

El polimorfismo COX2.8473T>C del gen de la ciclooxigenasa-2 está asociado al cociente CD4/CD8 del lavado broncoalveolar en la sarcoidosis

José Luis López-Campos,^{*} David Rodríguez-Rodríguez,^{*} Eulogio Rodríguez-Becerra,^{*} Inmaculada Alfageme-Michavila,[†] José Fernández-Guerra,[‡] Francisco Javier García-Hernández,[§] Álvaro Casanova,^{||} Javier Fernández de Córdoba,^{||} Ana Romero-Ortiz,^{**} Elena Arellano-Orden,^{*} Ana Montes-Worboys^{*}

^{*}Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. [†]Servicio de Neumología. Hospital Universitario de Valme, Sevilla. [‡]Sección de Neumología. Hospital Costa del Sol, Marbella, Málaga. [§]Unidad de Colagenosis. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. ^{||}Servicio de Neumología. Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. ^{||}Servicio de Neumología. Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva. ^{**}Servicio de Neumología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Cyclooxygenase-2 polymorphisms and bronchoalveolar lavage cellularity of Sarcoidosis.

ABSTRACT

Objectives. Recent studies have found cyclooxygenase-2 (COX-2) and its polymorphisms to be associated with sarcoidosis, being it significantly decreased in alveolar macrophages, with no information on the relationship between these polymorphisms and the rest of cells in bronchoalveolar lavage (BAL). The present study aimed to investigate the potential association between COX-2 gene polymorphisms and the BAL cell profile including the CD4/CD8 ratio. **Material and methods.** This observational cross-sectional study involved six hospitals in Spain. Patients diagnosed with sarcoidosis with a BAL performed were included. The following variables were recorded: age, gender, initial diagnostic methods, serum angiotensin-converting enzyme levels, pulmonary function tests, radiological stage, and the cellularity and CD4/CD8 ratio from BAL. Genotyping of four COX-2 polymorphisms (COX2.5909T>G, COX2.8473T>C, COX2.926G>C, and COX2.3050G>C) was undertaken on DNA extracted from peripheral blood lymphocytes using fluorescent hybridization probes. The relationship between the polymorphisms and the cellularity was done by means of a multiple linear regression, adjusting for gender. **Results.** A total of 51 sarcoid patients (23 males, mean age: 45 ± 15 years) were studied. CD4/CD8 ratio was significantly higher among homozygote allele C carriers of the polymorphism COX2.8473T>C (CC 11.2 ± 5.5 vs. CT+TT 4.4 ± 3.5; $p = 0.022$; $\beta = 7.43$; 95 % CI 1.38 - 13.48). Although several differences were observed in other cell groups, they did not reach the statistical significance level. **Conclusions.** In pa-

RESUMEN

Objetivos. Estudios recientes han encontrado que la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y sus polimorfismos están relacionados con la sarcoidosis, encontrándose ésta significativamente disminuida en los macrófagos alveolares y sin que tengamos información sobre la relación entre estos polimorfismos y el resto de células del lavado broncoalveolar (LBA). El objetivo del presente estudio fue analizar la celularidad del LBA, así como el cociente CD4/CD8 y su posible relación con los polimorfismos de la COX-2. **Material y métodos.** Estudio multicéntrico observacional transversal en el que participaron seis hospitales de España. Se incluyeron pacientes diagnosticados con sarcoidosis que tuvieran LBA realizado. De cada caso se recogió edad, sexo, método diagnóstico, enzima convertidora de angiotensina, pruebas de función respiratoria, estadio radiológico y celularidad del LBA con el cociente CD4/CD8. Se determinaron cuatro polimorfismos del gen de la COX-2: COX2.5909T>G, COX2.8473T>C, COX2.926G>C y COX2.3050G>C que se analizaron a partir del ADN obtenido de linfocitos de sangre periférica mediante sondas de hibridación fluorescente. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple ajustado por sexo. **Resultados.** La muestra se compuso de 51 casos con sarcoidosis (23 hombres; edad: 45 ± 15 años). El cociente CD4/CD8 estaba significativamente más elevado entre los portadores homocigotos del alelo C del polimorfismo COX2.8473T>C (CC 11,2 ± 5,5 vs. CT+TT 4,4 ± 3,5; $p = 0.022$; $\beta = 7.43$; IC95 %: 1.38-13.48). Aunque se encontraron diferencias en otros grupos celulares entre los distintos polimorfismos estudiados, éstas no alcanzaron la significación estadística. **Conclusiones.** En los pacientes diagnosticados con sarcoi-

tients diagnosed with sarcoidosis, there seems to be a relationship between COX2.8473 polymorphism and CD4/CD8 ratio from BAL.

