

Distribución de células dendríticas mieloides y plasmacitoides de lavado bronquioalveolar en neumonitis por hipersensibilidad

LOURDES BARRERA*

ISABEL SADA-OVALLE*

LILIA VÁZQUEZ CASTAÑEDA*

JOSÉ LUIS BAÑALES MÉNDEZ†

ALEJANDRA BARRERA§

LUIS TORRE-BOUSCOULET*

FELIPE MENDOZA*

* Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

† Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez».

§ Instituto Tecnológico Autónomo de México.

Trabajo recibido: 11-XII-2000; aceptado: 17-III-2010

Conflicto de intereses: ninguno

154

RESUMEN

Antecedentes: La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por la inhalación repetida de partículas orgánicas. Las células dendríticas y sus precursores desempeñan un papel importante no sólo como células presentadoras de antígenos, sino también como parte de una red de procesos inmunorregulatorios. Dependiendo de su linaje y estado de diferenciación y activación, las células dendríticas pueden promover una intensa respuesta inmunológica por parte de los linfocitos T o bien, producir un estado de anergia.

Palabras clave:

Células dendríticas mieloides, células dendríticas plasmacitoides, neumonitis por hipersensibilidad, lavado bronquioalveolar.

Key words:

Myeloid dendritic cells, plasmacitoid dendritic cells, hypersensitivity pneumonitis, bronchoalveolar lavage.

Métodos: Se utilizaron células de LBA obtenidas de 8 pacientes con NH subaguda, 8 con NH crónica, 8 con FPI y 4 sujetos sanos. Se caracterizó por citometría.

Las células dendríticas y sus precursores desempeñan un papel importante no sólo como células presentadoras de antígenos, sino también como parte de una red de procesos inmunorregulatorios. Dependiendo de su linaje y estado de diferenciación y activación, las células dendríticas pueden promover una intensa respuesta inmunológica por parte de los linfocitos T o bien, producir un estado de anergia.

Objetivo: Caracterizar fenotípicamente las células dendríticas de origen mieloides (CDm) y plasmacitoides (CDp) presentes en el lavado bronquioalveolar (LBA) de pacientes con NH en etapas subaguda o crónica y comparada con lo observado en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y sujetos control.

ABSTRACT

Background: Hypersensitivity pneumonitis (HP) is a diffuse inflammatory disease of lung parenchyma resulting from repetitive inhalation of organic particles. Dendritic cells and their precursors play an important role not only as antigen presenting cells but also as part of an immunoregulatory network. Depending on their lineage and stage of differentiation and activation, dendritic cells can promote a strong T-lymphocytes-mediated immunological response or an anergy state.

Objective: To phenotypically characterize myeloid (mDCs) and plasmacitoid (pDCs) dendritic cells recovered in bronchoalveolar lavage from patients with subacute or chronic HP, and to compare the results with that obtained in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and healthy controls.

Methods: BAL cells from 8 patients with subacute HP, 8 with chronic HP, 8 with IPF and 4 healthy subjects were used. The phenotype of dendritic cells subpopulations were characterized by means of flow cytometry.

Results: In all studied groups a predominance of mDCs (HLA-DR⁺D11c⁺), as compared with pDCs, was observed. A lower frequency of both mDCs and pDCs was documented in subacute HP patients vs.

tría de flujo el perfil fenotípico de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas.

Resultados: En todos los grupos de estudio hubo una mayor proporción de CDm (HLA-DR⁺D11c⁺), en comparación con CDp. Documentamos una menor frecuencia de CDm y CDp en los pacientes con NH subaguda vs. sujetos sanos ($5.1 \pm 1.1\%$ [media \pm DE] vs. $30.4 \pm 5.2\%$, $p < 0.01$, y $0.5 \pm 0.2\%$ vs. $5.8 \pm 2.4\%$, $p < 0.05$, respectivamente). Comparados con los sujetos sanos, en los pacientes con NH y FPI no se identificó expresión de los marcadores de activación CD40 y CD80 en las poblaciones celulares estudiadas.

Conclusiones: La baja frecuencia de CDm y CDp, aunado a la ausencia de marcadores de activación o maduración, sugieren que los pacientes con NH, principalmente en la forma subaguda, cursan con un estado de anergia en los linfocitos T.

healthy controls ($5.1 \pm 1.1\%$ [mean \pm SD] vs. $30.4 \pm 5.2\%$, $p < 0.01$, and $0.5 \pm 0.2\%$ vs. $5.8 \pm 2.4\%$, $p < 0.05$, respectively). Compared with healthy subjects, in the cell populations from HP and IPF patients there was no expression of activation markers CD40 and CD80.

