

Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Volumen
Volume 15

Número
Number 4

Octubre-Diciembre
October-December 2002

Artículo:

La quimiocina regulada y activada del
timo (TARC) se libera en las vías
aéreas de pacientes asmáticos.

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

**Otras secciones de
este sitio:**

- 👉 **Índice de este número**
- 👉 **Más revistas**
- 👉 **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

- 👉 ***Contents of this number***
- 👉 ***More journals***
- 👉 ***Search***



Medigraphic.com

La quimiocina regulada y activada del timo (TARC) se libera en las vías aéreas de pacientes asmáticos

Diana Lezcano Meza*
Ma. Cristina Negrete García*
Aurea Rosalía Montes Vizuet*
Elba Lucía Valencia Maqueda*
Cecilia E. García-Sancho Figueroa†
Francisco Franco Marina†
Luis Manuel Terán Juárez*

Palabras clave: Quimiocina regulada y activa del timo (TARC), asma, lavado bronquioalveolar (LBA).
Key words: TARC (thymus- and activation-regulated chemokine), asthma, bronchioalveolar lavage (BAL).

RESUMEN

Introducción: la presencia de linfocitos Th2 en las vías respiratorias de pacientes con asma bronquial es un hecho bien conocido. La quimiocina regulada y activada del timo es un quimioatrayente muy potente para linfocitos Th2, y tiene una importante participación en enfermedades inflamatorias.

Objetivo: Investigar la liberación de la quimiocina regulada y activada del timo en el líquido de lavado bronquioalveolar de pacientes asmáticos.

Material y métodos: Se realizó lavado bronquioalveolar a 17 asmáticos y 13 controles. Se efectuó

cuenta diferencial y medición de la quimiocina regulada y activada del timo por el método de ELISA. **Resultados:** la cuenta diferencial en lavado bronquioalveolar mostró que el número de linfocitos, eosinófilos y células epiteliales encontrados están significativamente más elevados en sujetos asmáticos, comparado con los controles (6.1 vs 1.0 linfocitos $\times 10^3/\text{mL}$, 1.4 vs 0.24 eosinófilos $\times 10^3/\text{mL}$ y 1.3 vs 0.02 células epiteliales $\times 10^3/\text{mL}$, respectivamente) La determinación de la quimiocina regulada y activada del timo demostró que los niveles de esta citocina en lavado bronquioalveolar fueron significativamente más elevados en sujetos asmáticos, comparada con los sujetos control (mediana 313 vs 35pg/mL) Observamos que existe correlación entre los niveles de la quimiocina regulada y activada del timo en líquido de lavado bronquioalveolar y la hiperreactividad bronquial (PC_{20} a metacolina) ($r=-0.7$, $p=0.001$) así como entre la quimiocina regulada y activada del timo y el número de linfocitos encontrados en el líquido del lavado bronquioalveolar ($r=0.47$, $p<0.001$).

Discusión: este estudio demuestra que en los pacientes asmáticos se produce un incremento en la liberación de la quimiocina regulada y activada del timo en el líquido de lavado bronquioalveolar, y ni-

* Departamento de Alergia e Inmunología Clínica, INER.

† Departamento de Investigación Sociomédica, INER.

Correspondencia:

Dr. Luis Manuel Terán Juárez. Departamento de Alergia e Inmunología Clínica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Colonia Sección XVI, Calzada de Tlalpan No. 4502, México, DF, 14080.

Trabajo recibido: 03-XII-2002; Aceptado: 19-XII-2002.

veles de esta citocina se asocian con hiperreactividad bronquial. Esto sugiere que la quimiocina regulada y activada del timo podría desempeñar una función muy importante en la patogénesis del asma.

ABSTRACT

Introduction: The presence of Th2 lymphocytes in airways of bronchial asthma patients is a well-recognized feature. Thymus- and activation- regulated chemokine (TARC) is a potent chemoattractant for Th2 lymphocytes and plays an important role in inflammatory diseases.