Key words. Sarcoidosis. Cyclooxygenase-2. Polymorphisms. COX2.8473. Bronchoalveolar lavage.

INTRODUCCIÓN

La prostaglandina E_2 (PGE_2) constituye uno de los principales productos de la degradación del ácido araquidónico en fibroblastos, células epiteliales y macrófagos alveolares.^{1,2} Su producción está mediada por un complejo sistema enzimático en el que la enzima ciclooxigenasa (COX) tiene un papel relevante. En este sentido, es conocido que la COX presenta dos isoformas principales, una constitutiva, COX-1, y otra inducible, COX-2, que está implicada en diversos mecanismos inflamatorios.³

Entre sus diversas acciones biológicas, la PGE_2 posee un papel como regulador de la proliferación fibroblástica y el depósito de colágeno.⁴ Por este motivo su expresión se ha estudiado en enfermedades fibrosantes, como la fibrosis pulmonar idiopática, como mediador implicado en procesos inflamatorios y fibróticos pulmonares. De esta manera se ha descrito que los fibroblastos cultivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática tienen una menor capacidad para sintetizar PGE_2 y de expresar COX-2⁵ y que esta disminución de la PGE_2 es dependiente de la COX-2.⁶

En la sarcoidosis, un estudio inicial demostró que el cociente $PGF_{2\alpha}/PGE_2$ estaba significativamente elevado en pacientes frente a controles.⁷ Por otro lado, un estudio reciente ha encontrado que la COX-2 estaba significativamente disminuida en los macrófagos alveolares de los pacientes con sarcoidosis frente a controles,⁸ sugiriéndose un posible papel de esta enzima en la patogenia de la enfermedad. Estudios posteriores han relacionado los diversos polimorfismos de esta enzima con el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad.^{9,10} Sin embargo, aunque esta relación está cada vez más estudiada, por el momento siguen quedando cuestiones pendientes sobre la implicación de esta enzima en la patogenia de la enfermedad. En este sentido, la relación descrita⁸ entre macrófagos alveolares y COX-2 permite establecer la hipótesis de que podría ser relevante de manera similar en otros grupos celulares presentes en el lavado broncoalveolar. El objetivo del presente estudio fue, por tanto, analizar la celularidad del lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con sarcoidosis y su posible relación con los polimorfismos de la COX-2.

dosis, parece existir una relación entre el polimorfismo COX2.8473 y el cociente CD4/CD8 del LBA.

Palabras clave. Sarcoidosis. Ciclooxigenasa 2. Polimorfismos. COX2.8473. Lavado broncoalveolar.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo fue diseñado como un estudio multicéntrico observacional transversal en el que se recogieron pacientes diagnosticados de sarcoidosis de seis hospitales de España. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del centro coordinador y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes incluidos. Se incluyeron pacientes diagnosticados con sarcoidosis según los criterios del último consenso internacional¹¹ y que hubieran realizado un LBA durante su proceso diagnóstico. Para la inclusión de los pacientes se exigió un diagnóstico mediante biopsia. Alternativamente, en algunos casos se admitieron pacientes sin biopsia con un cuadro clínico muy sugestivo junto con un cociente CD4/CD8 en el LBA superior a 3,5.¹²

En todos los casos se recogieron las siguientes variables: edad, sexo, método diagnóstico, enzima convertidora de angiotensina, pruebas de función respiratoria, clasificación del estadio radiológico y conteo celular diferencial del LBA incluyendo cociente CD4/CD8. Para el presente trabajo se empleó la clasificación radiológica del consenso internacional actual¹¹ que está basada en la clasificación de Siltzbach, *et al.*¹³ Las pruebas de función respiratoria aportadas incluían espirometría, gasometría, volúmenes pulmonares y capacidad de difusión.