Conclusions: The low frequency of mDCs and pDCs, along with the absence of activation or maturation markers, suggests that patients with HP, mainly in the subacute form, present a T lymphocyte anergy state.

INTRODUCCIÓN

La neumonitis por hipersensibilidad (NH), también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por la inhalación de partículas orgánicas que afecta a bronquiolos, alvéolos y el espacio intersticial.¹ La respuesta inflamatoria está mediada principalmente por una respuesta inmunológica exagerada que puede ocurrir en un hospedero susceptible.² Como se ha demostrado previamente en la población mexicana con esta enfermedad, al menos parte de la susceptibilidad genética se encuentra relacionada con el complejo principal de histocompatibilidad y polimorfismos del factor de necrosis tumoral alfa.^{2,3} La secuencia de los eventos inmunopatogénicos relacionados al desarrollo de esta enfermedad no se conoce con precisión; sin embargo, existe evidencia sólida que apoya el concepto de que se trata de una hiperreactividad mediada por linfocitos T. En casos agudos, la formación de complejos inmunes puede participar en el desarrollo de la enfermedad.^{4,5} Un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio demostró que las células de los pacientes con NH crónica disminuyen o pierden sus funciones efectoras y muestran un perfil Th2, el cual puede estar relacionado con la respuesta fibrótica que caracteriza esta forma clínica.⁶

Las células dendríticas (CDs) y sus precursores desempeñan un papel importante no sólo como

células presentadoras de antígeno, sino también como parte de una red de procesos inmunorregulatorios. Dependiendo de su linaje así como de su estado de diferenciación y activación, las CDs pueden promover una fuerte respuesta por parte de los linfocitos T, o bien producir en éstos un estado de anergia y polarizar la respuesta de células T hacia Th1 o Th2.⁷⁻¹⁰ El pulmón constituye una de las interfases de mayor superficie entre el medio ambiente y el hospedero, y regularmente se encuentra en contacto con antígenos, alérgenos y patógenos. La inflamación en respuesta a estos estímulos debe ser cuidadosamente regulada ya que cualquier alteración, especialmente de naturaleza crónica, puede interferir con la función primaria de los pulmones que es el intercambio de gases. En enfermedades pulmonares asociadas a respuestas Th1 o Th2 tales como la NH, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o asma,¹¹⁻¹³ es de gran relevancia poder caracterizar a las CDs y a sus precursores para entender la modulación de la respuesta inmune en estos procesos.

Existe un número limitado de estudios en los que se haya caracterizado las CDs en lavado bronquioalveolar (LBA). En un estudio publicado por Nicod *et ál*,¹⁴ se describió la separación y purificación a partir de la digestión de tejido pulmonar humano. En otro estudio, Donnenberg *et ál* describieron la caracterización de CDs con un panel de anticuerpos que permite hacer la diferenciación entre CDs inmaduras y maduras en

LBA y sangre periférica de pacientes con EPOC.¹⁵ En este contexto, nuestro estudio caracterizó por primera vez fenotípicamente a las CDs presentes en el LBA de pacientes con NH en las etapas subaguda y crónica, lo que permitirá entender parcialmente los mecanismos de activación y diferenciación de una respuesta inmune tipo Th1 o Th2.

MÉTODOS

Población en estudio

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Cada sujeto incluido firmó el consentimiento informado.

Se incluyeron pacientes con NH provocada por antígenos de paloma. Los pacientes fueron clasificados como subagudos o crónicos. La forma subaguda se definió como: a) paciente con menos de seis meses de síntomas en promedio antes del diagnóstico; y b) con una tomografía computada de alta resolución y/o biopsia pulmonar que mostraba alteraciones patológicas de tipo inflamatorio y sin fibrosis. La forma crónica se definió como: a) paciente subagudo con más de 6 meses y menos de 24 meses de síntomas en promedio antes del diagnóstico, mostrando en los mismos estudios al menos 20% de tejido fibrótico. Se incluyeron también a sujetos con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y a sujetos sanos que fueron estudiados como controles.