Objective: TARC release in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from asthmatic patients was investigated.

Material and methods: BAL was performed to 17 asthmatics and 13 controls.

Results: Differential count and TARC measurement by ELISA was performed. Differential cell counts in BAL fluid showed that numbers of lymphocytes, eosinophils and epithelial cells were significantly elevated in asthmatic subjects compared with controls (6.1 vs 1.0 lymphocytes $\times 10^3/\text{mL}$, 1.4 vs 0.24 eosinophils $\times 10^3/\text{mL}$ and 1.3 vs 0.02 epithelial cells $\times 10^3/\text{mL}$, respectively). Measurements of TARC by ELISA showed that levels of this cytokine were significantly elevated in BAL fluid from asthmatics compared with normal subjects (median 313 vs 35 pg/mL). There was a significant correlation between TARC levels in BAL fluid and bronchial hyperreactivity (PC_{20} response to metacholine) ($r = -0.7$, $p < 0.001$) and between TARC levels and lymphocytes numbers in BAL fluid ($r = 0.47$, $p = 0.001$).

Discussion: These findings suggest that TARC may play an important role in the pathogenesis of asthma.

INTRODUCCIÓN

El asma bronquial es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por inflamación de las vías aéreas con un alto grado de infiltración de eosinófilos y células T activadas, donde primordialmente a los linfocitos CD4^+ se les atribuye una función muy importante en la patofisiología de dicha enfermedad¹. Varios estudios han demostrado una gran acumulación de linfocitos tipo Th2 en las mucosas de las vías aéreas con una alta capacidad de producir diferentes citocinas, tal es el caso de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13^{2,3} las cuales inducen la producción de IgE y activación de eosinófilos. Algunas evidencias recientes sugieren que el reclutamiento de células T a los sitios de inflamación es un proceso de varios pasos que involucra interacciones endotelio-leucocitos mediadas por diferentes moléculas de adhesión y la generación local de quimiocinas que dirigen la migración del compartimiento vascular al área inflamada⁴.

El reclutamiento de linfocitos es regulado por las quimiocinas, que son una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular que tienen la capacidad de inducir la qui-

miotaxis de leucocitos, regulando así la acumulación de ciertos tipos celulares durante la respuesta inflamatoria. La familia de las quimiocinas se divide en cuatro grupos de acuerdo a la posición de uno o dos de los residuos de cisteína localizados en el extremo amino terminal de la proteína (CXCL, CCL, CL y CX3CL)⁵. La quimiocina regulada y activada del timo (TARC, por sus siglas en inglés) es miembro de la quimiocina CCL la cual tiene potente actividad quimiotáctica para linfocitos. Esta citocina fue descrita por Imai y asociados por clonación del gene D3A de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina⁶.

TARC es un ligando específico para el receptor CCR4, siendo este último selectivo de células tipo Th2. Estudios hechos *in vivo* han demostrado que TARC participa en el proceso alérgico. Por ejemplo, un grupo de ratones sensibilizados con un anticuerpo anti-TARC no sólo fueron capaces de prevenir la eosinofilia en las vías aéreas inducida por ovalbumina, sino que también se indujo un decremento tanto de linfocitos CD4^+ infiltrantes como de las citocinas IL-4 e IL-13⁷. Además, pacientes asmáticos expuestos a reto alérgico liberan concentraciones elevadas de esta citocina⁸. Por inmunohistoquímica se ha demostrado una alta inmunorreactividad de TARC localizado en el epitelio bronquial⁹. Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado en forma sistemática TARC en lavados bronquioalveolares (LBA) de sujetos asmáticos estables y su posible correlación con la severidad de dicha enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar los niveles de TARC en LBA de pacientes con asma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

En este estudio participaron 17 pacientes asmáticos asintomáticos tratados con salbutamol inhalado y 13 sujetos sanos como grupo control. Las características clínicas de ambos grupos están resumidas en la Tabla I.