Los LBA se realizaron en todos los centros participantes según las normativas internacionales,¹⁴ desecando las primeras alícuotas. Todos los LBA se realizaron en el lóbulo medio o en la lingula salvo en los casos en los que existiera una alteración localizada en otro lóbulo. En tres centros se empleó un volumen de instilación de 150 mL en tres alícuotas de 50 mL y en los tres centros restantes un volumen de 120 mL en seis alícuotas de 20 mL. La presión de aspiración fue en todos los centros de $-20\text{ cmH}_2\text{O}$.

Selección de genes y estudio de polimorfismos COX-2

Aunque se han descrito numerosos polimorfismos de la COX-2¹⁵ los estudios descritos hasta ahora tienen en cuenta sólo aquéllos con relevancia funcional. En este sentido, el COX2.926G>C se ha

estudiado en relación con la sarcoidosis con resultados significativos.⁹ En el presente estudio, además, se genotiparon otros tres polimorfismos con una frecuencia elevada en la población caucásica distribuidas a lo largo de todo el gen. Estos fueron COX2.5209T>G (intrón 5), COX2.8473T>C (exón 10, región 3'-UTR) y COX2.3050G>C (exón 3). Las frecuencias descritas para estos polimorfismos en homocigosis en población sana son COX2.926 (rs20417) 1.9%, COX2.3050 (rs5277) 3.3%, COX2.5209 (rs20432) < 1%, COX2.8473 (rs5275) 23.4%.¹⁶

El ADN genómico se extrajo de los leucocitos de sangre periférica con el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los polimorfismos fueron amplificados por PCR convencional. Brevemente, la mezcla de reacción contenía 5 mL de la dilución apropiada de ADN, 0.15 mM dNTP (Promega), 1 X tampón de la polimerasa (EuroClone, Celbio, Milán, Italia), 2 mM MgCl₂, 0.15 U Taq DNA polimerasa (EuroClone, Celbio, Milán, Italia) y 0.4 mM de cada cebador en un volumen total de 25 mL. La PCR se realizó en un termociclador (MyCycler™, Bio-Rad, CA, EE.UU.), con las siguientes condiciones: 15 seg a 94 °C, 10 seg a 55 °C, 20 seg a 72 °C, en 30 ciclos. Los polimorfismos fueron detectados mediante sondas de hibridación fluorescentes-curva de disociación¹⁷ con el sistema LightCycler (Roche, Alemania). Las secuencias de los cebadores y las sondas empleados están descritas en el cuadro 1.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Statistical package for social sciences (SPSS, Inc.

Chicago, IL, EE.UU.) versión 14.0. Las variables cualitativas se caracterizaron mediante las frecuencias absolutas y relativas de sus categorías. Las variables cuantitativas se expresaron como media \pm desviación estándar. Las comparaciones entre dos variables fueron estudiadas con la t de Student para datos independientes, previo análisis de la igualdad de las varianzas mediante el test de Levene. Al ser las variaciones alélicas homocigotas infrecuentes, las diferencias de los distintos parámetros cuantitativos entre los genotipos se realizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los valores significativos se estudiaron mediante regresión lineal múltiple ajustado por el sexo, expresando el coeficiente β y su intervalo de confianza a 95 % (IC 95 %). Para realizar este análisis los diferentes genotipos fueron transformados en variables dicotómicas dummy. El nivel de significación estadística se estableció en 0.05.

RESULTADOS

La muestra se compuso de 51 pacientes caucásicos diagnosticados con sarcoidosis (23 hombres; edad: 45 \pm 15 años). Los diagnósticos se obtuvieron mediante biopsia transbronquial en 38 (74.5 %) casos, biopsia bronquial en dos (3.9 %) casos, videotoracoscopia en tres (5.9 %) casos, mediastinoscopia en dos (3.9 %) casos y por medio de biopsias de localización extratorácica en dos (3.9 %) casos que correspondieron a un ganglio axilar y una biopsia hepática. En cuatro (7.8 %) casos se consideró adecuado un diagnóstico por criterios clínicos sin biopsia. Los estadios radiológicos y las características de los pacientes están resumidos en el cuadro 2.

Las características del LBA, así como las relaciones con los polimorfismos estudiados están resumi-

Cuadro 1. Cebadores y sondas empleados para el genotipado.