Los criterios de inclusión para los pacientes con NH han sido previamente publicados^{16,17} e incluyeron:

- 1) Historia de exposición a aves con relación causa-efecto;
- 2) Presencia de anticuerpos séricos específicos contra antígeno aviario medidos por la técnica de ELISA;
- 3) Cuadro clínico, radiológico y funcional respiratorio compatible con una neumopatía intersticial difusa;
- 4) LBA > 40% de linfocitos;
- 5) Tomografía computada de tórax de alta resolución con imágenes micronodulares bronquiolocéntricas bilaterales, imágenes en vidrio despulido y mosaico. Los pacientes crónicos

mostraban, además, opacidades reticulares compatibles con fibrosis;

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

Lavado bronquioalveolar

EL LBA se llevó a cabo utilizando una técnica estandarizada.¹⁸ El líquido del LBA se filtró y centrifugó a 250 x g por 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de solución de fosfatos (PBS) y se utilizó una alícuota para realizar un conteo de células totales y viabilidad. Una alícuota de células se fijó en carbowax y se tiñó con hematoxilina y eosina para realizar el conteo diferencial. Las células restantes se resuspendieron en dimetil sulfoxido (DMSO) al 10% y suero fetal bovino (SFB) al 90% a una concentración de 10⁶ células x mL y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Citometría de flujo

La preparación de las muestras para citometría de flujo se realizó de la siguiente manera: 1) se lavaron las células obtenidas con buffer fosfato salino con albúmina sérica bovina (PBS-SFB) 1% durante 10 min a 650 x g, dos veces; 2) las células se resuspendieron en 50 µL del mismo buffer y se incubaron con 5 µL de cada uno de los anticuerpos con las combinaciones que se detallan en la Tabla I durante 30 min; 3) se lavaron con el mismo buffer dos veces; y 4) se resuspendieron en 0.5 mL de buffer PBS que contiene paraformaldehído al 1%. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (FACSaria de Becton Dickinson) (FACs Diva Software V. 6.0). La estrategia de análisis de las diferentes subpoblaciones de CDs para los grupos estudiados se detalla en la Figura 1.

Análisis estadístico

La mayoría de las variables mostraron una distribución normal, por lo que los datos se expresaron en forma de media y desviación estándar. Las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo mediante prueba t o prueba de χ^2 según

Tabla I. Anticuerpos empleados en citometría de flujo multiparamétrica.

Antígeno	Marca	Clona	Compañía
Cóctel de selección negativa (LIN-FITC)			
CD3	FITC	SK7	BD BIOSCIENCES
CD14	FITC	MφP9	BD BIOSCIENCES
CD16	FITC	3G8	BD BIOSCIENCES
CD19	FITC	SJ25C1	BD BIOSCIENCES
CD20	FITC	L27	BD BIOSCIENCES
CD56	FITC	NCAM16.2	BD BIOSCIENCES
Otros anticuerpos			
CD11c	PE	S-HCL-3	BD BIOSCIENCES
CD11c	APC	S-HCL-3	BD BIOSCIENCES
CD123	PE	9F5	BD BIOSCIENCES
HLA-DR	PerCP	L243	BD BIOSCIENCES
CD40	APC	HB14	BIOLEGEND
CD83	APC	HB15e	BIOLEGEND
CD86	APC	BU63	BIOLEGEND
CD80	APC	MEM-233	BIOLEGEND
CD1a	PE	NA1/34	BIOLEGEND

HLA: Human leukocyte antigen (antígeno de leucocitos humanos); FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; APC: Alofocianina; PerCP: Peridin clorofil proteína.

fuera apropiado. Se consideró un valor significativo de p cuando éste fuera < 0.05 . Los datos fueron analizados con el programa Graph Prism V. 5.0.

RESULTADOS

Se incluyeron 16 pacientes con NH, los cuales fueron clasificados como subagudos (8 pacientes, 54.7 ± 13.4 años) o crónicos (8 pacientes, 49.7 ± 5.1 años). También se incluyeron 8 sujetos con FPI (58.7 ± 14.5 años) y a 4 sujetos sanos (37.6 ± 6.5 años).

En la Tabla II se resumen los datos demográficos, clínicos y funcionales, así como las características del conteo diferencial de las células inflamatorias recuperadas del LBA. Todos los pacientes mostraron evidencia clínica, radiológica y funcional de enfermedad pulmonar intersticial difusa con diversos grados de disnea, disminución en la capacidad vital forzada e hipoxemia en reposo que empeoraba durante el ejercicio. Los pacientes con NH crónica fueron en promedio de mayor edad y mostraron hipoxemia más grave (PaO_2 49 ± 12 vs. 53 ± 2 mmHg; $p < 0.05$); asimismo, prácticamente la

mitad de ellos presentaba hipocratismo digital -signo clínico asociado a fibrosis- en comparación con el 12% de los pacientes con presentación subaguda. Ambos grupos se caracterizaron por una marcada linfocitosis; sin embargo, se observaron niveles significativamente más altos en los pacientes subagudos en comparación con los crónicos ($72.3 \pm 17.1\%$ vs. $59.7 \pm 5\%$; $p < 0.01$).

