientes con EPOC expuestos a distintos humos; asimismo, sugieren que las características inflamatorias desencadenadas por cada agente están directamente asociadas con el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

En este trabajo se muestra que los pacientes con EPOC-BM desarrollan una respuesta predominantemente de tipo Th2, la cual es subyacente a las características clínicas observadas en este fenotipo de la enfermedad. Similar a los pacientes asmáticos, los de EPOC-BM tienen una respuesta inflamatoria persistente de tipo Th2, que probablemente conduzca a la hiperreactividad bronquial, producción excesiva de moco y remodelación de las vías aéreas ¹⁷⁰. Como ya se mencionó, la EPOC-BM tiene mayor incidencia en la población femenina; por tal motivo, en este estudio sólo fueron incluidas mujeres. Es probable que nuestros hallazgos sean aplicables a ambos sexos, sin embargo, las diferencias en la polarización de las células T asociadas con el sexo (causadas por factores hormonales y genéticos) podrían influir en los pacientes

masculinos ¹⁷¹. Esta hipótesis debe ser evaluada en estudios posteriores en los que se incluyan varones.

Es común que en los protocolos donde se evalúan citocinas intracelulares se haga una estimulación previa de las células con mitógenos como el PHA o LPS. Sin embargo, una fortaleza de este trabajo es que los sujetos estudiados mostraron una producción espontánea de citocinas. Esto sugiere que los factores ambientales (humo de cigarro y de biomasa) son capaces de ejercer efectos profundos en el desarrollo de la respuesta inmunológica del hospedero, con implicaciones considerables en enfermedades inflamatorias ¹⁷² como la EPOC.

Por otro lado, a pesar de que el tamaño de la muestra es limitado, fue posible identificar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos; esto valida los resultados de este estudio exploratorio y da pie a la realización de trabajos que abarquen una población más extensa.

Una limitación del estudio es que sólo fueron analizadas las poblaciones de células T CD4⁺ y la concentración de citocinas en la sangre periférica de los pacientes. Consideramos que estos resultados reflejan los efectos del tabaco y el humo de biomasa en la diferenciación de células T CD4⁺. No obstante, la frecuencia absoluta de las células Th2 y Th17 en la sangre periférica en pacientes con una enfermedad inflamatoria, puede verse afectada por el reclutamiento selectivo de células efectoras en órganos afectados. Asimismo, debido a que no es claro el origen de la inflamación sistémica en la EPOC, se desconoce si el fenómeno observado en la sangre periférica es extrapolable a

otros tejidos o sitios anatómicos. Se propone que en estudios posteriores se realice el análisis inmunofenotípico en LBA y biopsias pulmonares.

La IL-4 es una citocina que induce la diferenciación de linfocitos T vírgenes en células Th2. Tras la activación por la IL-4, las células producen y secretan más IL-4 ¹⁷³. La concentración elevada de IL-4 en los pacientes con EPOC-BM puede ser una condición desarrollada incluso antes de que la EPOC se ha instalado. Esto se explica por el hecho de que la edad a la que se inicia la exposición al humo de biomasa es diferente a la del tabaquismo. Es frecuente que en los medios rurales los sujetos sean expuestos al humo de biomasa desde el nacimiento, y que esto continúe a lo largo de su vida. Por otro lado, es importante mencionar que la exposición a humo de biomasa ha sido asociada con infecciones respiratorias agudas en niños ¹⁴⁵. Estos resultados sugieren que el predominio de la respuesta de tipo Th2 puede alterar los mecanismos de la inmunidad innata (por ejemplo, la producción y características del moco) y la función pulmonar (por ejemplo, la obstrucción bronquial); en consecuencia, es probable que esto predisponga a los pacientes a las infecciones respiratorias. La exposición temprana a humo de biomasa y las infecciones respiratorias frecuentes pueden inducir la remodelación y alterar la función de las paredes de las vías aéreas, lo que predispone a estos sujetos a desarrollar un fenotipo distinto de EPOC (en la edad adulta) que los pacientes con EPOC-TAB, quienes suelen iniciar el consumo de tabaco a una edad mayor ⁵.

La IL-4 promueve el cambio de isotipo a IgE en las células B ¹⁷³; los niveles de este anticuerpo correlacionan de manera positiva con la gravedad del asma y la

hiperreactividad bronquial. Para comprender las consecuencias del predominio de la respuesta de tipo Th2, será de utilidad que en estudios posteriores se cuantifique la concentración sérica de la IgE en pacientes con EPOC-BM.

Además de las citocinas, se ha descrito la participación de algunas proteínas con función de cinasa implicadas en el mecanismo de acción que conduce a la respuesta inflamatoria en la EPOC-BM; por ejemplo, la familia de proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK, por las siglas en inglés *mitogen-activated protein kinase*)¹⁷⁴. Se ha demostrado que el humo de biomasa tiene la capacidad de incrementar la expresión de la proteína p38 en células epiteliales de la vía aérea pequeña humana (SAEC, por las siglas en inglés *human small airway epithelial cells*)¹⁴¹. La MAPK p38 juega un papel importante en la regulación de la función de las células Th17, pues incrementa la expresión de la IL-17A¹⁷⁵. Tomando en cuenta lo anterior, observamos que el grupo de EPOC-BM muestra una respuesta contraria a la esperada, que puede ser explicada por la plasticidad celular del fenotipo Th17, que permite la conversión de Th17 a Th2 bajo las condiciones adecuadas del microambiente, por ejemplo la concentración elevada de la IL-4. Se ha demostrado que las células Th17 derivadas tanto *in vitro* como *ex vivo* (seleccionadas por ser IL-17A⁺) producen IL-4 cuando son sometidas a un segundo cultivo en condiciones Th2, o tras ser transferidas a ratones infectados por helmintos¹⁷⁶. En la **figura 9** se muestra un mecanismo hipotético, por el cual, la respuesta de tipo Th2 con un predominio de la IL-4, podría conducir a las características clínicas de los pacientes con EPOC-BM.

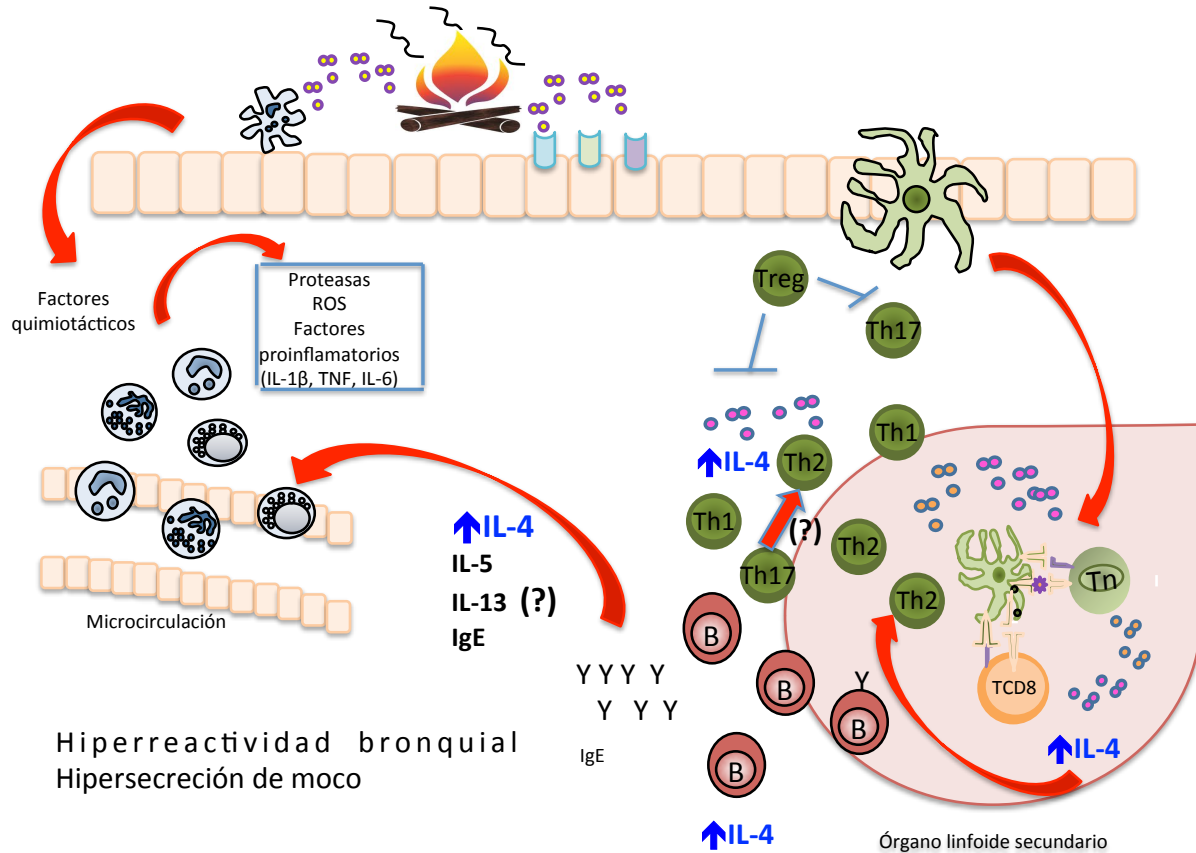
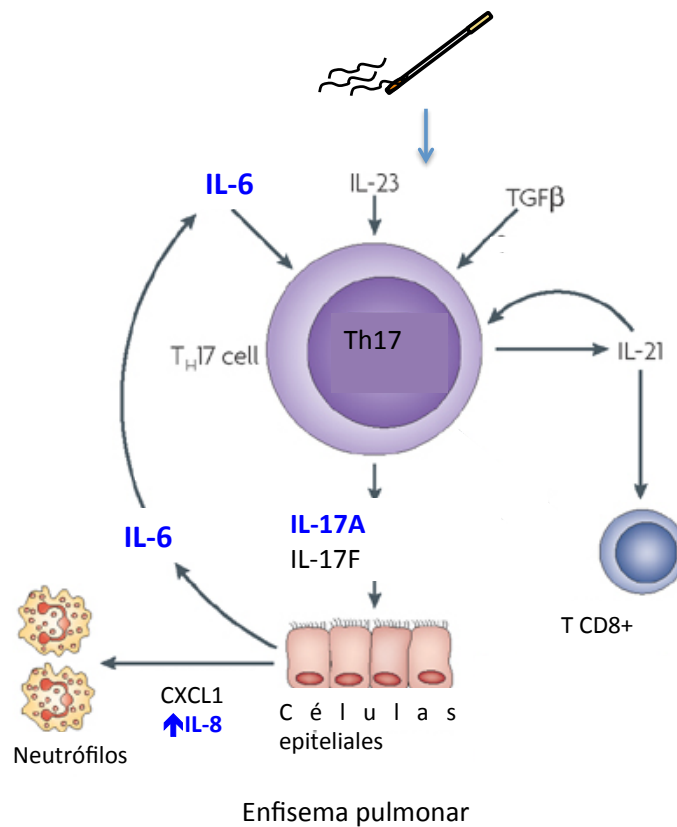


Figura 9. Diagrama hipotético sobre el mecanismo inflamatorio en la EPOC asociada a la exposición al humo de biomasa. En los pacientes con EPOC-BM, la IL-4 predomina en el microambiente; éste es un factor que induce la diferenciación de Th0 a Th2; incluso se ha planteado la posibilidad de que las células Th17 se conviertan en Th2 si el medio lo favorece. Las células Th2, al secretar IL-4, estimulan el cambio de isotipo hacia IgE en las células B; por otro lado, las citocinas de tipo Th2 estimulan la expansión y desarrollo de eosinófilos y células cebadas. Estos mecanismos en conjunto son, en parte, los responsables de la aparición de los signos y síntomas característicos de la EPOC-BM, por ejemplo, la hiperreactividad bronquial y la hipersecreción de moco. Con signo de interrogación aparecen todos los factores que se sugiere evaluar en próximos estudios, y que podrían esclarecer aspectos de la inmunopatogénesis de la EPOC-BM.