Polimorfismo	Cebador PCR adelante	Cebador PCR atrás	Sonda marcada con fluoresceína	Sonda marcada con LC Red 640
COX2.926	5'-ACCAAAATAATCCA CGCA-3'	5'-CCCCTCCTTGTTTC TTG-3'	5'-AACTGCTTAGGACCAGTA TTATGAGGAGAA-FL	5'-LC Red705- ACCTTCCCCCTCTCTT-PH
COX2.3050	5'-TTGTGTCTTATAAT GAGTCCCATTA-3'	5'-TGGAATATGTTTT AGATTAGGCTT-3'	5'-CATTCCCTTCCTTCG AAATGCAAT-FL	5'-LC Red705- ATGAGTTATGTCTTGAC ATGTAAGTAC-PH
COX2.5209	5'-TACCATGATTATGC CGCT-3'	5'-TTCATAGCCATGAA TTGCTAA-3'	5'-ACTTTTTTATAATTACC AT-FL	5'-LC Red640- ATCATAGTAAGTATATAAT-PH
COX2.8472	5'-CACTGTCACAAGA TGGCA-3'	5'-CAAGACAGCTTCTTTT GGTATA-3'	5'-TACTTTTGGTCATTTT CTGTATC-FL	5'-LC Red640- ACAAAACAGGTATCAGTGCA TTATTAATGA-PH

Cuadro 2. Parámetros funcionales y estadios radiológicos de los pacientes con sarcoidosis incluidos.

Variable	Valor*
ECA	75.2 ± 40.7
FVC (%)	88.5 ± 19.1
FEV1 (%)	85.7 ± 19.2
FEV1/FVC (%)	80.2 ± 8.9
CPT (%)	87.6 ± 17.7
KCO (%)	100.8 ± 23.1
PaO2	82.5 ± 10.1
Gradiente alvéolo-arterial	31.1 ± 24.8
Estadio radiológico	
Estadio 0	1 (2.0%)
Estadio 1	13 (25.5%)
Estadio 2	31 (60.8%)
Estadio 3	3 (5.9%)
Estadio 4	3 (5.9%)

* Valores expresados en media ± desviación estándar o en valores absolutos con los relativos entre paréntesis. ECA: enzima convertidora de angiotensina. FVC: Capacidad vital forzada. FEV1: Volumen espirado forzado en el primer Segundo. CPT: Capacidad pulmonar total. KCO: Cociente de Krogh. PaO2: Presión parcial de oxígeno en sangre arterial.

das en los cuadros 3 y 4. No se encontraron diferencias significativas en las distintas poblaciones celulares ni en el cociente CD4/CD8 entre los centros que empleaban un volumen instilado de 150 mL en tres alícuotas y los que empleaban 120 mL en seis

alícuotas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores del cociente CD4/CD8 entre los distintos centros participantes.

Los genotipos homocigotos para el polimorfismo resultaron poco frecuentes en nuestra población para los cuatro SNPs analizados (Cuadros 3 y 4). Encontramos un mayor porcentaje de linfocitos, menos neutrófilos y menos macrófagos en el LBA en los casos con el genotipo GG del polimorfismo COX2.5209, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo. El genotipo CC del polimorfismo COX2.8473T>C estaba moderadamente asociado a un cociente elevado CD4/CD8 en el LBA (Cuadro 3; CC 11.2 ± 5.5 vs. CT+TT 4.4 ± 3.5; p = 0.022; β = 7.43; IC 95 %: 1.38 – 13.48). El resto de polimorfismos (Cuadro 4) no alcanzaron la significación estadística en las comparaciones.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que el polimorfismo 8473T>C de la COX-2 está asociado a un cociente CD4/CD8 en el LBA significativamente elevado. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que encuentra una asociación de esta naturaleza en pacientes con sarcoidosis.

La elevación del cociente CD4/CD8 es característica de la sarcoidosis. Costabel¹² demostró que un cociente CD4/CD8 superior a 3.5 tiene una sensibilidad de 53% y una especificidad de 94%, un valor pre-

Cuadro 3. Hallazgos en el lavado broncoalveolar y su relación con los polimorfismos estudiados.