Análisis de las subpoblaciones de CDp y CDm

Los resultados mostraron un predominio de CDs de origen mielóide ($\text{HLA-DR}^+\text{CD11c}^+$) (CDm) en todos los grupos estudiados en comparación con las células mieloides de origen plasmacitoide (CDp). Los pacientes con NH de evolución crónica tuvieron una menor frecuencia de CDm comparados con los controles ($p < 0.05$); mientras que los pacientes con FPI tuvieron una frecuencia de CDm similar a los sujetos control. La subpoblación de CDm CD1a^+ fue significativamente menor en los grupos estudiados con respecto al grupo control (Tabla II, Figura 2). La frecuencia de CDp ($\text{HLA-DR}^+\text{CD123}^+$) fue

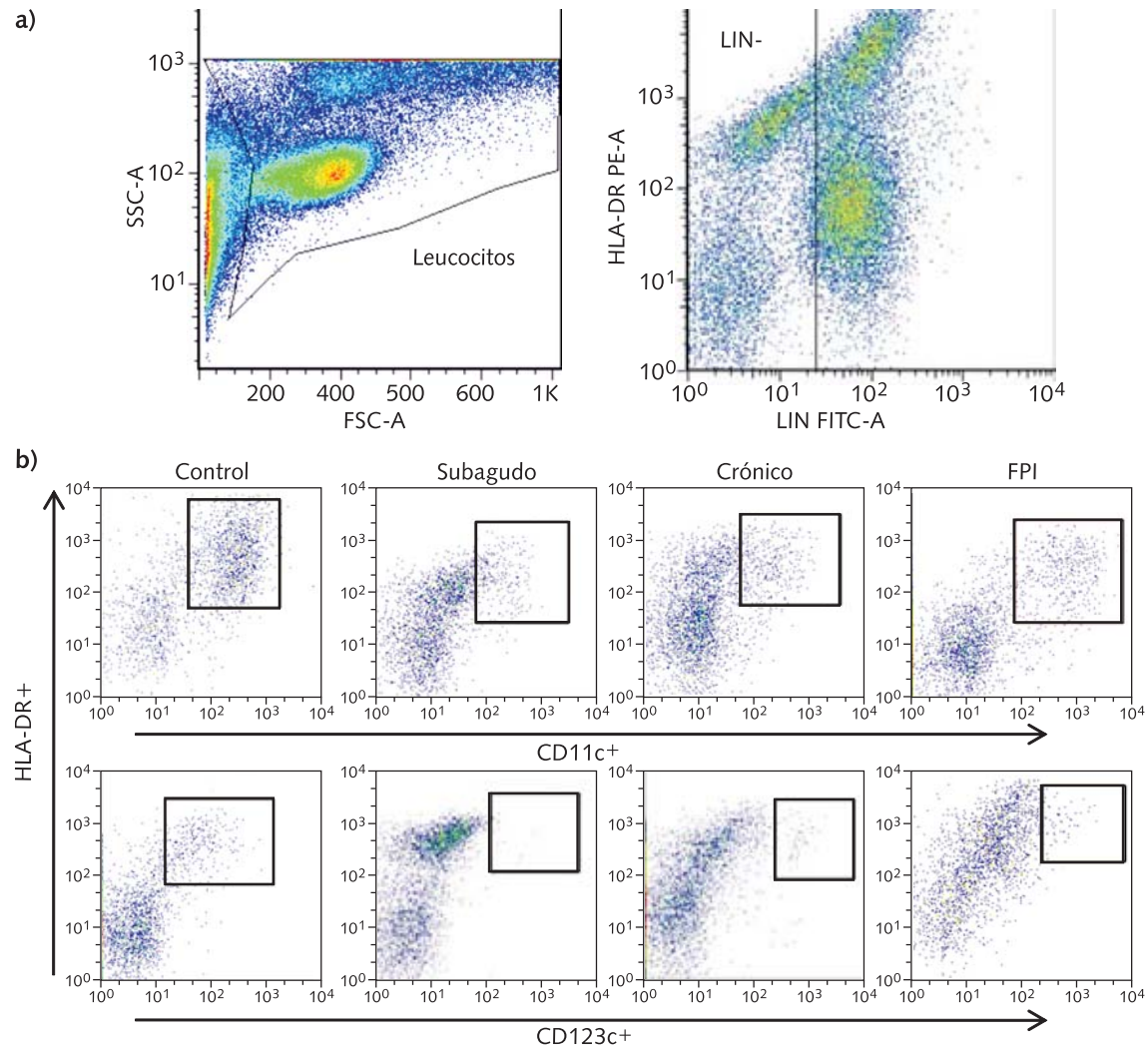


Figura 1. Análisis de subpoblaciones de CDs de LBA; **a)** las células totales de LBA fueron identificadas a partir de una gráfica de puntos de dispersión frontal (FSC, forward scatter) vs. dispersión lateral (SSC, side scatter), y se seleccionó la ventana negativa para los marcadores incluidos en el cóctel CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 (lin^{neg/dim}); **b)** dentro de las células seleccionadas de la ventana lin^{neg/dim}, se identificaron como CDp aquellas que coexpresaron el marcador CD123 y el antígeno de leucocitos humanos (human leukocyte antigen) HLA-DR, y como CDm aquellas que coexpresaron el marcador CD11c y el HLA-DR en sujetos control, pacientes subagudos, crónicos y con FPI. Se muestra un experimento representativo de cada grupo estudiado.

www.medigraphic.org.mx