La IL-6 es una citocina con fuerte capacidad proinflamatoria, que ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades respiratorias como la EPOC y el asma ¹⁷⁷. La concentración elevada de IL-6 sérica es considerada como un marcador potencial que predice la mortalidad de pacientes con EPOC ¹⁷⁸. La secreción de la IL-6 es inducida en el pulmón por el humo de cigarro, y es capaz de promover la activación de las cascadas de señalización que resultan en la polarización de células Th17, como se ve ilustrado por los altos niveles de IL-6 que se encuentran en el suero de pacientes con EPOC-TAB. Este tipo de células producen citocinas de la familia IL-17, que ejercen efectos sobre la mayoría de las células del parénquima pulmonar, incluidos los macrófagos y las CD. La señalización mediada por la IL-17 induce la producción de mediadores inflamatorios tales como la IL-6. También ha sido reportado que la IL-17 puede inducir a las células epiteliales de las vías aéreas a producir moco y la MMP-9 ¹⁷⁹, siendo ésta última uno de los factores más importantes implicados en la destrucción del parénquima pulmonar, que deriva en el desarrollo del enfisema, una entidad clínica prevalente en los pacientes con EPOC-TAB.

En la **figura 10** se muestra un mecanismo hipotético por el cual, la respuesta de tipo Th17 con un predominio de la IL-6, podría conducir a las características clínicas de los pacientes con EPOC-TAB.



Modificado de: Nature Reviews Immunology 8, 183-192

Figura 10. Diagrama hipotético sobre el mecanismo inflamatorio en la EPOC asociada al tabaquismo. En la EPOC-TAB existe predominio de las células Th17 y de la IL-6. La IL-6 es uno de los factores relacionados con la diferenciación de células Th0 a Th17. Una vez activadas, las células Th17 secretan citocinas de la familia IL-17, las cuales estimulan a las células del epitelio pulmonar a producir IL-6 y factores quimiotácticos de neutrófilos, como la IL-8. Los neutrófilos son células que se han relacionado con la obstrucción pulmonar. Por otro lado, la IL-21 secretada por las células Th17, tiene la capacidad de estimular la activación de los linfocitos T CD8⁺, cuya actividad citolítica puede verse reflejada en la destrucción del parénquima pulmonar que conduce al enfisema. Todos los factores que no aparecen en “negritas” son aquéllos que no fueron evaluados en este estudio, y que deberán ser considerados en estudios posteriores.

11. Conclusión

La respuesta inflamatoria inducida por la exposición al humo de biomasa es diferente a la causada por el consumo de tabaco. Este fenómeno puede ser la base del desarrollo de los diferentes fenotipos clínicos asociados a la exposición a ambos agentes. Los estudios funcionales nos permitirán comprender mejor los mecanismos mediante los cuales el humo de biomasa y tabaco afectan a la respuesta inmune.

12. Perspectivas

Se sugiere realizar estudios funcionales *in vitro*, que permitan evaluar el efecto de cada uno de los humos en cultivos autólogos y alogénicos con células de ambos grupos de pacientes con EPOC. Para ello, se deberán cubrir con los siguientes objetivos particulares:

- Estandarizar el modelo para obtener extracto de humo de biomasa y cigarro, y determinar las concentraciones óptimas para realizar los cultivos.
- Inmunofenotipificar las subpoblaciones de células T CD4⁺ de los cultivos enriquecidos con humo de biomasa y de tabaco. Asimismo, cuantificar las citocinas en los sobrenadantes.
- Describir las características fenotípicas de las APC utilizadas en los cultivos.

Como se mencionó en la discusión, existen varios factores solubles que pueden ser evaluados para comprender mejor los mecanismos inflamatorios de cada entidad fenotípica, y extender el estudio al LBA y biopsias pulmonares.

Referencias

1. The Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease: GOLD. Update 2015. Disponible en: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2015_Sept2.pdf. 22/10/2015.
2. Scott DR and Hobbs FD. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Risk Factors, and Outcome Trials. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3(7): 635-640.
3. "The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2011". World Health Organization. Disponible en: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. 12/11/15.
4. Buist AS, Vollmer WM, Sullivan SD, et al. The Burden of obstructive lung disease initiative (BOLD): Rationale and designs. *J COPD*. 2005;2: 277-283.
5. Menezes AM, Pérez-Padilla R, Jardim JR, et al. PLATINO Team. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American Cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005;366:1875-1881.
6. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, et al. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med*. 2005; 118 (12): 1364-1372.
7. Brode SK, Ling SC, Chapman KR. Alpha-1 antitrypsin deficiency: a commonly overlooked cause of lung disease. *CMAJ*. 2012; 184 (12): 1365–1371.

8. Palacios D, Mendez O. Neumopatía por humo de leña. Un estudio en autopsias [Pneumopathy due to inhaling firewood smoke. Autopsy findings from the San Juan de Dios Hospital]. *Biomédica*. 1998; 18:153–160.
9. Camp PG, Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Alva LF, et al. COPD phenotypes in biomass smoke- versus tobacco smoke-exposed Mexican females. *Eur Respir J*. 2013 Oct 10. [Epub ahead of print].
10. Gelb AF, Hogg JC, Muller NL, et al. Contribution of emphysema and small airways in COPD. *Chest*. 1996;109:353–359.
11. González M, Maldonado D, Pérez J, Varón H. Pseudoenfisema en mujeres con EPOC por humo de leña en Bogotá (2600 m) [Pseudophysilogic emphysema in women with wood smoke COPD in Bogota (2600 m)]. *Arch Bronconeumol*. 2004;40:31.
12. Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Acuña-Kaldman M, Arango-Ramírez A, Argote-Greene LM, Cante-Flore V, et al. Guías para el diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Neumol Cir Torax*. 2012; 71(1): 15-19.
13. Mujeres y hombres en México 2013. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2013. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/mujeresyhombres/2013/Myh_2013.pdf. 24/10/2014.
14. Pawel RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364: 613-620.

15. Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Pérez-Padilla R, et al. Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco. *Am J Resp Crit Care Med.* 2006; 173:393-397.
16. Mannino DM, Buist AS, Petty TL, et al. Lung function and mortality in the United States: Data from the first national health and nutrition examination survey follow up study. *Thorax.* 2003; 58: 388-393.
17. Carter R, Blevins W, Stocks J, et al. Cost and quality issues related to the management of COPD. *Sem Resp Crit Med.* 1999; 20:199-212.
18. Reynales-Shigematsu LM, Juárez-Márquez SA, Valdes-Salgado R. Costos de atención médica atribuibles al tabaquismo en el IMSS Morelos. *Salud Pública Mex.* 2005; 47: 451-457.
19. Stoller JK, Aboussouan LS. α 1-antitrypsin deficiency. *Lancet.* 2005; 365(9478): 2225-2236.
20. Castaldi PJ, Cho MH, Cohn M, et al. The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. *Hum Mol Genet.* 2010;19:526-534.
21. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, et al. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:2152–2158.
22. Tam A , Morrish D , Wadsworth S , et al. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Womens Health.* 2011; 11:24,
23. Recomendaciones para el Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Asociación Latinoamericana de Tórax. 2011. Disponible en:

https://www.alatorax.org/images/stories/demo/pdf/epoc/guias_alat/guiaAL_AT_EPOC_abril2011.pdf. 27/10/14.

24. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J*. 1999; 13:1109-1114.
25. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global burden of disease and risk factors. Washington: The World Bank, 2006.
26. COPD prevalence in 12 Asia-Pacific countries and regions: projections based on the COPD prevalence estimation model. *Respirology*. 2003; 8(2):192-198.
27. Menezes AM, Lopez MV, Hallal PC, Muiño A, et al. Prevalence of smoking and incidence of initiation in the Latin American adult population: the PLATINO study. *BMC Public Health*. 2009; 9:151.
28. Junemann A, Lega G. Inhalación de humo de leña: una causa relevante pero poco reconocida de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Revista Argentina de Medicina Respiratoria*. 2007; 2: 51-57.
29. Pérez P, Regalado J, Sverre V, et al. Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican woman. A case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154: 701-706.
30. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004; 350(26):2645-2653.
31. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009; 360(23):2445-2454.

32. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 2009; 33(5):1165-1185.
33. Patel BD, Coxson HO, Pillai SG, Agustí AGN, et al. Airway Wall Thickening and Emphysema Show Independent Familial Aggregation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178(5):500-505.
34. Garcia-Aymerich J, Agustí A, Barbera JA, Belda J, et al. [Phenotypic heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch Bronconeumol*. 2009; 45(3):129-138.
35. Sverzellati N, Calabrò E, Randi G, La Vecchia C, et al. Sex differences in emphysema phenotype in smokers without airflow obstruction. *Eur Respir J*. 2009; 33(6):1320-1328.
36. Blidberg K, Palmberg L, Dahlén B, et al. Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2012;17:854-860.
37. Takeyama K, Dabbagh K, Jeong S, et al. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: Role of neutrophils. *J Immunol*. 2000;164: 1546-1552.
38. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*. 2000;117:684-694.
39. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, et al. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155(2):542-548.

40. Linden M, Rasmussen JB, Piitulainen E, et al. Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148:1226–32.
41. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC. Inflammation in bronchial biopses of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 153(3): 852-857.
42. Hodge S, Hodge G, Naim J, et al. Increased Airway Granzyme b and Perforin in Current and Ex-Smoking COPD Subjects. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* 2006; 3(4): 179-187.
43. Vargas-Rojas MI, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, et al. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2011; 105(11): 1648-1654.
44. Chen C, Shen Y, Ni CJ, et al. Imbalance of circulating T-lymphocyte subpopulation in COPD and its relationship with CAT performance. *J Clin Lab Anal.* 2012; 26:109-114.
45. Whittaker L, Niu N, Temann UA, et al. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27:593-602.
46. Kang MJ, Lee CG, Cho SJ, et al. IFN-gamma-dependent DNA injury and/or apoptosis are critical in cigarette smoke-induced murine emphysema. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:517-518.

47. Pan HF, Leng RX, Feng CC, et al. Expression profiles of Th17 pathway related genes in human systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep.* 2013;40:391-399.
48. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17- producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6:1123-1132.
49. Wei J, Chen D. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes & Infections.* 2013; 2(9): e60.
50. Xiong XZ, Jin Y, Zhou Q, et al. Correlation between FoxP3⁺ regulatory T cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008;88:471-474.
51. Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, et al. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: Beneficial or harmful? *Eur Respir J.* 2009;34:219-230.
52. Demoor T, Bracke KR, Maes T, et al. Role of lymphotoxin-alpha in cigarette smoke-induced inflammation and lymphoid neogenesis. *Eur Respir J.* 2009;34:405-416.
53. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax.* 2004; 59(7):574-80.
54. Tanni SE, Pelegriño NR, Angeleli AY, Correa C, Godoy I. Smoking status and tumor necrosis factor-alpha mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflamm (Lond).* 2010; 9(7):29.

55. Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, et al. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest*. 2007;131(1):37–43.
56. Karadag F, Kirdar S, Karul AB, et al. The value of C-reactive protein as a marker of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Int Med*. 2008;19(2):104–8.
57. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003; 21(2):347–60.
58. Schols AM, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82:53–59.
59. Landbo C, Prescott E, Lange P, Vestbo J, Almdal TP. Prognostic value of nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160:1856–1861.
60. American Thoracic Society; European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(Suppl):S1–S40.
61. Agusti A, Morla M, Sauleda J, et al. NF- κ B activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax*. 2004; 59:483–4.
62. Agusti AGN, Sauleda J, Miralles C, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 485–489.