	Global	COX2.5209			Valor p*	COX2.8473			Valor p*
		T/T n = 28 (54.9 %)	T/G n = 21 (41.2 %)	G/G n = 2 (3.9 %)		T/T n = 20 (39.2 %)	C/T n = 25 (49 %)	C/C n = 6 (11.8%)	
Macrófagos	56.9 ± 19.4	53.8 ± 17.7	62 ± 20.3	37 ± 9.8	NS	54.5 ± 19.1	60.3 ± 19.5	48 ± 19.7	NS
Linfocitos	37.9 ± 21.4	41.8 ± 21.4	31.1 ± 20.3	58.5 ± 7.7	NS	38.7 ± 18.6	33.1 ± 20.9	55.6 ± 24.9	NS
Neutrófilos	6.1 ± 8.3	6.6 ± 9.8	4.7 ± 6.2	2.5 ± 0.7	NS	4.9 ± 9.4	6.6 ± 7.9	2.6 ± 2	NS
Eosinófilos	0.8 ± 1.3	0.8 ± 1.2	0.9 ± 1.5	1 ± 0	NS	0.9 ± 1.3	0.9 ± 1.4	0.2 ± 0.5	NS
Cociente CD4/CD8	5.06 ± 4.1	5.4 ± 4.1	4.1 ± 4.2	-	NS	5.4 ± 3.3	3.2 ± 3.7	11.2 ± 5.5	0.034

* Calculado mediante test de Kruskal-Wallis. Datos expresados en porcentaje respecto al total de células, salvo el cociente CD4/CD8 expresado en valor absoluto. NS: no significativo.

Cuadro 4. Hallazgos en el lavado broncoalveolar y su relación con los polimorfismos estudiados.

	Global	COX2.926			Valor p*	COX2.3050			Valor p*
		G/G n = 28 (54.9 %)	G/C n = 20 (39.2 %)	C/C n = 3 (5.9 %)		G/G n = 36 (70.6 %)	G/C n = 13 (25.5 %)	C/C n = 2 (3.9 %)	
Macrófagos	56.9 ± 19.4	54.3 ± 17.5	60 ± 20	55.3 ± 32.5	NS	56.3 ± 20.2	58.4 ± 18.3	57 ± 0	NS
Linfocitos	37.9 ± 21.4	41.6 ± 21.6	32.6 ± 20	41.6 ± 29.6	NS	38.7 ± 22.3	34.0 ± 20.5	47.5 ± 6.3	NS
Neutrófilos	6.1 ± 8.3	6.3 ± 9.2	5.2 ± 7.3	2 ± 1 1	NS	5.5 ± 8	6.1 ± 8.9	0 ± 0	NS
Eosinófilos	0.8 ± 1.3	0.9 ± 1.2	0.8 ± 1.5	0.5 ± 0.7	NS	0.8 ± 1.4	1.0 ± 1.9	0 ± 0	NS
Cociente CD4/CD8	5.06 ± 4.1	5.4 ± 4.1	4.1 ± 4.2	-	NS	4.8 ± 4.3	5.7 ± 4.8	4.9 ± 0.9	NS

* Calculado mediante test de Kruskal-Wallis. Datos expresados en porcentaje respecto al total de células, salvo el cociente CD4/CD8 expresado en valor absoluto. NS: No significativo.

dictivo positivo de 76% y negativo de 85%. En otras palabras, un cociente CD4/CD8 > 3.5 confiere un diagnóstico de sarcoidosis con una especificidad de 94% aunque la biopsia transbronquial no haya sido diagnóstica.¹¹ En este sentido, recientemente se ha descrito el uso de este cociente en el esputo inducido para el diagnóstico de la enfermedad.¹⁸ Sin embargo, hasta el momento no disponíamos de algún estudio que relacionara este hallazgo con alguna alteración del genotipo.

Numerosos trabajos previos han investigado la presencia de alteraciones genéticas en la sarcoidosis, entre las que caben destacar los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad,¹⁹ las proteínas heat-shock,²⁰ diversas citoquinas,²¹ o la propia enzima convertidora de angiotensina.²² Sin embargo, la mayoría de estos trabajos tienen por objetivo evaluar el riesgo de aparición de la enfermedad o su pronóstico, sin profundizar en las diferencias de expresión clínica o en la celularidad del LBA.

El presente trabajo evalúa las alteraciones en la celularidad del LBA en la sarcoidosis. En este sentido, Grunewald, *et al.* encontraron una expansión de un subtipo de células CD4 con receptor AV2S3+ en aquellos pacientes que compartían un alelo determinado del HLA-DR.²³ Igualmente, Roberts, *et al.* sugirieron que las células con mayor expansión serían las CD4+ CD28-.²⁴ El diseño del presente estudio no nos ha permitido evaluar si la expansión de células CD4 detectadas en los portadores del genotipo CC del polimorfismo COX2.8473 expresan algunos de estos fenotipos.