significativamente menor cuando se compararon los grupos de pacientes vs. el grupo control (sujetos sanos) (Tabla III, Figura 3); sin embargo, la relación CDm:CDp mostró un gradiente a favor de las CDm entre controles, NH subaguda, NH crónica y FPI (Tabla III).

Análisis de marcadores de activación en CDp y CDm

Los pacientes con NH subaguda o crónica tuvieron una menor expresión de marcadores de activación en comparación con los controles sanos

Tabla II. Características demográficas, clínicas y funcionales de los pacientes estudiados.

Variable	NH subaguda (n = 8)	NH crónica (n = 8)	FPI (n = 8)	Controles sanos (n = 4)
Edad	54.7 ± 13.4	49.7 ± 5.1	58.7 ± 14.5*	37.6 ± 6.5
Sexo (F/M)	6/2	8/0	2/6	2/2
Tiempo de síntomas antes del diagnóstico (meses)	6.7 ± 0.67	40 ± 6.9 [‡]	13.3 ± 10.1	NA
Tabaquismo (%)	12	12	12	0
Hipocratismo (%)	12	37 [‡]	75 [§]	NA
CVF (%)	62 ± 7	67 ± 16	74 ± 31	NA
VEF ₁ (%)	64 ± 10	68 ± 13	77 ± 31	NA
VEF ₁ /CVF (%)	80 ± 4	87 ± 6	82 ± 2	NA
PaO ₂ (mmHg)	53 ± 2	49 ± 12	67 ± 7*	NA
LBA macrófagos (%)	34.0 ± 14.0	35.3 ± 6.4	85.7 ± 7.8 [§]	88.2 ± 7.3
LBA linfocitos (%)	62.3 ± 17.1	59.7 ± 5.0	13.0 ± 6.6	11.2 ± 7
BA neutrófilos (%)	0.7 ± 1.2	59.7 ± 5.0	0.3 ± 0.6	0
LBA eosinófilos (%)	3.0 ± 5.2	3.0 ± 2.0	1.0 ± 1.7	0

VEF₁ %: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo como porcentaje del esperado.

LBA: Lavado bronquioalveolar.

Datos expresados en media ± desviación estándar.

* p < 0.05 FPI vs. NH crónica.

[‡] p < 0.05 NH crónica vs. NH subaguda y FPI.

[§] p < 0.05 FPI vs. NH subagudo y NH crónico.