63. Sin DD, Man SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation*. 2003; 107:1514–1519.
64. Black-Shinn JL, Kinney GL, Wise A, et al. Cardiovascular disease is associated with COPD severity and reduced functional capacity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181:A5918.
65. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, et al. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J*. 2008; 32(4):962–969.
66. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, et al. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med*. 1987; 106(4):512–518.
67. Ferguson GT, Calverley PM, Anderson JA, et al. Prevalence and progression of osteoporosis in patients with COPD: results from the towards a revolution in COPD health study. *Chest*. 2009;136(6):1456–65.
68. Robbins J, Aragaki AK, Kooperberg C, et al. Factors associated with 5-year risk of hip fracture in postmenopausal women. *JAMA*. 2007; 298(20):2389–2398.
69. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev*. 2007; 65(12 Pt 2):S147–51.
70. Hill K, Geist R, Goldstein RS, Lacasse Y. Anxiety and depression in end-stage COPD. *Eur Respir J*. 2008; 31: 667–677.
71. Anisman H, Merali Z, Hayley S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between

- depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 2008; 85: 1–74.
72. Rana JS, Mittleman MA, Sheikh J, et al. Chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2004; 27: 2478–2484.
73. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes.* 2003; 52: 812–817
74. Kido T, Tamagawa E, Bai N, et al. Particulate Matter Induces Translocation of IL-6 from the Lung to the Systemic Circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 44: 197–204.
75. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352(16):1685–1695.
76. Dietrich M, Block G, Benowitz NL, et al. Vitamin C supplementation decreases oxidative stress biomarker f2-isoprostanes in plasma of nonsmokers exposed to environmental tobacco smoke. *Nutr Cancer.* 2003; 45(2):176–84.
77. Vernooij JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(9):1218–1224.

78. Sabit R, Thomas P, Shale DJ, et al. The effects of hypoxia on markers of coagulation and systemic inflammation in patients with COPD. *Chest*. 2010; 138(1):47–51.
79. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(4 Pt 1):1179–1184.
80. Madjdpour C, Jewell UR, Kneller S, et al. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 284(2): L360–367.
81. Pini L, Valsecchi A, Boni E, et al. Acute dynamic hyperinflation and systemic inflammation in stable COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181:A2907.
82. Casanova C, Cote C, de Torres JP, et al. Inspiratory-to-total lung capacity ratio predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(6): 591–597.
83. Sharma G, Hanania NA, Shim YM. The aging immune system and its relationship to the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6(7): 573–80.
84. Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*. 2009; 135(1): 173–180.
85. Rabinovich RA, Figueras M, Ardite E, et al. Increased tumour necrosis factor-alpha plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur Respir J*. 2003; 21(5):789–94.

86. Montes de Oca M, Torres SH, De Sanctis J, et al. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2005; 26(3):390–397.
87. Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax*. 2008;63(2):100–107.
88. Terashima T, Wiggs B, English D, et al. The effect of cigarette smoking on the bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155(3):1021–1026.
89. Terashima T, Klut ME, English D, et al. Chronic cigarette smoking causes sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow in pulmonary capillaries. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 20:171–177.
90. van Eeden SF, Hogg JC. Changes in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes indicative of bone marrow stimulation in chronic smokers. *Eur Respir J*. 2000; 15: 915–921.
91. Noguera A, Batle S, Miralles C, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001; 56(6): 432–437
92. Sparrow D, Glynn RJ, Cohen M, et al. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest*. 1984; 86(3):383–386.
93. Noguera A, Busquets X, Sauleda J, et al. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158(5 Pt 1): 1664–1668.

94. Zhu X, Gadgil AS, Givelber R, et al. Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Immunology*. 2009; 182(5): 3270-3277.
95. M Traves SL, SJ, Barnes PJ, et al. Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J Leukoc Biol*. 2004; 76: 441–450.
96. Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, et al. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir Res*. 2003; 4: 11.
97. Taylor AE, Wedzicha JA, Quint JK, et al. Reduced phagocytosis of *S. Pneumoniae* and *H. Influenzae* by monocyte derived macrophages from COPD subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 127: A993.
98. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, et al. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. 2000; 55: 114–120.
99. Yende S, Waterer GW, Tolley EA, et al. Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax*. 2006; 61: 10–16.
100. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, et al. Tumor necrosis factor- α levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150: 1453–1455.
101. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor- α system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 1179–1184.

102. de Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, et al. Elevated TNF- α production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 633–637.
103. Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, et al. Muscle force during an acute exacerbation in hospitalised patients with COPD and its relationship with CXCL8 and IGF-I. *Thorax.* 2003; 58: 752–756.
104. Dahl M, Vestbo J, Lange P, et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 250–255.
105. Fogarty AW, Jones S, Britton JR, et al. Systemic inflammation and decline in lung function in a general population: a prospective study. *Thorax.* 2007; 62: 515–520.
106. Broekhuizen R, Grimble RF, Howell WM, et al. Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1 β -511 single nucleotide polymorphism. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82: 1059–1064.
107. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, et al. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1999; 54:581-586.
108. Montes de Oca M, Perez-Padilla R, Talamo C, et al. Acute bronchodilator responsiveness in subjects with and without airflow obstruction in five Latin American cities: the PLATINO study. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010; 23(1): 29-35.

109. Casas A, Vilaro J, Rabinovich R, et al. Encouraged 6-min walking test indicates maximum sustainable exercise in COPD patients. *Chest*. 2005; 128(1):55-61.
110. Spruit MA, Watkins ML, Edwards LD, et al. Determinants of poor 6-min walking distance in patients with COPD: the ECLIPSE cohort. *Respir Med*. 2010; 104(6):849-857.
111. Troosters T, Vilaro J, Rabinovich R, et al. Physiological responses to the 6-min walk test in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2002; 20(3):564-569.
112. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, et al. The body mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004; 350(10):1005-1012.
113. Indoor air pollution and health. Recuperado el 13 de septiembre de 2014, del sitio web de la Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs292/en/>.
114. Bruce N, Rehfuss E, Mehta S, et al. Indoor air pollution. Disease control priorities in developing countries. 2nd ed. Washington: Oxford University Press and The World Bank; 2006:793-815.
115. Smith K, Mehta S, Maeusezahl-Feuz M. Indoor air pollution from household use of solid fuels: Comparative quantification of health risks. In: Ezzati M, Lopez A, Rodgers A, Murray C, eds. Global and Regional Burden of Disease Attributable to Selected Major Risk Factors. Geneva: World Health Organization; 2004:1435-1493.

116. Guarnieri MJ, Diaz JV, Basu C, et al. Effects of Woodsmoke Exposure on Airway Inflammation in Rural Guatemalan Women. *PLoS ONE*. 2014; 9(3): e88455. doi:10.1371/journal.pone.0088455.
117. Banerjee A, Mondal NK, Das D, et al. Neutrophilic inflammatory response and oxidative stress in premenopausal women chronically exposed to indoor air pollution from biomass burning. *Inflammation*. 2012; 35: 671–683.
118. Perez-Padilla R, Regalado J, Vedal S et al. Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women: a case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154:701–706.
119. Klepeis NE, Nelson WC, Ott WR et al. The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2001; 11:231-52.
120. Naeher L P, Brauer M, Lipsett M et al. Woodsmoke health effects: a review. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 67–106.
121. Simoneit BRT, Schauer JJ, Nolte CG et al. Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles. *Atmos Environ*. 1998; 33(2): 173–182.
122. Khalil, M. A. K., and Rasmussen, R. A. Tracers of wood smoke. *Atmos Environ*. 2003; 37(9–10): 1211–1222.
123. Barregard L, Sällsten G, Gustafson P, Andersson L, Johansson L, Basu S, et al. Experimental exposure to wood-smoke particles in healthy humans: effects on markers of inflammation, coagulation, and lipid peroxidation. *Inhal Toxicol*. 2006; 18(11): 845-53.

124. Kirk RS and Ezzati M. HOW ENVIRONMENTAL HEALTH RISKS CHANGE WITH DEVELOPMENT: The Epidemiologic and Environmental Risk Transitions Revisited. *Annu Rev Environ Resour.* 2005; 30:291–333.
125. Smith, KR., Mehta S and Maeusezahl-Feuz M. 2004. Indoor smoke from household solid fuels. In *Comparative quantification of health risks: Global and regional burden of disease due to selected major risk factors. 2:* 1435–1493. Geneva: World Health Organization.
126. Thorning DR, Howard ML, Hudson LD and Schumacher RL. Pulmonary responses to smoke inhalation: Morphologic changes in rabbits exposed to pine wood smoke. *Hum Pathol.* 1982; 13(4): 355–364.
127. Loke, J, Paul E, Virgulto JA and Smith GJ. Rabbit lung after acute smoke inhalation. Cellular responses and scanning electron microscopy. *Arch Surg.* 1984; 119(8):956–959.
128. Rasp FL, Clawson CC, Hoidal JR and Repine JE. Reversible impairment of the adherence of alveolar macrophages from cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1978; 118(6): 979–986.
129. Matthew E, Warden G and Dedman J. A murine model of smoke inhalation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280(4): L716–L723.
130. Eiji Tamagawa, Ni Bai, Kiyoshi Morimoto, Claire Gray, Tammy Mui, Kazuhiro Yatera, et al. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295: L79–L85.

131. Kobzik, L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol.* 1995; 155: 367–376.
132. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:207-232.
133. Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(2): 303–312.
134. Alexis NE, Lay JC, Zeman K et al. Biological material on inhaled coarse fraction particulate matter activates airway phagocytes in vivo in healthy volunteers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2007; 117(6): 1396–1403.
135. De Haar C, Kool M, Hassing I et al. Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 1246–1254.
136. Porter M, Karp M, Killedar S, Bauer SM, Guo J, Williams DA, et al. Diesel-Enriched Particulate Matter Functionally Activates Human Dendritic Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 37(6): 706–719.
137. Robert Silbajoris, Alvaro R. Osornio-Vargas, Steven O. Simmons. Ambient Particulate Matter Induces Interleukin-8 Expression through an

- Alternative NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) Mechanism in Human Airway Epithelial Cells. *Environ Health Perspect.* 2011; 119(10): 1379–1383.
138. Yu O, Sheppard L, Lumley T, Koenig JQ and Shapiro GG. Effects of ambient air pollution on symptoms of asthma in Seattle-area children enrolled in the CAMP study. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:1209-1214.
139. Barrett EG, Henson RD, Seilkop SK, McDonald JD and Reed MD. Effects of hardwood smoke exposure on allergic airway inflammation in mice. *Inhal Toxicol.* 2006; 18:33–43.
140. Bølling A, Totlandsdal AI, Sallsten G, Braun A, Westerholm R, Bergvall C, et al. Wood smoke particles from different combustion phases induce similar pro-inflammatory effects in a co-culture of monocyte and pneumocyte cell lines. *Part Fibre Toxicol.* 2012,9:45.
141. Mehra D, Geraghty PM, Hardigan AA, Foronjy R. A Comparison of the Inflammatory and Proteolytic Effects of Dung Biomass and Cigarette Smoke Exposure in the Lung. *PLoS ONE.* 2012; 7(12): e52889.
142. Institute of Health Metrics and Evaluation. Global burden of disease study 2010 (GBD 2010) data downloads. Recuperado el 24 de julio de 2014, del sitio de la Global Health Data Exchange. <http://ghdx.healthmetricsandevaluation.org/global-burden-diseasestudy-2010-gbd-2010-data-downloads>.
143. Mortimer K, Gordon SB, Jindal SK, Accinelli RA, Balmes J, Martin WJ, II. Household air pollution is a major avoidable risk factor for cardio-respiratory disease. *Chest.* 2012; 142(5): 1308-1315.