El polimorfismo COX2.8473 ha sido previamente estudiado en otras patologías respiratorias como cáncer de pulmón de células no pequeñas.¹⁶ Dicho polimorfismo está localizado cerca del codón de parada en la región 3'-UTR. La unión de proteínas a este sitio, puede controlar la estabilidad del ARNm y su degradación, por lo que los polimorfismos de esta región pueden influir en su expresión, lo que sugiere una función reguladora.

Existen tres limitaciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar nuestros resultados. En primer lugar, el tamaño muestral fue pequeño. Por lo general, el análisis de polimorfismos genéticos requiere un elevado número de pacientes evaluados para evitar errores en el análisis de resultados, por lo que los resultados deben interpretarse con precaución. Actualmente, las técnicas de imagen disponibles y los avances diagnósticos²⁵ han hecho que algunos autores cuestionen el LBA en el algoritmo diagnóstico de la sarcoidosis²⁶ y que se use menos frecuentemente, lo que dificulta la inclusión de casos a pesar de contar con la participación de seis centros. Es posible que al aumentar el tamaño muestral se consigan obtener nuevas asociaciones a la descrita en el presente trabajo.

Una segunda limitación del presente trabajo es la naturaleza transversal del diseño. En el presente estudio hemos considerado la celularidad del LBA en un punto de tiempo sin tener en cuenta la evolución posterior de esta celularidad. Sin embargo, es probable que esta celularidad cambie durante la progre-

sión de la enfermedad, ya que se ha descrito como factor pronóstico.²⁷ Desafortunadamente, no disponemos de datos de la evolución de esta celularidad en nuestros pacientes, lo que nos ha impedido realizar este análisis.

Finalmente, otra posible limitación del presente trabajo es la diferente técnica empleada para la realización del LBA en cada centro en número de alícuotas y volumen instilado. Como se desprende de los resultados, la técnica de realización del LBA resultó no ser relevante en la distribución celular encontrada. En este sentido, este hallazgo ha sido recientemente descrito por Schildge, *et al.*,²⁸ quienes no encuentran diferencias en la celularidad del LBA según la cantidad recuperada de líquido en el estudio de la patología intersticial pulmonar.

La COX es una enzima que regula la formación de prostaglandinas participando en la formación de prostaciclina, tromboxano y otras prostaglandinas como la PGE₂. En este sentido, se ha demostrado que el cociente PGF_{2α}/PGE₂ está significativamente elevado en pacientes con sarcoidosis frente a controles.⁷ Igualmente, otros polimorfismos sobre la cascada de las prostaglandinas han demostrado estar asociados con la presencia de la enfermedad y su pronóstico.⁹ Por todo esto, se podría plantear la hipótesis de que una alteración en la cascada de las síntesis de prostaglandinas sería la responsable del efecto observado en la celularidad del LBA, ya que éstos y otros productos del metabolismo de la COX están implicados en la respuesta inmunológica celular.²⁹ En esta cascada, se ha dado más importancia a la PGE₂, sobre todo, en términos pronósticos, ya que esta prostaglandina se ha relacionado con diversas enfermedades fibrosantes del pulmón.^{2,30} Sin embargo, el resto de prostaglandinas que se producen en esta cascada también tienen efectos biológicos reconocidos e importantes, entre los que cabe destacar la regulación del tono vascular o de la coagulación.³¹ Con los datos del presente trabajo no podemos dilucidar cuál de estos elementos estarían implicados en la expresión del LBA ni los mecanismos moleculares que acontecen tras este fenómeno, que debería ser objeto de futuros trabajos.

En definitiva, los hallazgos del presente estudio indican por primera vez una relación entre el polimorfismo COX2.8473T>C y el cociente CD4/CD8 del LBA en pacientes con sarcoidosis. Este hallazgo no ha sido descrito previamente y debería ser confirmado en futuros trabajos de mayor tamaño y naturaleza longitudinal que determine la relevancia clínica del hallazgo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por becas de investigación de la Fundación Neumosisur y de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (SAS64/04).