La atopía en los pacientes fue confirmada por pruebas cutáneas con una serie de alérgenos comunes entre los que se incluyen *Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*, polen, perro, gato, pasto (Alk Abelló, EU).

Ninguno de los pacientes recibió tratamiento con corticoesteroides, cromoglicato de sodio o neocromil sódico por lo menos dos meses antes de la broncoscopia.

Este protocolo fue aceptado por el Comité Científico y Ético del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y todos los participantes firmaron carta de consentimiento para ser incluidos en él.

Broncoscopia

Fue realizada de acuerdo con los lineamientos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos¹⁰ de América. Bajo anestesia local de las vías aéreas superiores (lignocaine) el broncoscopio (*Olimpus* IT20D) se introdujo por nariz o boca hasta el lóbulo medio. El LBA fue realizado con 150mL de solución salina 0.9%. Los suje-

tos fueron observados por tres horas posteriores al procedimiento y se les aplicó salbutamol cuando fue necesario.

El líquido del LBA se centrifugó a 400g por 15 min a 4°C, el sobrenadante se almacenó a -70°C en alícuotas hasta su uso para la determinación de TARC por ELISA. Las células recuperadas se contaron y se sometieron a citocentrifugación para cuenta diferencial con Diff-Quick (Dade Behring, EU).

Cuantificación de TARC

La cuantificación de TARC se realizó por duplicado en las muestras de LBA por la técnica de ELISA empleando el método de doble anticuerpo el cual consiste, brevemente, en cubrir cada pozo de la placa de ELISA con 100µL de anticuerpo monoclonal anti-TARC (R&D Systems) (4µg/mL en amortiguador de carbonatos pH 9.6) durante toda la noche a 4°C. Se removió el anticuerpo no adherido con cuatro lavados de PBS-Tween 20 al 0.05%. Después de lavar y bloquear se adicionaron 100µL de muestra (LBA) o estándares (TARC humana recombinante R&D). Después del lavado, se agregaron 100µL de anticuerpo anti-TARC biotinilado (200µg/mL) a cada pozo, dos horas después se adicionaron 100µL del conjugado estreptavidina-peroxidasa por 30 min. Subsecuentemente se lavó y agregó sustrato (TMB, Sigma) Después de 15 min de incubación, la reacción se detuvo con 50µL de H₂SO₄ 2M y la absorbancia se leyó a 450nm en lector de ELISA (BioRad) Las concentraciones de TARC en las muestras se calcularon de la curva estándar. El límite de detección fue de 10pg/mL y el coeficiente de variación fue del 5%.

Análisis estadístico

El análisis del estudio se realizó en el paquete estadístico STATA versión 7.0. Se estimaron medidas de resumen y prueba de T de Student o de Kruskal-Wallis para variables continuas y prueba de Chi cuadrada o Exacta de Fisher para variables categóricas.

RESULTADOS

Hallazgos clínicos

Se estudiaron 17 pacientes asmáticos y 13 controles sanos. La edad media de los pacientes fue de 35 y de 36

Tabla I. Características clínicas de los sujetos.

	Sexo	Edad (años)	FEV-1 %	PC ₂₀ (mg/mL)
Asmáticos	14 F 3 M	36 (15 - 49)	93.8 (80 - 146)	5.2 (2 - 8.5)
Controles	5 F 8 M	35 (18 - 55)	98.8 (88 - 138)	32

años, respectivamente. Los datos clínicos de los pacientes se muestran en la Tabla I. El volumen espiratorio forzado en el segundo (VEF₁) en asmáticos fue 93.6% (rango 80-146%), mientras que en sujetos sanos fue de 98.8% (88-138%).

LBA y población celular

Se obtuvo el LBA de los 30 sujetos que participaron en el estudio. El volumen de líquido recuperado no fue diferente entre ambos grupos (68 ± 10mL en asmáticos vs 60 ± 12mL en sanos).