144. Diette GB, Accinelli RA, Balmes JR, Buist AS, Checkley W, Garbe P, et al. Obstructive lung disease and exposure to burning biomass fuel in the indoor environment. *Glob Heart*. 2012; 7(3): 265-270.
145. Smith KR, Samet JM, Romieu I and Bruce N. Indoor air pollution in developing countries and acute lower respiratory infections in children. *Thorax*. 2000; 55(6): 518-532.
146. Gonzalez-Garcia M, Torres-Duque CA, Bustos A, Jaramillo C and Maldonado D. Bronchial hyperresponsiveness in women with chronic obstructive pulmonary disease related to woodsmoke. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012;7:367-373.
147. Palacios D and Mendez O. Neumopatía por humo de leña. Un estudio en autopsias [Pneumopathy due to inhaling firewood smoke. Autopsy findings from the San Juan de Dios Hospital]. *Biomédica*. 1998; 18:153–160.
148. Gelb AF, Hogg JC, Muller NL, Schein MJ, Kuei J, Tashkin DP, et al. Contribution of emphysema and small airways in COPD. *Chest*. 1996;109:353–359.
149. González M, Maldonado D, Pérez J y Varón H. Pseudoenfisema en mujeres con EPOC por humo de leña en Bogotá (2600 m) [Pseudophysiological emphysema in women with wood smoke COPD in Bogota (2600 m)]. *Arch Bronconeumol*. 2004;40:31.
150. Montaña M, Cisneros J, Ramirez-Venegas A, Pedraza-Chaverri J, Mercado D, Ramos C, et al. Malondialdehyde and superoxide dismutase correlate with FEV(1) in patients with COPD associated with wood smoke exposure and tobacco smoking. *Inhal Toxicol*. 2010;22(10):868-874.

151. Montaña M, Beccerril C, Ruiz V, Ramos C, Sansores RH and Gonzalez-Avila G. Matrix metalloproteinases activity in COPD associated with wood smoke. *Chest*. 2004; 125:466–472.
152. Dutta A, Roychoudhury S, Chowdhury S and Ray MR. Changes in sputum cytology, airway inflammation and oxidative stress due to chronic inhalation of biomass smoke during cooking in premenopausal rural Indian women. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(3):301-308
153. Mukherjee B, Dutta A, Roychoudhury S and Ray MR. Chronic inhalation of biomass smoke is associated with DNA damage in airway cells: involvement of particulate pollutants and benzene. *J Appl Toxicol*. 2013;33(4):281-289.
154. Banerjee A, Mondal NK, Das D and Ray MR. Neutrophilic inflammatory response and oxidative stress in premenopausal women chronically exposed to indoor air pollution from biomass burning. *Inflammation*. 2012; 35: 671–683.
155. Pérez-Padilla R. Population distribution residing at different altitudes: Implications for hypoxemia. *Arch Med Research* 2002; 33:162-166.
156. Celli BR, Mac Nee W, Agusti A, et al. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*. 2004; 23: 932–946.
157. National Cancer Institute definition of pack year. Disponible en: <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=306510>. 17/12/14.

158. Isolation of mononuclear cells. Disponible en:
http://www.thgeyer.dk/fileadmin/user_assets/documents/GE_Healthcare/Isolation_of_mononuclear_cells.pdf. 08/08/14.
159. Immunofluorescent Staining of Intracellular Cytokines for Flow Cytometric Analysis. Disponible en:
http://www.bdbiosciences.com/resources/protocols/cytokines_fca.jsp.
08/08/14.
160. FOXP3 Intracellular Staining Protocol. Disponible en:
http://www.biolegend.com/media_assets/support_protocol/BioLegend_FOXP3_Intracellular_Staining_Protocol.pdf. 05/10/14.
161. Milliplex Human Cytokine PREMIXED 26 Plex Immunoassay Kit. Disponible en:
[http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/506688139fe4c9a98525742c007755db/\\$FILE/MPXHICYTO-60K.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/506688139fe4c9a98525742c007755db/$FILE/MPXHICYTO-60K.pdf).
05/10/14.
162. Perez-Padilla R, Ramirez-Venegas A, Sansores-Martinez R. Clinical characteristics of patients with biomass smoke-associated COPD and chronic bronchitis. *J COPD F*. 2014; 1(1): 23-32.
163. Horge G, Nairn J, Holmes M, et al. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol*. 2007; 150: 22e9.
164. Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest*. 2002; 121: 160Se5S.

165. Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26:748e53.
166. Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 430e8.
167. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2009 ; 157 (2): 316 – 324.
168. Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest.* 2007; 132: 156–63.
169. Roos-Engstrand E, Pourazar J, Behndig AF, Bucht A. Expansion of CD4⁺CD25⁺ helper T cells without regulatory function in smoking and COPD. *Respiratory Research* 2011, 12:74.
170. Sumi Y and Hmaid Q. Air Remodeling in Asthma. *Allergology International.* 2007; 56:341-348.
171. Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmunity.* 2012; 38 (2-3): J282-91.
172. Figueiredo CA, Alcântara-Neves NM, Veiga R, et al. Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environ Health Perspect.* 2009.; 117(5):845-849.

173. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, et al. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol.* 2008; 9 (3): 310–318.
174. Johnson GL and Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002; 298(5600):1911-1912.
175. Noubade R, Kremontsov DN, Del Rio R, et al. Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis. *Blood.* 2011; 118(12): 3290-300.
176. Panzer M, Sitte S, Wirth S, et al. Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection. *J Immunol.* 2012; 188: 615-623.
177. S. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in Asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(9): 1281-1290.
178. Chen Y, Celli BR, Locantore N, Yates J, et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185: 1065-1072.
179. Thai P, Zhao YH, et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem.* 2003; 278:17036-17043.

ANEXO I. Marcadores, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento relacionados con los linfocitos T

Marcadores de células T

- **CD3** o correceptor de células T es un complejo proteico que está compuesto por 4 cadenas. En los mamíferos la estructura está integrada por una cadena γ , una δ y dos ϵ ; éstas se encuentran asociadas al TCR y a la cadena ζ , y en conjunto transducen las señales de activación de los linfocitos T.
- **CD4** una moléculas que se expresa en la superficie de algunas células T y en las CD. Es una glucoproteína monomérica que contiene cuatro dominios (D1, D2, D3, D4) de tipo inmunoglobulina. Participa en la adhesión de las células T a las células diana, implicada también en la maduración tímica y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del MHC II.
- **CD8** es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T conocidas como citotóxicas. Es una glucoproteína dimérica que cruza la membrana y participa como correceptor en la estabilización de la adhesión del TCR a moléculas del MHC I. Implicada también en la maduración tímica de linfocitos T y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del HLA I.
- **CXCR3** es un receptor de quimiocinas de tipo CXC, que se expresa en los linfocitos T activados, las células NK y en algunas células epiteliales.

Se expresa principalmente en células Th1, y uno de los ligandos activadores es el CXCL-10. La interacción entre el CXCR3 y su ligando atrae y promueve la maduración de células Th1. Se ha sugerido que los linfocitos Th1 en los pulmones de sujetos con enfermedades relacionadas al tabaquismo, conducen a la progresión del enfisema a través de los ligandos del CXCR3.

- **CD25** (receptor alfa de IL-2) es una proteína transmembranal de tipo I que se expresa en células T activadas. Entre las 12 y 24 horas posteriores a la presentación antigénica, aumenta la expresión del CD25 en la membrana celular, y en consecuencia se estimula la proliferación y diferenciación celular. En las células T reguladoras, el CD25 se encuentra de forma constitutiva, generando una expresión alta o brillante (medido mediante citometría de flujo).
- **CD69** es una glicoproteína transmembranal de tipo II con una lectina C como dominio de unión en la porción extracelular de la molécula. Esta molécula es una de las que se expresan en las etapas tempranas de la activación de las células T, sin embargo puede estar presente en otros leucocitos . Su expresión inicia de 1 a 2 horas después de la presentación antigénica, y actúa como un coestimulador de la activación y proliferación de los linfocitos T.
- **CD127** (receptor alfa de la IL-7) es un receptor membranal expresado en los linfocitos T y B inmaduros, macrófagos y células del endotelio vascular. Esta proteína juega un papel crítico en la recombinación V(D)J. La activación de la vía de señalización activada por la IL-7 favorece la

sobrevida, proliferación, diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas, incluidos los linfocitos T y B. Por otro lado, el CD127 muestra una correlación inversa con FOXP3, lo que sugiere la represión de CD127 por FOXP3 en las células reguladoras.

Mediadores solubles

- **TNF.** Es secretado por varios tipos de células, por ejemplo las epiteliales, los macrófagos, los linfocitos T y las células del músculo liso de la vía aérea. Este factor posee efecto citotóxico, induce la secreción de otras citocinas, es responsable de la pérdida de peso en la inflamación crónica, y es quimioatrayente de monocitos y neutrófilos.
- **IL-2.** Esta citocina juega un rol central en la proliferación de las células T; regula la respuesta inmune, interviene en la reacción inflamatoria estimulando la síntesis de interferón, induce la liberación de la IL-1 y el TNF. Esta citocina actúa sobre las mismas células que la producen o sobre células adyacentes lo que hace referencia a su función como factor de crecimiento y supervivencia autócrino y parácrino, respectivamente.
- **IL-4.** Es producida por las células Th2 activadas, las cebadas y las NK. Las células blanco de esta citocina son las células B, los macrófagos y las cebadas. La IL-4 tiene una amplia variedad de funciones, sin embargo una de las principales consiste en coestimular la activación de las células B, y la posterior estimulación de la proliferación y diferenciación hacia distintos tipos de anticuerpos. Otra de sus funciones

es inducir la diferenciación hacia células Th2 y la sobreexpresión del MHC II en las células B y los macrófagos.

- **IL-10.** Citocina producida principalmente por un los linfocitos CD4⁺ (Th2 y Treg). Es una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir importantes funciones de las células efectoras. Así, se ha descrito que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos y por células T activadas a través de distintos estímulos. Se han propuesto varios mecanismos por los cuales la IL-10 inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias. Uno de los más estudiados es la inhibición de la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B por parte de la IL-10 en los monocitos y células T, por medio de un proceso donde intervienen segundos mensajeros del tipo de radicales libres de oxígeno. Esto tiene como resultado una reducción de la síntesis de interleucinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y quimiotácticos de células del sistema inmunológico.
- **IFN- γ .** Es una citocina que coordina una serie de programas celulares a través de la regulación transcripcional de ciertos genes, especialmente los relacionados con la respuesta de macrófagos a la infección. El IFN- γ aumenta la expresión de genes relacionados con el reconocimiento de patógenos, el procesamiento y la presentación de antígenos, la respuesta antiviral, la respuesta antiproliferativa con acciones sobre la apoptosis, la activación de efectores antimicrobianos, la inmunomodulación y el tráfico de leucocitos. Es producido por linfocitos CD4⁺ de tipo Th1, linfocitos CD8⁺ y células NK, y existen evidencias de

que también las células B, las NKT y las APC son capaces de producirlo. La producción de IFN- γ es controlada por citocinas secretadas por APC, especialmente por la IL-12 y la IL-18.

- **IL-6.** Es una glucoproteína secretada por los macrófagos, células T, endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF. Es un pirógeno endógeno que estimula en la hipófisis la producción de la hormona adrenocorticotropa. Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, células plasmáticas, modula la hematopoyesis y es la responsable, junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, en especial fibrinógeno.
- **IL-17.** Existen seis miembros de la familia de citocinas IL-17: A, B, C, D, E (IL-25) y F. Las más estudiadas hasta el momento son las IL-17A y la IL-17F, secretadas por las células Th17. Estas dos citocinas son las que muestran mayor homología en la secuencia génica, y actúan como mediadores proinflamatorios, con sutiles diferencias dependiendo del sitio y el tipo de inflamación. Se ha distinguido la participación de la IL-17A y la IL-17F en procesos inflamatorios provocados por bacterias, en enfermedades crónicas y autoinmunes. Las IL-17 A y F promueven la generación de citocinas (IL-6) y quimiocinas (CXCL1, CCL2, CCL7, CCL20) inflamatorias, lo que resulta en la atracción de neutrófilos y macrófagos al sitio de daño. El receptor de dichas citocinas está ampliamente expresado en células no hematopoyéticas, por ejemplo, en

los fibroblastos y las células epiteliales, y en células de la inmunidad innata, como los macrófagos y los neutrófilos.