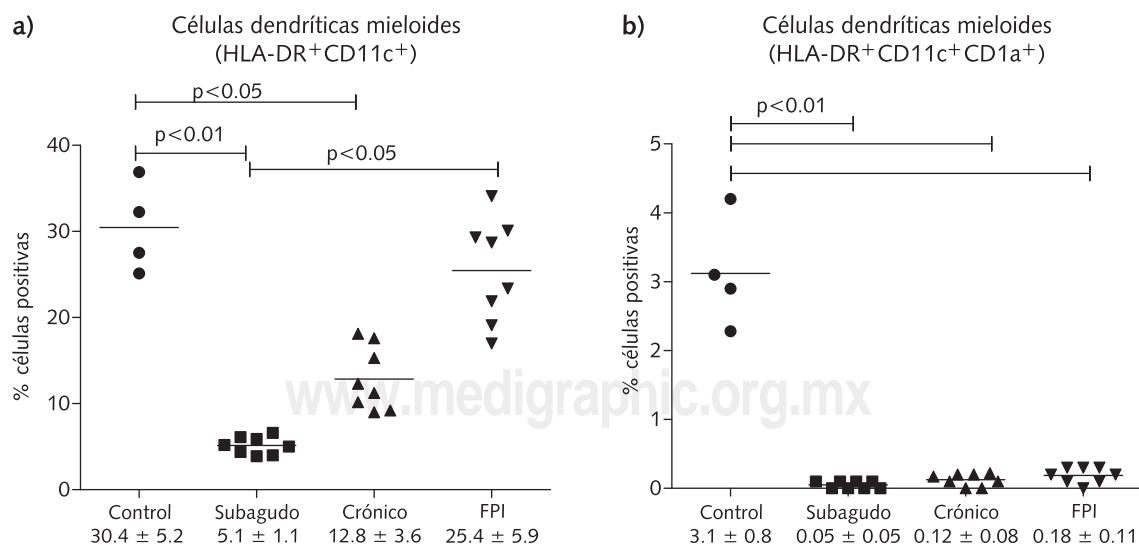


Figura 2. CDm presentes en LBA en controles sanos, NH subaguda, crónica y FPI; **a)** CDm totales HLA-DR⁺CD11c⁺; y **b)** CDm CD1a positivas.

Tabla III. Subpoblaciones de células dendríticas identificadas en lavado bronquioalveolar.

Subpoblación	NH subaguda	NH crónica	FPI	Controles
CDp % células LBA	0.5 ± 0.2	1.5 ± 1.2	0.4 ± 0.2	5.8 ± 2.4*
CDm % células LBA	5.1 ± 1.1	12.8 ± 3.6	25.4 ± 5.9 [§]	30.4 ± 5.2 [‡]
% CDm CD1a ⁺	0.05 ± 0.05	0.12 ± 0.08	0.18 ± 0.11	3.1 ± 0.8*
CDm:CDp	7.6 ± 1.6	8.5 ± 6.2	53.2 ± 46.1 [§]	5.3 ± 2.1
% CDmCD40 ⁺	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.1	2.4 ± 0.7	72.6 ± 5.2*
% CDmCD80 ⁺	0.35 ± 0.2	0.65 ± 0.1	2.05 ± 1.1	70.9 ± 16.5*
% CDmCD83 ⁺	ND	ND	ND	ND
% CDmCD86 ⁺	ND	ND	ND	ND

CDp: Células dendríticas plasmacitoides (HLA-DR⁺CD123⁺)

CDm: células dendríticas mieloides (HLA-DR⁺CD11c⁺)

CDm:CDp: Relación células dendríticas mieloides, células dendríticas plasmacitoides

LBA: Lavado bronquioalveolar.

ND: Valor no detectable.

Datos expresados en media ± desviación estándar.

* p<0.05 control vs. NH subaguda y NH crónica y FPI.

‡ p <0.05 control vs. NH subaguda y NH crónica.

§ p<0.05 FPI vs. NH subaguda y NH crónico.

160

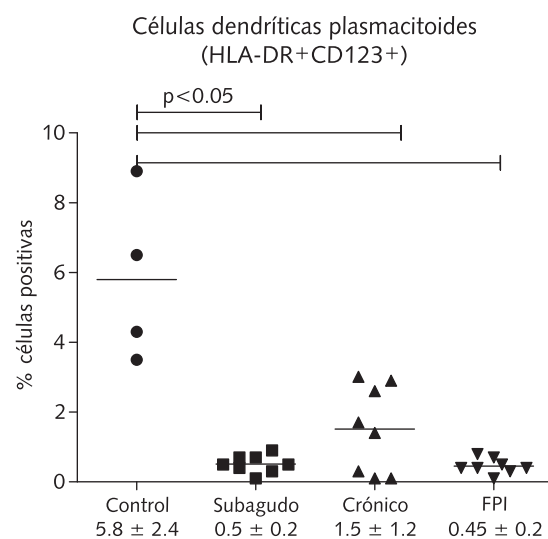


Figura 3. CDp presentes en LBA en controles sanos, NH subaguda, crónica y FPI.

(Tabla III). Los marcadores CD83 y CD86 no se encontraron en cantidades significativas en los grupos estudiados.