La comparación del número de células totales y cuenta diferencial obtenidas en el líquido de LBA de asmáticos y normales mostró que los linfocitos, eosinófilos y células epiteliales están significativamente más elevados en sujetos asmáticos, comparado con los controles ($p < 0.005$, $p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente) (Tabla II).

Medición de TARC en LBA

La determinación de TARC en LBA mostró que la concentración de esta quimiocina es significativamente más elevada en sujetos asmáticos, comparada con los sujetos control (medianas, 313 rango 118-715pg/mL vs 35, rango 15-62pg/mL) $p < 0.001$ (Figura 1).

Se encontró una correlación significativa entre los niveles de TARC en líquido de LBA y la hiperreactividad bronquial de respuesta a la metacolina (PC₂₀) ($r = -0.7$, $p < 0.001$) (Figura 2A), así como entre TARC y el número de linfocitos encontrados en el líquido del LBA ($r = 0.47$, $p < 0.001$) (Figura 2B).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La quimiocina TARC es un quimioatrayente muy potente para linfocitos Th2, y tiene una importante participación

Tabla II. Cuenta total y diferencial de células en lavado bronquioalveolar (x10³/mL).

	Asmáticos	Controles
Macrófagos	20 (7.1 - 60)	20.35 (1.8 - 129)
Linfocitos	*61 (0 - 12.3)	1 (0 - 3.4)
Neutrófilos	5.8 (0 - 15)	2.1 (0 - 10.8)
Eosinófilos	†1.4 (0 - 8)	0.24 (0 - 0.8)
Células epiteliales	§1.3 (0 - 9.2)	0.02 (0 - 0.35)
Células totales	26 (3 - 100)	31 (1.9 - 140)

Los valores son expresados como mediana (rango)

* $p < 0.005$; † $p < 0.001$; § $p < 0.05$.

en enfermedades inflamatorias¹¹. El presente estudio demuestra que TARC se libera en concentraciones elevadas en las vías aéreas de sujetos asmáticos estables. Los niveles de esta citocina en el LBA correlaciona con la severidad del asma, medida por el reto de metacolina (PC_{20}), sugiriendo que TARC participa en la patogénesis de esta enfermedad.

Uno de los primeros estudios que indicaron un incremento en la expresión de TARC en células epiteliales bronquiales de sujetos asmáticos fue el del grupo de Sekiya T y colaboradores en el 2000⁹, aunque ya anteriormente habían surgido evidencias donde se demostraba la participación directa de dichas células como principales productoras de diferentes quimiocinas en la respuesta inflamatoria¹². Sin embargo, nuestro trabajo es el primer estudio que muestra que pacientes asmáticos estables liberan altas concentraciones de TARC en LBA. Cabe destacar que el grupo de Berin y colaboradores⁸, reportó niveles elevados de TARC en LBA, pero ellos lo hicieron en sujetos asmáticos con reto alérgico. Un dato adicional interesante en nuestro estudio es el hallazgo de que las concentraciones de TARC correlacionan con la severidad de la enfermedad (respuesta a metacolina PC_{20}) lo que sugiere que esta quimiocina puede estar involucrada en la patogénesis de la hiperreactividad bronquial. Existen estudios recientes^{13,14} donde reportan los niveles incrementados de TARC en muestras de suero, plasma y esputo de pacientes tanto asmáticos como con rinitis alérgica lo que, de acuerdo con los resultados de nuestros estudios, no sólo se desencadena una respuesta local sino también sistémica. Todos estos datos en conjunto sugieren que TARC es un mediador importante de la respuesta asmática.