Quimiocinas

- **IL-8.** Su síntesis se realiza en fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos, y células dendríticas. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos. amplifica la respuesta inflamatoria local. Estimula la angiogénesis.
- **CCL2 (MCP-1).** Activa el CCR2 en monocitos y células T. Los niveles de CCL2 aumentan en el esputo, BAL y los pulmones de pacientes con EPOC. Es un potente quimioatrayente de monocitos, y en consecuencia, promueve la acumulación de macrófagos en los pulmones de los pacientes con EPOC.
- **CCL3 (MIP1 α).** Proteína capaz de unirse a los receptores CCR1, CCR4 y CCR5. Participa en el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares.
- **LTB4.** El leucotrieno B4 es producido por los leucocitos en respuesta a mediadores inflamatorios, y tiene la capacidad de inducir la adhesión y activación de los leucocitos en el endotelio, permitiendo la unión y cruce de éstos al tejido. En los neutrófilos induce la formación de las ROS y la liberación de enzimas lisosomales.
- **CXCL10.** La proteína inducida por interferón 10 (IP-10, las siglas en inglés de *interferon-inducible protein-10*) es una quimiocina que se une

al receptor CXCR3, provocando la estimulación de monocitos y NK, la migración de linfocitos T, y modulación de la expresión de las moléculas de adhesión.

Factores de crecimiento

- **Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, las siglas en inglés de *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)**. Participa en la diferenciación y supervivencia de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. El GM-CSF es secretado primordialmente por los macrófagos, las células epiteliales y los linfocitos T en respuesta a estímulos inflamatorios. En las vías aéreas, el GM-CSF es liberado por los MA de los pacientes con EPOC, y es probable que sea un factor importante para la supervivencia de neutrófilos y macrófagos. Se han encontrado altas concentraciones de GM-CSF en el BAL de pacientes con EPOC, particularmente durante las exacerbaciones.
- **Factor de crecimiento transformante β (TGF- β , las siglas en inglés de *transforming growth factor beta*)**. Este factor de crecimiento es induce la proliferación de fibroblastos y las células del músculo liso de las vías aéreas, y participa en la reparación del epitelio. Es producido a partir de un precursor latente a través de estrés oxidativo y varias proteasas. Por otro lado, el TGF- β tiene propiedades inmunorreguladoras que son mediadas por las células Treg, teniendo un efecto supresor de las células Th1, Th2 y Th17. Se ha observado una

expresión incrementada de TGF- β por parte de las células epiteliales y macrófagos de la vía aérea pequeña de pacientes con EPOC.

- **Factor de crecimiento epidérmico (EGF, las siglas en inglés de *epidermal growth factor*)**. EGF tiene capacidad mitogénica sobre una amplia variedad de células epiteliales, hepatocitos y fibroblastos. Esta actividad es importante en la cicatrización de heridas, situación en la que los macrófagos, los queratinocitos y otras células inflamatorias que migran a la zona dañada, y segregan EGF, que se distribuye ampliamente en secreciones tisulares y fluidos. Este factor juega un papel crítico en la regulación de la secreción de moco en la EPOC.

Referencias

1. Pérez-Flores V, Guardo AC, Rossi NE, et al. El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad. *Inmunología*. 2006; 25(1): 50-56.
2. Feldmann JJOM, ed. Cytokine reference a compendium of cytokines and other mediators of host defense. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2001.
3. Cotran; Kumar, Collins. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: W.B Saunders Company.
4. Genecards, the human gene compendium. Disponible en: <http://www.genecards.org/> 16/04/15.
5. Barnes PJ. The Cytokine Network in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J of Resp Cell and Mol Biol*. 2009; 41(6): 631-638.

ANEXO II. Detalles del citómetro de flujo (FACS Aria I)

1. Fabricante del instrumento

BD Biosciences, San Jose, CA (<http://www.bdbiosciences.com/home>)

1.2. Modelo del instrumento

BD Custom FACSAria™ Flow Cytometer, No de serie: FN7800079.

Especificaciones técnicas en: <http://www.bdbiosciences.com/pdfs/whitePapers/23-8385-00.pdf>

1.3. Configuración del instrumento y ajustes

1.3.1. Célula en flujo y fluidos: El instrumento no ha sido alterado; alineamiento fijo de la celda por donde pasa la célula en flujo.

1.3.2. Light Sources: el instrumento no ha sido alterado; configuración para 2 laser:

- 488-nm Coherent® Sapphire™ solid state laser; 13-20 mW
- 633-nm JDS Uniphase™ HeNe air-cooled laser; 10-20 mW

1.3.3. Configuración de los elementos de excitación óptica: el instrumento no ha sido alterado.

1.3.4. Filtros ópticos: Ver **cuadro 1**.

1.3.5. Detectores ópticos: el instrumento no ha sido alterado. Ver **cuadro 1**.

1.3.6. Vías ópticas: El instrumento no ha sido alterado. El arreglo de los detectores consiste en un octágono (laser de 488 nm) y un triángulo. Los PMT se encuentran ordenados de la siguiente manera:

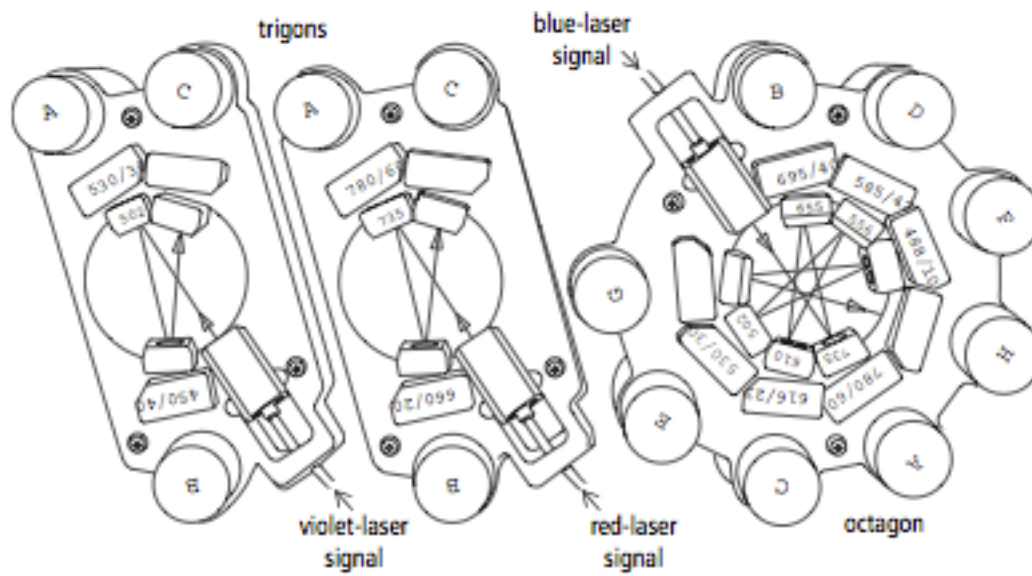


Figura 1. Diagrama de la configuración óptica

Cuadro 1. Detalles de la configuración óptica

LASER	FLUOROCHROME	PMT	LP MIRROR	BP FILTER
	FSC	diode	none	none
488 nm	SSC	F	none	488/10
	FITC	E	502	530/30
	PE	D	556	576/26
	PE-Texas Red	C	595	610/20
	PerCP	B	655	675/20
	PE-CY7	A	735	780/60
633 nm	APC	B	none	660/20

1.4. Otros detalles importantes del instrumento

BD FACSAria User's Guide: http://ncxt.lbl.gov/files/lab/BD_Aria_manual.pdf

BD FACSDiva Software Reference Manual:

<http://facs.stanford.edu/sff/doc/bdfacsdivasoftwareuserguide.pdf>

CUADRO SUPLEMENTARIO I

Cuadro suplementario I. Frecuencia de las subpoblaciones T CD4⁺ y concentración de las citocinas cuantificadas.

Subpoblaciones T CD4+ (%)	EPOC-BM (n=17)	EPOC-TAB (n=20)	CS (n=20)	p	
Th1 ^a	2.5(2.0-3.7)	2.0 (1.3-2.7)	1.2 (0.8-1.6)	<0.001 [*]	EPOC-BM ≠ EPOC-TAB
Th2 ^a	4.2 (3.6-5.4)	2.5 (1.9-3.2)	1.2 (0.9-1.5)	<0.001 [*]	
Th17 ^a	3.2 (2.9-3.9)	11.0 (6.7-13.2)	0.9 (0.7-1.2)	<0.001 [*]	
Treg ^a	10.0 (8.3-11.6)	10.8 (8.6-13.8)	7.6 (6.5-8.9)	<0.001 [*]	
Citocinas (pg/mL)					
IL-4 ^a	83.2 (50.1-104.0)	18.9 (3.1 -48.4)	3.1 (3.1-3.9)	<0.001 [*]	Aumentadas en EPOC
IL-6 ^a	2.8 (2.8-2.8)	5.4 (2.8-28.8)	2.8 (2.8-2.8)	0.01 [*]	
IL-8 ^a	33.9 (27.3 - 50.7)	45.5 (21.7-66.2)	2.6 (2.6-3.1)	<0.001 [*]	
IFN-γ ^a	6.1(2.9-17.1)	3.7(2.9-6.9)	2.9(2.9-3.0)	0.003 [*]	Sin diferencias entre grupos
TNF ^a	35.9(21.5-56.2)	30.3(19.7-38.5)	3.3(3.1-4.0)	<0.001 [*]	
IL-12 ^a	4.8(2.9-5.3)	4.0(2.9-6.5)	2.9(2.9-3.0)	0.015 [*]	
IL-17A ^a	3.2 (3.2 - 3.8)	3.2 (3.2-5.5)	3.2(3.2-3.2)	0.547 [*]	Sin diferencias entre grupos
IL-10 ^a	2.1 (2.1-2.1)	2.1 (2.1-2.1)	2.1 (2.1-2.1)	0.524 [*]	
IL-13 ^a	2.3(2.3-2.9)	2.3(2.3-2.3)	2.3(2.3-2.8)	0.805 [*]	
IL-2 ^a	3.1(3.1-3.3)	3.1(3.1-3.8)	3.1(3.1-3.1)	0.765 [*]	

En este cuadro se han agrupado las citocinas de acuerdo a las diferencias que se encuentran entre los distintos grupos. Asimismo, se les asignó un color que caracteriza al tipo de respuesta de ese grupo; por ejemplo, todas las citocinas sombreadas en azul corresponden al perfil de células Th1. Aquéllas que están en blanco, no corresponden a un perfil característico. La IL-8 es la única quimiocina mostrada en este cuadro.

Mediana (rango intercuartílico (25-75)). ^aComparaciones múltiples 2x2 con la prueba de U of Mann-Whitney

*Prueba de Kruskal-Wallis

ARTÍCULO ORIGINAL

Solleiro-Villavicencio H, Quintana-Carrillo R, Falfan-Valencia R, Vargas-Rojas MI. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Induced by Exposure to Biomass Smoke is Associated with a Th2 Cytokine Production Profile. *Clinical Immunology*. 2015; 161: 150-155.



Chronic obstructive pulmonary disease induced by exposure to biomass smoke is associated with a Th2 cytokine production profile



Helena Solleiro-Villavicencio ^a, Roger Quintana-Carrillo ^b,
Ramcés Falfán-Valencia ^c, María Inés Vargas-Rojas ^{a,d,*}

^a Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^b Departamento de Investigación sobre Tabaco, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico

^c Laboratorio de HLA, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

^d Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2015

Received in revised form 18 July 2015

accepted with revision 21 July 2015

Available online 26 July 2015

Keywords:

COPD

Cigarette smoke

Biomass smoke

Cytokines

T helper cells

ABSTRACT

Smoking and exposure to biomass smoke induce the release of pro-inflammatory mediators and the activation of T helper cells. The resulting inflammatory response contributes to the development of COPD. Clinical heterogeneity exists among COPD patients, particularly between patients with disease associated with tobacco smoking (TS-COPD) and those exposed to biomass smoke (BE-COPD). The aim of this study was to identify whether exposure to tobacco and biomass smokes promotes different Th responses that contribute to clinical variability.