DISCUSIÓN

Este estudio describe por primera vez la distribución y la expresión de marcadores de superficie

de CDs provenientes del epitelio pulmonar recuperadas en el LBA en pacientes con NH en etapas subaguda y crónica, así como en pacientes con FPI y sujetos sanos. Se utilizó una estrategia de análisis por citometría de flujo que permitió la identificación, cuantificación y caracterización de CDp (CD123⁺HLA-DR⁺lin neg/dim) y CDm (CD11c⁺HLA-DR⁺lin neg/dim). El conocimiento que actualmente se tiene sobre la participación de las CDs en la fisiopatología de enfermedades que afectan al aparato respiratorio es aún escaso. Se han realizado estudios recientes que caracterizan a estas células en diversas enfermedades como sarcoidosis,¹⁹ neumonía,²⁰ EPOC²¹ o asma;²² sin embargo, no existe a la fecha estudio alguno que compare las etapas subaguda y crónica de la NH relacionando la distribución de las CDs con el progreso de la enfermedad.

Las CDs son células profesionales presentadoras de antígeno del sistema inmune y coordinan la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil tipo Th1 o tipo Th2, entre otras funciones.²³ Las CDm se distribuyen en los órganos periféricos capturando antígenos para luego migrar hacia los órganos linfoides secundarios donde presentan el antígeno a las células T vírgenes. La producción de IL-12 en grandes cantidades por parte de estas células de origen mieloide, favorece una respuesta tipo Th1. En contraste, las CDp entran directamente de la circulación sistémica a

los órganos linfoides. Estas células liberan menor cantidad de IL-12, lo que favorece el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th2. Esta subpoblación (CDp) también tiene la capacidad única de promover la respuesta tipo Th1 liberando interferón gamma, el cual induce la producción de IL-10 por parte de las células T CD4⁺ y de las células T regulatorias; aunque, se ha sugerido que la adquisición de cierto perfil de secreción de citocinas no está predeterminado, sino que está regulado por el microambiente que regula, a su vez, el tipo y la dirección funcional de las CDs a nivel local. Con esta idea de plasticidad en la determinación de la distribución y activación de CDs estudiamos estas poblaciones en NH en sus etapas subaguda y crónica.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio⁶ demostramos que la forma subaguda de la NH se caracteriza por concentraciones elevadas de citocinas tipo Th1, mientras que los pacientes con NH en etapa crónica mostraron un patrón opuesto caracterizado por una polarización hacia un perfil Th2. También identificamos que las células T citotóxicas se encontraban en un estado de anergia al no responder ante estímulos específicos y ser incapaces de secretar perforina.

En este estudio, evidenciamos que los pacientes con formas subagudas de NH, cursan con menor frecuencia CDm en comparación con pacientes con NH crónica, FPI o sujetos sanos. Estos resultados, aunados a los de nuestro estudio previo, apoyan la noción de un estado de anergia linfocitaria.

Los pacientes con NH subaguda, NH crónica o FPI no expresaron los marcadores de activación CD40 y CD80 mientras que sí estuvieron presentes en CDs de sujetos sanos. Este hallazgo sugiere que las CDs que se recuperan del LBA son células inmaduras en las que existe disfunción en su estado de activación, lo cual podría bloquear la presentación antigénica y esto pudiera estar mediado por el microambiente. La expresión insuficiente de moléculas coestimuladoras en las CDs limita su proceso de maduración, lo que podría contribuir al establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica, o bien a inducir un estado de anergia en las células T como lo hemos demostrado previamente.⁶ Dicho estado de anergia en las células mieloides se ha informado también en pacientes con

sarcoidosis,²⁴ tuberculosis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.^{25,26} El análisis de la relación de CDm y CDp confirmó que las células mieloides se encuentran incrementadas con respecto a las plasmacitoides. Estos resultados sugieren que la disminución notable de la población plasmacitoide se relaciona con la progresión de la enfermedad y que favorece, de algún modo, el estado de cronicidad de la misma.

Limitaciones del estudio

Nuestro estudio presentó limitaciones, como: 1) el número de sujetos incluidos es pequeño, lo que compromete la validez externa de nuestros resultados; 2) no se exploraron aspectos funcionales que darían solidez a las especulaciones derivadas del análisis fenotípico; y 3) el carácter transversal de este estudio nos impide conocer la dirección de las asociaciones.

En una segunda etapa de este estudio se caracterizarán las CDs de sangre periférica de los mismos grupos de pacientes con el fin de establecer si existe una relación entre la respuesta sistémica y de trofismo hacia los sitios de inflamación en el pulmón por medio de receptores de quimiocinas. Del mismo modo, se caracterizará el perfil de secreción y expresión intracelular de citocinas para conocer el estado funcional de las poblaciones estudiadas e identificar así un perfil fenotípico y funcional de las CDs presentes en el epitelio pulmonar.