El receptor de TARC es CCR4 el cual se ha encontrado preferentemente expresado en células tipo Th2, por lo

que se sugiere una posible relación de TARC en asma¹⁵. La interacción entre CCR4 y su ligando TARC resulta de gran trascendencia en la regulación del tráfico de los linfocitos Th2 a los sitios de inflamación alérgica. De manera interesante, se ha encontrado que el receptor para TARC (CCR4) está altamente expresado en linfocitos Th2 infiltrantes de las vías aéreas de asmáticos expuestos a reto alérgico^{16,17} lo cual apoya la correlación que encontra-

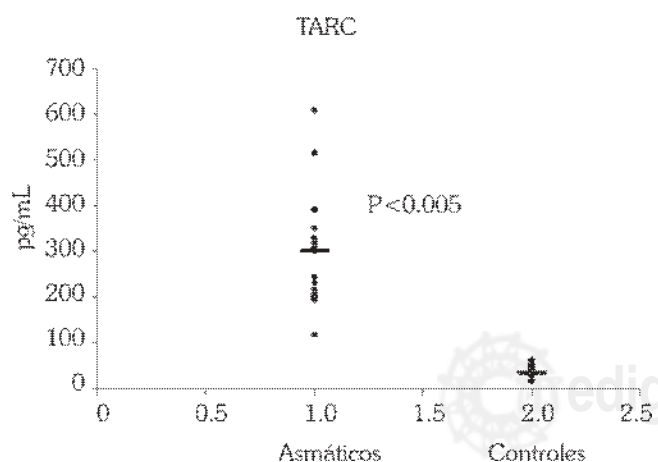


Figura 1. Niveles de TARC en LBA de sujetos asmáticos y controles sanos. Las líneas horizontales representan el valor medio (mediana).

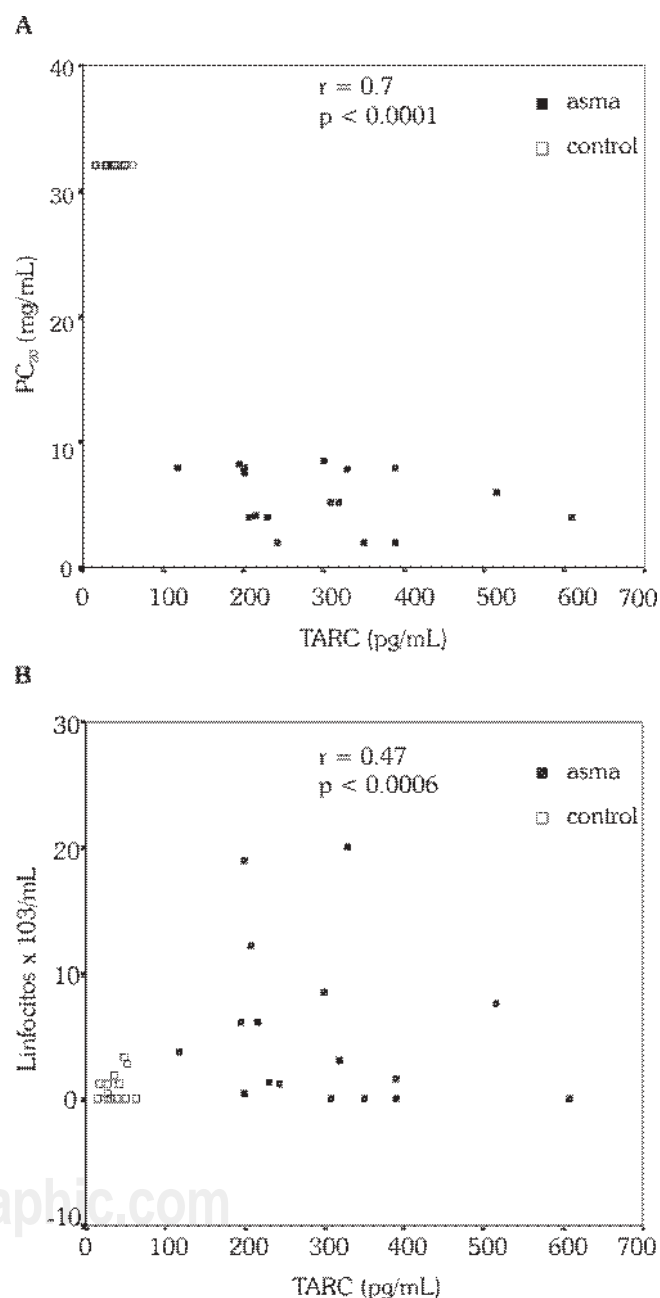


Figura 2. Correlación entre niveles de TARC e hiperreactividad bronquial (A) y linfocitos (B).