The study only included women. The frequency of Th17 cells in patients with TS-COPD was significantly higher than in patients with BE-COPD and healthy controls (HC). In contrast, patients with BE-COPD had higher levels of Th2 cells than TS-COPD and HC. In accordance, IL-4 serum concentration was higher in BE-COPD than in TS-COPD. Our data indicates that the different responses induced by these two irritants may underlie the clinical heterogeneity between TS- and BE-COPD patients.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an inflammatory disease characterized by persistent airflow limitation that results from chronic bronchitis, small airways disease, and/or emphysema. Although smoking is the best-known cause of COPD [1], there are other risk factors such as the exposure to biomass smoke, particularly in developing countries.

According to the PLATINO study [2], 37.5% of the Latin American population over 40 years of age burns biomass for cooking or heating. On the other hand, it has been calculated that about 30% of patients with COPD have had chronic exposure to biomass smoke, and over 88% are women [3]. Although patients with COPD induced by exposure to biomass smoke (BE-COPD) share certain clinical parameters with patients with COPD associated to tobacco smoking (TS-COPD) [4–6], they also exhibit clear differences, for example, milder

obstruction [7] and higher bronchial hyperresponsiveness (BHR) [8]. In high-resolution CT scans [4], BE-COPD patients display severe thickening of the bronchial walls, bronchiectasis, and mild or no emphysema, in contrast to TS-COPD patients who have a significantly higher emphysema index with milder changes in the airways [9,10]. These differences have suggested the existence of two clearly distinct phenotypes of COPD [11].

Cigarette and biomass smoke share several toxic compounds [12], but these are present in different concentrations in each type of smoke. Both smokes activate epithelial cells and macrophages, and promote the release of several chemotactic factors that attract inflammatory cells into the lungs, such as macrophages, neutrophils and T lymphocytes [13,14]. COPD patients display an activation of adaptive immunity, as a result of the sustained innate immune response [15]. The activation mechanism may involve the migration of dendritic cells from the epithelium to the local lymph nodes, and further antigenic presentation to T cells, resulting in the proliferation of CD4⁺ effector and CD8⁺ cytotoxic cells [14,16].

Several groups have proposed that the alveolar tissue destruction and chronic inflammation share features with autoimmune disorders, implicating T cells as central characters in the pathogenesis and chronicity of the disease [17–21]. In this sense, it has been suggested that Th17 cells play a critical role in the development of emphysema and mucus production in the TS-COPD, as a predominance of these cells in the

Abbreviations: BHR, bronchial hyperresponsiveness; BE-COPD, COPD induced by exposure to biomass smoke; HC, healthy controls; Th, T helper cells; TS-COPD, COPD associated to tobacco smoking; Treg, T regulatory cells.

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, 14080 DF, México.

E-mail addresses: helenasolleiro@gmail.com (H. Solleiro-Villavicencio), h.quintanacarrillo@yahoo.com.mx (R. Quintana-Carrillo), dcb_rfalfan@hotmail.com (R. Falfán-Valencia), manecbba@yahoo.com (M.I. Vargas-Rojas).

peripheral blood of TS-COPD patients has been observed, and the Th17 increase positively correlates with the airflow limitation [22].

Therefore, it is conceivable that the clinical and functional differences in both types of COPD may be explained, at least partially, by differences in the inflammatory profile and polarization of the CD4⁺ T cells. In order to test this hypothesis, we compared the CD4⁺ T cell subsets and cytokine concentrations between patients with BE-COPD and patients with TS-COPD.

2. Methods

2.1. Setting

The study was performed at the COPD clinic of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) in Mexico City, Mexico. Mexico City's mean altitude is 2240 m above sea level; mean PaO₂ and PaCO₂ values in young subjects are about 66 to 72 and 28 to 32 mm Hg, respectively [23].

2.2. COPD diagnoses and risk factors

We included all patients with COPD according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD [24]. Risk factors for COPD were determined (exposure to biomass or tobacco smoke) during a clinical interview, and a standardized Spanish version of the ATS questionnaire with the addition of some questions referring to cooking fuels was applied. Biomass exposure was considered a significant and possible risk factor for COPD when patients had cooked with a biomass stove for a period of at least 6 months. Cumulative exposure was expressed as hour/year (h/yr), which is the product of the number of years cooking with wood stoves multiplied by the average number of hours spent daily in the kitchen [25].

Cumulative smoking was expressed as pack/year, which is the daily average number of smoked cigarettes per day multiplied by the number of smoking years and divided by 20 [26].

2.3. Assessment

At baseline, all patients underwent physical examination, routine laboratory studies including: spirometry, chest X-ray, electrocardiogram, arterial blood gases, a 6-min walk test (6 MWT), BODE index for survival prediction in COPD, and quality of life by answering St. George's and the Chronic Respiratory Questionnaire (CRQ) translated into Spanish.

2.4. Subjects

Thirty-seven women were recruited. Patients with history of exacerbations in the prior 6 weeks were excluded from the study. Seventeen subjects were classified as BE-COPD because their exposure index was ≥ 100 h/day and had no smoking record. Twenty patients were TS-COPD as they had a smoking index of ≥ 10 pack/year, and were never exposed to biomass smoke. Twenty women were included as healthy controls (HC); they had no history of biomass smoke exposure, they had never smoked, and had normal lung function. All of the participants signed an informed consent approved by the Bioethical Committee of the Institute (protocol B26-12), and a peripheral blood sample was taken.

2.5. Blood processing

Peripheral blood mononuclear cells were isolated through the Ficoll-Hypaque protocol [27]. Cell viability was checked by the trypan blue exclusion test, finding at least 98% viable cells. An extracellular staining was performed using the antibodies APC anti-CD3, APC-Cy7

anti-CD4, FITC anti-CD127 (only for the Treg cells tube). Samples were incubated for 20 min at 4 °C in the dark, then they were washed two times using PBS. Intracellular staining [28] was performed using the Cytofix/Cytoperm Kit (BD, Biosciences). We used PE anti-IFN- γ , PE anti-IL-4 and PE anti-IL-17A to characterize the T helper subsets: Th1, Th2 and Th17, respectively. To identify Treg cells (CD3⁺ CD4⁺ CD127^{lo} FOXP3⁺) we made an intranuclear staining with PE anti-FOXP3, and used the FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (Biolegend) [29], following the instructions of the manufacturer. Cells were resuspended in 0.3 mL of 3% paraformaldehyde solution for further acquisition.

2.6. Cytometry studies

Stained samples were evaluated with a FACSria I (BD, Biosciences) cytometer. Acquisition was controlled by the DiVa software (BD, Biosciences). Collected data were exported to FlowJo software for analysis (Treestar, Ashland, Ore). Fifty thousand events were acquired for each analyzed tube.

To confirm the specificity of the antibody binding, we used isotype controls. On the other hand, to set the gates, fluorescence minus one controls were used. To present the data we used cell frequency, following the gating strategy shown in Fig. 1.

2.7. Concentration of serum cytokines

Serum samples were isolated and stored at -30 °C; these were thawed and used for the cytokine quantification through the BioPlex® system (LUMINEX, BioRad) using a commercial kit for the quantification of 26 analytes [30] (Millipore). Standard curves were built with pre-mixed standards included in the kits. Median fluorescence of the samples was interpolated using the five parameter logistic fit method embedded into the software Bioplex Manager v. 5.0 (BIORAD Hercules CA, USA).

2.8. Statistical analyses

We performed all statistical analyses using a software package (GraphPad Prism version 6.00 for Mac). For normally distributed continuous variables, such as the demographic, an unpaired t test or a one-way ANOVA analysis was performed as appropriate to compare groups, and the data are presented as mean \pm SD. Kruskal–Wallis analysis was used to find differences in groups of continuous variables with a skewed distribution (CD4⁺ T cell frequency and cytokine concentrations); a post-hoc analysis was performed by using the Mann Whitney U test, and the data are presented as median (interquartile range). $p < 0.01$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Subjects

Table 1 shows the clinical and demographic characteristics of the studied subjects. No differences were found in age and BMI among the 3 groups. No differences in aeration (PaCO₂, SaO₂), dyspnea (MMRC) and tolerance to exercise (6 MWT) were found. The subjects from both COPD groups belonged to similar stages of disease severity, as we found no significant differences in their forced expiratory volume in the first second (FEV₁). Survival (BODE index) and FEV₁/forced vital capacity post-bronchodilator (FEV₁/FVC) were significantly higher in women with BE-COPD in comparison to TS-COPD. These differences were expected and are related to the different etiologies of the two groups of COPD patients [11].

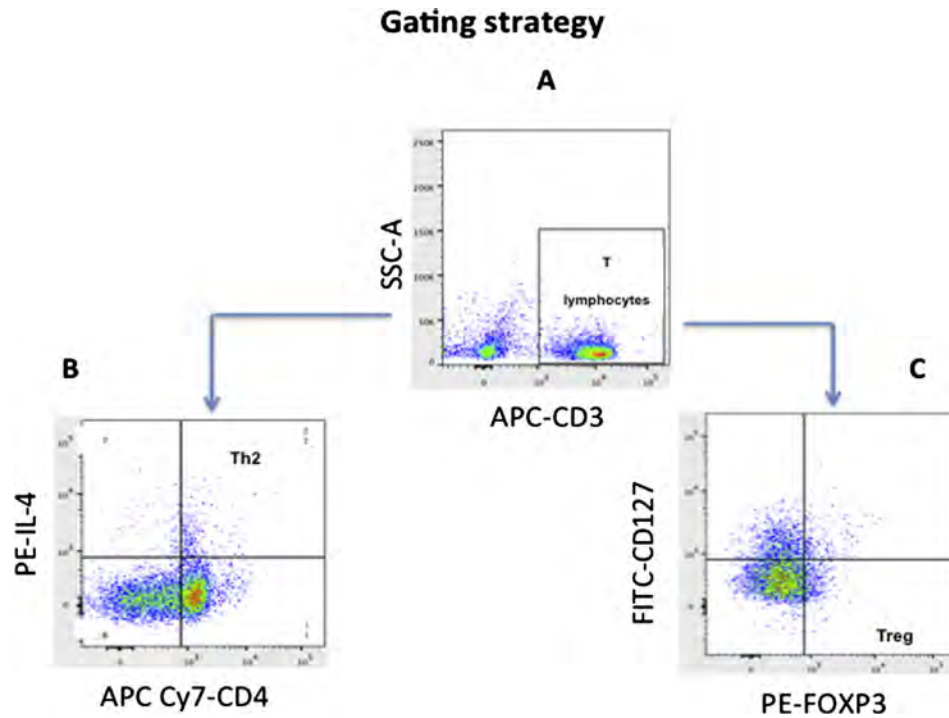


Fig. 1. Flow cytometry gating strategy. After doublet discrimination, lymphoid cells were selected and T cells were identified based on the expression of CD3 (A). IFN γ , IL-4, and IL-17A-producing CD4 T cells were quantified (B). CD4⁺ FOXP3⁺ CD127^{lo} were considered Treg cells (C). Gates were set according to isotype and fluorescence minus one controls.

3.2. CD4⁺ T cells and cytokine concentrations

The frequency of Th1, Th2, and Th17 cells in the peripheral blood was higher in patients than in controls. This probably reflects the presence of an inflammatory lung disease.

Patients with both types of COPD had a two-fold increase in the abundance of Th1 cells when compared to healthy controls. This is in accordance to previous studies that have reported an increased proportion of Th1 cells in the lungs, bronchoalveolar lavage (BAL), and peripheral blood of TS-COPD patients [18,19,22]. There was no difference in the frequency of Th1 cells between TS- and BE-COPD patients and, accordingly, no differences in the concentration of IFN- γ in the sera of

these two groups of patients (data not shown). The high frequency of Th1 cells observed in both disease groups may indicate equivalent immune activation, not affecting the Th2/Th17 skew.