CONCLUSIONES

La baja frecuencia de CDm y CDp, aunado a la ausencia de marcadores de activación o maduración sugieren que los pacientes con NH, principalmente en la forma subaguda, cursan con un estado de anergia en los linfocitos T. Dicho estado de anergia podría influir la diferenciación Th1/Th2 y por lo tanto, modificar la progresión de la enfermedad hacia etapas crónicas.

REFERENCIAS

1. Selman M, Chapela R, Raghu G. *Hypersensitivity pneumonitis: clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies*. Semin Resp Med 1993;14:353-364.

2. Selman M, Terán L, Mendoza A, et ál. *Increase of HLA-DR7 in pigeon breeder's lung in a Mexican population*. Clin Immunol Immunopathol 1987;44:63-70.
3. Camarena A, Juárez A, Mejía M, et ál. *Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease*. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1528-1533.
4. Selman M. *Hypersensitivity pneumonitis*. In: Schwarzs M, King T, editors. *Interstitial lung diseases*. Hamilton Ontario: BC Decker; 1998.p.393-422.
5. Pepys J. *Clinical and therapeutic significance of patterns of allergic reactions of the lungs to extrinsic agents: the 1977 J. Burns Amberson Lecture*. Am Rev Respir Dis 1977;116:573-588.
6. Barrera L, Mendoza F, Zúñiga J, et ál. *Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis*. Am J Respir Crit Care Med 2008;177:44-55.
7. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. *Myeloid dendritic cell induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation*. J Clin Invest 2000;106:551-559.
8. Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today 1999;20:561-567.
9. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et ál. *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol 1995;154:5071-5079.
10. Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. *Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cells differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio*. J Exp Med 2000;192:405-412.
11. Bellini A, Vittori E, Marini M, Ackerman V, Mattoli S. *Intraepithelial dendritic cells and selective activation of Th2-like lymphocytes in patients with atopic asthma*. Chest 1993;103:997-1005.
12. Bertorelli G, Bocchino V, Zhou X, et ál. *Dendritic cell number is related to IL-4 expression in the airways of atopic asthmatic subjects*. Allergy 2000;55:449-454.
13. Upham JW, Word L, Demburg JA. *Circulating dendritic cells and asthma: rapid response to inhaled allergen*. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:854(a).
14. Nicod LP, Lipscomb MF, Weissler JC, Lyons CR, Albertson J, Toews GB. *Mononuclear cells in human lung parenchyma. Characterization of a potent accessory cell not obtained by bronchoalveolar lavage*. Am Rev Respir Dis 1987;136:818-823.
15. Donnenberg VS, Donnenberg AD. *Identification, rare-event detection and analysis of dendritic cell subsets in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood by flow cytometry*. Front Biosci 2003;8:s1175-s1180.
16. Bustos ML, Frías S, Ramos S, et ál. *Local and circulating microchimerism is associated with hypersensitivity pneumonitis*. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:90-95.
17. Selman M, Pardo A, Barrera L, et ál. *Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis*. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:188-198.
18. Sandoval J, Bañales JL, Cortés JJ, Mendoza F, Selman M, Reyes PA. *Detection of antibodies against avian antigens in bronchoalveolar lavage from patients with pigeon breeder's disease: usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme immunotransfer blotting*. J Clin Lab Anal 1990;4:81-85.
19. Mathew S, Bauer KL, Fischeoeder A, Bhardwaj N, Oliver SJ. *The anergic state in sarcoidosis is associated with diminished dendritic cell function*. J Immunol 2008;181:746-755.
20. Lommatzsch M, Bratke K, Bier A, et ál. *Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung*. Eur Respir J 2007;30:878-886.
21. Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, et ál. *Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:998-1005.
22. Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, et ál. *Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge*. Thorax 2007;62:168-175.
23. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et ál. *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med 1999;5:919-923.
24. Turiaf J, Menault M, Battesti JP. *Research on immunologic manifestations of sarcoidosis*. Ann Med Interne (Paris) 1970;121:117-134.
25. Mariotti S, Teloni R, Iona E, et ál. *Mycobacterium tuberculosis subverts the differentiation of human monocytes into dendritic cells*. Eur J Immunol 2002;32:3050-3058.
26. Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumpfheller C, Siegal FP, Steinman RM. *HIV-1 infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:7669-7674.

Correspondencia:

Dra. Lourdes María Barrera Ramírez,
 Instituto Nacional de Enfermedades
 Respiratorias Ismael Cosío Villegas.
 Calzada de Tlalpan 4502, colonia
 Sección XVI. México, D.F., 14080
 Teléfono: (52 55) 54871700,
 extensión 270; fax: (52 55)
 5665-4623
 Correo electrónico:
 lourdesbr@yahoo.com