mos entre TARC y el número de linfocitos en el líquido de LBA. Nosotros sugerimos que TARC puede reclutar linfocitos Th2 en las vías aéreas de asmáticos, lo que entonces puede amplificar la reacción inflamatoria alérgica a través de la producción de citocinas tales como IL-4, IL-5 e IL-13. Se sabe que IL-4 e IL-13 estimulan a las células B para producir IgE, mientras IL-5 induce activación y diferenciación de eosinófilos^{18,19}. Estos eventos podrían mediar la inflamación y la hiperreactividad bronquial. Desde el punto de vista terapéutico el desarrollo de un antagonista de TARC puede tener implicaciones importantes en el tratamiento del asma. Evidencias indirectas de esto se han obtenido en ratones sensibilizados a los que el uso de un anticuerpo monoclonal anti-TARC antes del reto alérgico disminuye el grado de eosinofilia e hiperreactividad bronquial así como la infiltración de células CD4+.

En resumen, nuestro estudio demuestra que los asmáticos estables tienen concentraciones altas de TARC en el líquido de LBA, y los niveles de esta citocina se asocian tanto con la hiperreactividad bronquial como con la infiltración de linfocitos en las vías aéreas de sujetos asmáticos. Esto sugiere que TARC podría tener una función muy importante en la patogénesis del asma.

REFERENCIAS

1. Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, et al. *Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics*. J Immunol 1997; 158:3539-3544.
2. Lai CK, Ho SS, Chan CH, Leung R, Lai KN. *Gene expression of interleukin-3 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in circulating CD4+ T cells in acute severe asthma*. Clin Exp Allergy 1996; 26:138-146.
3. Mosmann TR, Sad S. *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today 1996;17:138-146.
4. Luster AD. *Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med 1998;338:436-445.
5. Zlotnik A, Yoshie O. *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity 2000;12:121-127.
6. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. *Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector*. J Biol Chem 1996;271:21514-21521.
7. Kawasaki S, Takizawa H, Yoneyama H, Nakayama T, Fujisawa R, Izumizaki M, et al. *Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice*. J Immunol 2001;166:2055-2062.
8. Berin MC, Eckmann L, Broide DH, Kagnoff MF. *Regulated production of the helper 2-type T-Cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells in vitro and in human lung xenografts*. Am J Respir Cell Mol Biol 2001; 24:382-389.
9. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, et al. *Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells*. J Immunol 2000;165: 2205-2213.
10. National Heart, Lung and Blood Institute. *Workshop summary and guidelines: investigative use of bronchoscopy, lavage and bronchial biopsies in asthma*. J Allergy Clin Immunol 1991; 88:808-814.
11. Romagnani S. *Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation*. Mol Immunol 2001;38:8881-8885.
12. Holgate S, Lackie M, Davies D, Roche W, Walls F. *The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma*. Clin Exp Allergy 1999;29 (2 Suppl):90S.
13. Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, et al. *Increased levels of a TH2-type CC chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics*. Allergy 2002;57:173-177.
14. Sugawara N, Yamashita T, Ote Y, Miura M, Terada N, Kurosawa M. *TARC allergic disease*. Allergy 2002;57:180-181.
15. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, et al. *Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine*. Int Immunol 1999;11:81-88.
16. Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C, et al. *The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics*. J Clin Invest 2001;107:1357-1364.
17. Ryan JJ. *Interleukin-4 and its receptor: Essential mediators of the allergic response*. J Allergy Clin Immunol 1997;99:1-5.
18. Brombacher F. *The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy*. Bioassays 2000;22:646.
19. Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. *Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects*. J Immunol 1997;158:5050-5057.