IL-4-producing Th2 cells were also increased in the patients when compared to the controls. However, their abundance was significantly higher in patients with COPD induced by exposure to biomass smoke (Fig. 2). This increase was accompanied by significantly higher concentrations of serum IL-4 in BE-COPD patients than in TS-COPD patients and healthy controls (Fig. 3). This finding is of particular importance because BE-COPD is associated to a number of clinical features, such as bronchial hyperresponsiveness and airway obstruction reminiscent of asthma, a disease in which the Th2 responses are considered a key pathogenic element.

Th17 cells produce cytokines (e.g. IL-17A, IL-17F, IL-22) that exert strong effects on epithelial cells, airway fibroblasts, and smooth muscle cells to induce the production of chemokines that recruit neutrophils [31], which are potent inducers of IL-6 production by bronchial epithelial cells and fibroblasts [32]. Increased numbers of Th17 cells have been observed in the bronchial submucosa, as well as the peripheral blood of stable COPD patients [22,33]. As shown in Fig. 2, we confirmed the increased frequency of Th17 cells in COPD patients. However, our results indicate that the enhanced Th17 response is not a feature present in all COPD patients, but is mainly associated to exposure to tobacco smoke because the increased in the frequency of IL-17-producing cells was modest in patients with COPD associated to BE. In concordance to these results, the IL-17-associated cytokine IL-6 was also increased exclusively in TS-COPD patients (Fig. 3).

Treg cells represent a CD4⁺ T cell subset with immunoregulatory functions. Some studies have shown that TS-COPD patients have fewer Treg cells in the lungs, less messenger RNA (mRNA) for FOXP3, and less IL-10 lung concentration than controls [34]. Other reports have found that BAL CD4⁺CD25^{bright} cells are increased in smokers and patients with COPD compared with healthy people who had never smoked [35], and increased proportions of Treg in the peripheral blood of TS-COPD patients compared with smokers with no COPD and HC [22]. Our results are consistent with the latter because we found a

Table 1
Clinical and demographic characteristics.

	TS-COPD (n = 20)	BE-COPD (n = 17)	HC (n = 20)	p
Age (yrs)	67 \pm 8	70 \pm 8	65 \pm 8	0.171*
TS (pack/yr)	32 \pm 22	-	-	-
BI (h/yr)	-	226 \pm 145	-	-
FEV ₁ pb (% predicted)	40 \pm 21	49 \pm 14	-	0.189**
FVC pb (% predicted)	72 \pm 18	73 \pm 19	-	0.441***
FEV ₁ /FVC pb (% predicted)	42 \pm 14	51 \pm 11	-	0.036**
PaCO ₂ (mm Hg)	29 \pm 6	29 \pm 5	-	0.973***
SaO ₂ (%)	87 \pm 6	89 \pm 5	-	0.256***
Dyspnea (mMRC score)	2.05 \pm 1.22	1.63 \pm 0.81	-	0.225**
BODE index	6 \pm 3	3 \pm 1	-	0.001**
BMI (kg/m ²)	25 \pm 5	29 \pm 4	27 \pm 3	0.086*
6 MWT distance (m)	323 \pm 131	338 \pm 71	-	0.745**

Results are expressed as mean \pm SD.

Abbreviations: a) TI = Tobacco Index; b) BI = Biomass Index; c) FEV₁ pb = post bronchodilator Forced Expiratory Volume 1 second d) FVC pb = Forced Vital Capacity post-bronchodilator; e) PaCO₂ = partial pressure of carbon dioxide; f) SaO₂ = saturation level of oxygen; g) mMRC score = modified Medical Research Council score; BODE index = Body-Mass Index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise; BMI = Body Mass Index; f) 6 MWT = 6 minute walk test.

* One way ANOVA comparing differences between the 3 groups.

** Welch approximation.

*** Unpaired t-student test.

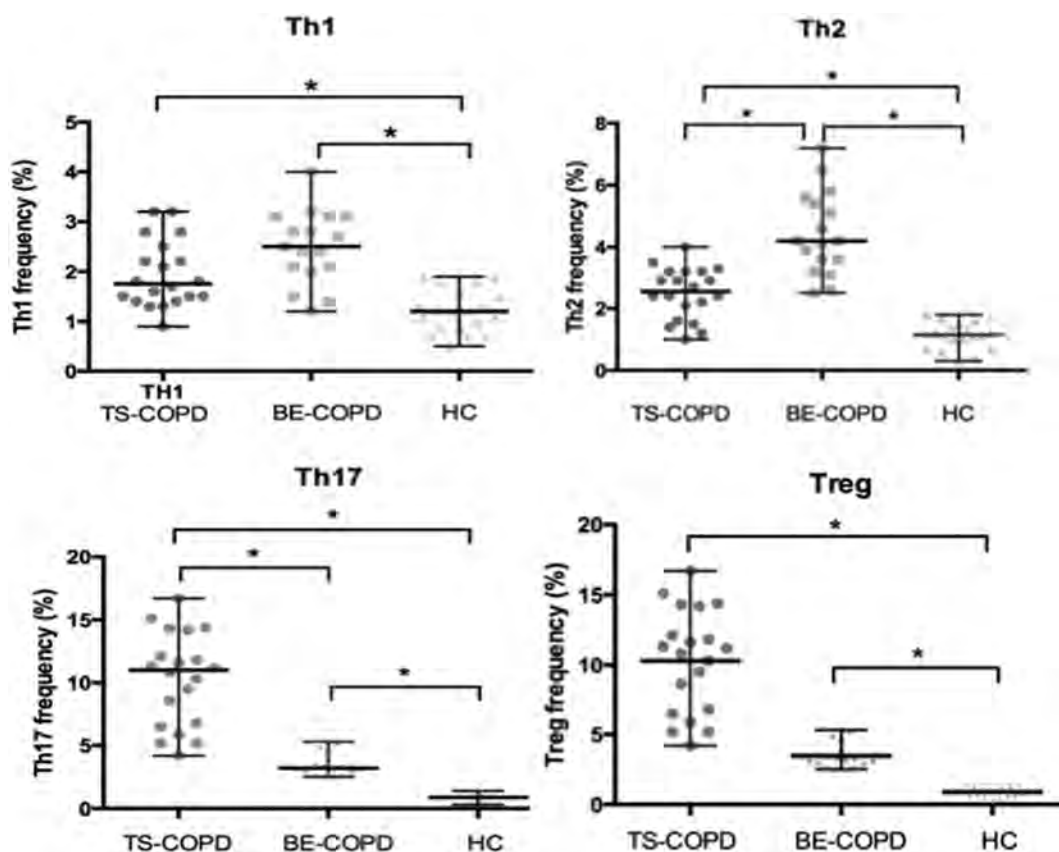


Fig. 2. Frequency of CD4⁺ T cell subpopulations. Th1, Th2, Th17, and Tregs were quantified in patients with tobacco and biomass smoke-induced COPD (TS-COPD and BE-COPD, respectively) and in healthy controls (HC). Each dot represents one patient or control. Median and interquartile ranges are indicated. **p* < 0.01.

modest increase in the frequency of Treg cells in COPD patients when compared to controls, and no differences between the two subsets of COPD patients.

4. Discussion

Here we have studied the frequency of CD4⁺ T subsets in patients with two types of COPD. We have corroborated previous reports that show increased abundance of Th1, Th2, and Th17 cells in patients with COPD, but we have found that the distribution of these functional subsets differs dramatically depending on the cause of the pulmonary disease. Our results offer an explanation of why COPD caused by exposure to different smokes presents different clinical pictures, and indicate that the characteristics of the inflammation triggered by the inciting agent are directly involved in shaping the clinical manifestations of the disease.

Our results show that patients with BE-COPD develop a strong Th2 response, which may underlie some of the clinical features observed in the disease. Similar to asthmatics, patients with BE-COPD have a persistent Th2-type inflammation that may lead to airway hyperresponsiveness, increased mucus production, and airway remodeling [36].

Because BE-COPD occurs mostly in women, we decided to study only female patients. We assume that our findings are applicable to men and women, but sex-related differences in T cell effector differentiation may account for differences in male patients [37]. Even though our sample size was limited, we were able to identify statistically significant differences between the groups.

One caveat of our study is that we only analyzed CD4⁺ T cell populations and cytokine concentrations in the peripheral blood. We believe that our results indicate the effects of tobacco and biomass smoke on CD4 differentiation. However, the absolute frequency of Th2 and Th17

cells in the peripheral blood in patients with an inflammatory disease may be affected by the selective recruitment of effector cells into affected organs.

IL-4 is a cytokine that induces differentiation of naive helper T cells to Th2 cells. Upon activation by IL-4, Th2 cells subsequently produce additional IL-4 [38]. The increased concentration of IL-4 in BE-COPD patients could be a condition developed even before COPD has been installed. This can be explained by the fact that the age of onset of biomass exposure is different to the one of smoking. It is frequent that in rural environments the biomass smoke exposure begins at birth and continues throughout life. On the other hand, biomass smoke exposure has also been associated with acute respiratory infections in children [39]. Our results suggest that an increased Th2 response may alter innate immune mechanisms (e.g. mucus production and characteristics) and pulmonary function (e.g. bronchial obstruction) and, by doing so, predispose patients to infections. The early biomass smoke exposure and repeated respiratory infections may induce remodeling and alter the function of the airway walls, predisposing these subjects to develop a different COPD phenotype (in an adult age) than the TS-COPD patients that began smoking at an older age [4].

IL-4 induces B-cell class switching to IgE [39]; the levels of this antibody correlate with asthma severity and bronchial hyperresponsiveness. To understand the consequences of the predominance of a Th2 response, in further studies it would be useful to measure the IgE concentration in the serum of BE-COPD patients.

In addition to cytokines, some kinase family proteins have been described as involved in BE-COPD, such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family [40]. It has been demonstrated that biomass smoke is capable of producing a significant increase of p38 within human small airway epithelial cells (SAEC) [41]. MAPK p38 pathway plays an important role in the regulation of Th17 cell function by increasing the expression of IL-17A [42]. Given this background, the BE-

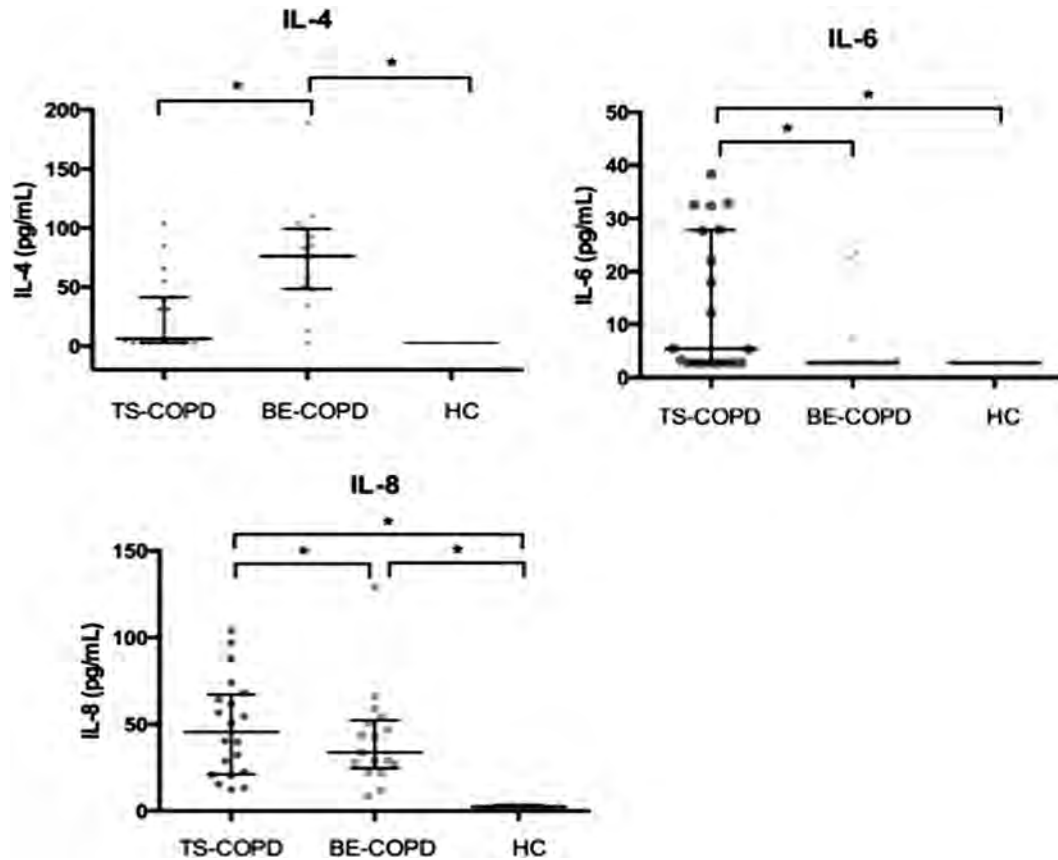


Fig. 3. Cytokine concentrations in sera of patients and controls. IL-4, IL-6, and IL-8 were quantified in sera from patients with tobacco and biomass smoke-induced COPD (TS-COPD and BE-COPD, respectively) and in healthy controls (HC). Each dot represents one patient or control. Median and interquartile ranges are indicated. * $p < 0.01$.

COPD group results show an opposite response to the expected, which could be explained by the plasticity of the Th17 phenotype that allows the conversion from Th17 to Th2 under the right microenvironment conditions, for example an increased concentration of IL-4. The conversion from Th17 to Th2 cells has been demonstrated in an experiment using in vitro and ex vivo-derived Th17 cells (sorted by a IL-17A cytokine secretion assay), in which it was observed that these cells could produce IL-4 upon secondary culture in Th2 conditions, or upon transfer into helminth-infected mice [43].

IL-6 is a powerful pro-inflammatory cytokine that has been implicated in the pathogenesis of inflammatory lung diseases such as COPD and asthma [44]. Elevated serum IL-6 has been shown to predict mortality in COPD patients [45]. IL-6 is induced in the lung by cigarette smoke and is capable of triggering the activation of signaling pathways and mechanisms that result in the increased prevalence of Th17 cells, as illustrated by the very high levels of IL-6 found in the sera of patients with TS-COPD. These kinds of cells produce IL-17 that has an effect on most parenchymal cells including macrophages and dendritic cells. IL-17-mediated signaling induces the production inflammatory mediators such as IL-6. It has also been reported that IL-17 can induce airway epithelial cells to produce mucus and MMP-9 [46], the latter being one of the factors inducing the destruction of lung parenchyma, resulting in the development of emphysema, a clinical entity prevalent in the TS-COPD subjects.

5. Conclusions

The inflammatory response induced by exposure to biomass smoke differs greatly from that caused by tobacco smoking. This phenomenon may underlie the development of different clinical phenotypes

associated to exposure to both agents. Functional studies will allow us to further understand the mechanisms through which biomass and tobacco smokes affect the immune response.

Conflict of interest

The authors report no financial or other conflict of interest relevant to the subject of this article.

Acknowledgments

This article was part of the doctoral thesis of the student Helena Solleiro-Villavicencio who is part of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. We thank to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the PhD Fellowship (279864).

This research was supported by the resource assigned to INER, managed in LXI Legislatures of the Chamber of Deputies, through its Committee on Equality and Gender, for the budgetary allocation for the Care of Using Wood Associated Diseases in 2012.

References

- [1] The Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease: GOLD., Retrieved November 11, 2013(from: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2013_Feb20.pdf2013.
- [2] A.M. Menezes, R. Pérez-Padilla, J.R. Jardim, A. Muiño, et al., PLATINO Team. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American Cities (the PLATINO study): a prevalence study, *Lancet* 366 (2005) 1875–1881.
- [3] A. Ramírez, R.H. Sansores, Consenso Mexicano de EPOC. Panorama epidemiológico e impacto económico actual, *Neumol. Cir. Torax* 66 (Supl 2) (2007) 13–16.

- [4] P.G. Camp, A. Ramírez-Venegas, R.H. Sansores, et al., COPD phenotypes in biomass smoke-versus tobacco smoke-exposed Mexican women, *Eur. Respir. J.* 43 (3) (2014) 725–734.
- [5] R.M. Rivera, M.G. Cosío, H. Ghezzi, et al., Comparison of lung morphology in COPD secondary to cigarette and biomass smoke, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12 (8) (2008) 972–977.
- [6] A. Ramírez-Venegas, R.H. Sansores, R. Pérez-Padilla, et al., Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (4) (2006) 393–397.
- [7] O. Moran-Mendoza, J.R. Pérez-Padilla, M. Salazar-Flores, et al., Wood smoke-associated lung disease: a clinical, functional, radiological and pathological description, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12 (9) (2008) 1092–1098.
- [8] M. González-García, C.A. Torres-Duque, A. Bustos, et al., Bronchial hyperresponsiveness in women with chronic obstructive pulmonary disease related to wood smoke, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 7 (2012) 367–373.
- [9] M. González, S. Páez, C. Jaramillo, et al., Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) por humo de leña en mujeres. [Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) produced by wood smoke in women], *Acta Med. Colomb.* 29 (2004) 17–25.
- [10] M. González, D. Maldonado, J. Pérez, et al., Pseudofisemema en mujeres con EPOC por humo de leña en Bogotá (2600 m) (Pseudophysiological emphysema in women with wood smoke COPD in Bogotá (2600 m)), *Arch. Bronconeumol.* 40 (2004) 31.
- [11] R. Pérez-Padilla, A. Ramírez-Venegas, R. Sansores-Martínez, Clinical characteristics of patients with biomass smoke-associated COPD and chronic bronchitis, *J. COPD F* 1 (1) (2014) 23–32.
- [12] United States Environmental Protection Agency, Indoor Air Pollution: An Introduction for Health Professionals, EPA, US Government Printing Office publication no. 1994-523-217/81322, Washington DC, USA, 1994. (Retrieved August 08, 2014, from: <http://www.epa.gov/iaq/pubs/hpguide.html>).
- [13] K.F. Chung, I.M. Adcock, Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction, *Eur. Respir. J.* 31 (2008) 1334–1356.
- [14] P.J. Barnes, M.G. Cosío, Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease, *PLoS Med.* 1 (1) (2004) e20.
- [15] T.S. Hallstrand, T.L. Hackett, W.A. Altemeier, et al., Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation, *Clin. Immunol.* 151 (1) (2014) 1–15.
- [16] M. Galgani, I. Fabozzi, F. Perna, et al., Imbalance of circulating dendritic cell subsets in chronic obstructive pulmonary disease, *Clin. Immunol.* 137 (1) (2010) 102–110.
- [17] S.H. Lee, S. Goswami, A. Grudo, L.Z. Song, et al., Antielastin autoimmunity in tobacco smoking induced emphysema, *Nat. Med.* 13 (2007) 567e9.
- [18] S. Grumelli, D.B. Corry, L.Z. Song, et al., An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema, *PLoS Med.* 1 (2004) e8.
- [19] G. Horge, J. Nairn, M. Holmes, et al., Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects, *Clin. Exp. Immunol.* 150 (2007) 22e9.
- [20] M.G. Cosío, J. Majó, M.G. Cosío, Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells, *Chest* 121 (2002) (160Se55).
- [21] A.K. Sullivan, P.L. Simonian, M.T. Falta, J.D. Mitchell, G.P. Cosgrove, K.K. Brown, B.L. Kotzin, N.F. Voelkel, A.P. Fontenot, Oligoclonal CD4^b T cells in the lung of patients with severe emphysema, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 590e6.
- [22] M.I. Vargas-Rojas, A. Ramírez-Venegas, L. Limón-Camacho, et al., Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Respir. Med.* 105 (11) (2011) 1648–1654.
- [23] R. Pérez-Padilla, Population distribution residing at different altitudes: implications for hypoxemia, *Arch. Med. Res.* 33 (2002) 162–166.
- [24] B.R. Celli, W. Mac Nee, A. Agusti, et al., Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper, *Eur. Respir. J.* 23 (2004) 932–946.
- [25] A. Ramírez-Venegas, R.H. Sansores, R. Pérez-Padilla, et al., Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2006) 393–397.
- [26] National Cancer Institute definition of pack year. Retrieved December 17 2014, from: <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=306510>.
- [27] Isolation of mononuclear cells. Retrieved August 08, 2014, from: http://www.thgeyer.dk/fileadmin/user_assets/documents/GE_Healthcare/Isolation_of_mononuclear_cells.pdf.
- [28] Immunofluorescent Staining of Intracellular Cytokines for Flow Cytometric Analysis. Retrieved August 08, 2014, from: http://www.bdbiosciences.com/resources/protocols/cytokines_fca.jsp.
- [29] FOXP3 intracellular staining protocol. Retrieved October 05, 2014, from: http://www.biolegend.com/media_assets/support_protocol/BioLegend_FOXP3_Intracellular_Staining_Protocol.pdf.
- [30] Milliplex human cytokine PREMIXED 26 Plex immunoassay kit. Retrieved October 05, 2014, from: [http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/506688139fe4c9a98525742c007755db/\\$FILE/MPXHCYTO-60K.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/506688139fe4c9a98525742c007755db/$FILE/MPXHCYTO-60K.pdf).
- [31] C.E. Jones, K. Chan, Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (2002) 748e53.
- [32] S. Molet, Q. Hamid, F. Davoine, et al., IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines, *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (2001) 430e8.
- [33] A. Di Stefano, G. Caramori, I. Gnemmi, et al., T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients, *Clin. Exp. Immunol.* 157 (2) (2009) 316–324.
- [34] L.J. Smyth, C. Starkey, J. Vestbo, D. Singh, CD4-regulatory cells in COPD patients, *Chest* 132 (2007) 156–163.
- [35] E. Roos-Engstrand, J. Pourazar, A.F. Behndig, A. Bucht, Expansion of CD4⁺CD25⁺ helper T cells without regulatory function in smoking and COPD, *Respir. Res.* 12 (2011) 74.
- [36] Y. Sumi, Q. Hmaid, Air remodeling in asthma, *Allergol. Int.* 56 (2007) 341–348.
- [37] L.M. Pennell, C.L. Galligan, E.N. Fish, Sex affects immunity, *J. Autoimmun.* 38 (2–3) (2012) J282–J291.
- [38] C.L. Sokol, G.M. Barton, A.G. Farr, et al., A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses, *Nat. Immunol.* 9 (3) (2008) 310–318.
- [39] K.R. Smith, J.M. Samet, I. Romieu, et al., Indoor air pollution in developing countries and acute lower respiratory infections in children, *Thorax* 55 (2000) 518–532.
- [40] G.L. Johnson, R. Lapadat, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science* 298 (5600) (2002) 1911–1912.
- [41] D. Mehra, P.M. Geraghty, A.A. Hardigan, et al., A comparison of the inflammatory and proteolytic effects of dung biomass and cigarette smoke exposure in the lung, *PLoS ONE* 7 (12) (2012) e52889.
- [42] R. Noubade, D.N. Kremontsov, R. Del Rio, et al., Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis, *Blood* 118 (12) (2011) 3290–3300.
- [43] M. Panzer, S. Sitte, S. Wirth, et al., Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection, *J. Immunol.* 188 (2012) 615–623.
- [44] S. M. Rincon, C.G. Irvin, Role of IL-6 in Asthma and other inflammatory pulmonary diseases, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (9) (2012) 1281–1290.
- [45] Y. Chen, B.R. Celli, N. Locantore, J. Yates, et al., Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185 (2012) 1065–1072.
- [46] P. Thai, Y.H. Zhao, et al., Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17036–17043.