REFERENCIAS

- Charbeneau RP, Peters-Golden M. Eicosanoids: mediators and therapeutic targets in fibrotic lung disease. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108: 479-91.
- Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest* 1994; 93: 391-6.
- Pang L, Pitt A, Petkova D, Knox AJ. The COX-1/COX-2 balance in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1050-8.
- Brilla CG, Zhou G, Rupp H, Maisch B, Weber KT. Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. *Am J Cardiol* 1995; 76: 8D-13D.
- Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1995; 95: 1861-8.
- Lama V, Moore BB, Christensen P, Toews GB, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 752-8.
- Wolter NJ, Kunkel SL, Lynch JP III, Ward PA. Production of cyclooxygenase products by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1983; 83: 79S-81S.
- Petkova DK, Clelland CA, Ronan JE, Lewis S, Knox AJ. Reduced expression of cyclooxygenase (COX) in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Histopathology* 2003; 43: 381-6.
- Hill MR, Papafili A, Booth H, Lawson P, Hubner M, Beynon H, et al. Functional Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Polymorphism Predicts Poor Outcome in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 915-22.
- Lopez-Campos JL, Rodriguez-Rodriguez D, Rodriguez-Beceerra E, Alfageme Michavila I, Guerra JF, Hernandez FJ, et al. Cyclooxygenase-2 polymorphisms confer susceptibility to sarcoidosis but are not related to prognosis. *Respir Med* 2009; 103: 427-33.
- Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736-55.
- Costabel U. Sensitivity and specificity of BAL findings in sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1992; 9(Suppl. 1): 211-4.
- Siltzbach LE, James DG, Neville E, Turiaf J, Battesti JP, Sharma OP, et al. Course and prognosis of sarcoidosis around the world. *Am J Med* 1974; 57: 847-52.
- Kilinc G, Kolsuk EA. The role of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11: 417-21.
- Skarke C, Schuss P, Kirchhof A, Doebring A, Geisslinger G, Lötsch J. Pyrosequencing of polymorphisms in the COX-2 gene (PTGS2) with reported clinical relevance. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1643-60.
- Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 229-35.

17. Bernard PB, Witter CT. Homogenous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem* 2000; 46: 147-8.
18. Fireman E, Boikaner T, Priel IE. Combined CD4/CD8 ratio in induced sputum and pulmonary function testing for non-invasive identification of sarcoidosis. *Transl Res* 2006; 148: 87-95.
19. Mrazek F, Holla LI, Hutyrova B, Znojil V, Vasku A, Kolek V, et al. Association of tumour necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Lofgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2005; 65: 163-71.
20. Spagnolo P, Sato H, Marshall SE, Antoniou KM, Ahmad T, Wells AU, et al. Association between heat shock protein 70/Hom genetic polymorphisms and uveitis in patients with sarcoidosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 3019-25.
21. Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Jinushi E, Ito A, Kawakami Y. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 2021-23.
22. Furuya K, Yamaguchi E, Kawakami Y. [Angiotensin-converting enzyme (ACE) polymorphism and serum ACE activities in sarcoidosis]. *Nippon Rinsho* 1994; 52: 1561-66.
23. Grunewald J, Wahlstrom J, Berlin M, Wigzell H, Eklund A, Olerup O. Lung restricted T cell receptor AV2S3+ CD4+ T cell expansions in sarcoidosis patients with a shared HLA-DRbeta chain conformation. *Thorax* 2002; 57: 348-52.
24. Roberts SD, Kohli LL, Wood KL, Wilkes DS, Knox KS. CD4+CD28-T cells are expanded in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2005; 22: 13-9.
25. Fernández-Villar A, Botana MI, Leiro V, Represas C, González A, Mosteiro M, Piñeiro L. Utilidad clínica de la punción transbronquial de adenopatías mediastínicas en el diagnóstico de la sarcoidosis en estadios I y II. *Arch Bronconeumol* 2007; 43: 495-500.
26. Nagai S, Izumi T. Bronchoalveolar lavage. Still useful in diagnosing sarcoidosis? *Clin Chest Med* 1997; 18: 787-97.
27. Bacha D, Ayadi-Kaddour A, Ismail O, El Mezni F. Bronchoalveolar lavage impact in sarcoidosis: study of 40 cases. *Tunis Med* 2009; 87: 38-42.
28. Schildge J, Nagel C, Grun C. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases: does the recovery rate affect the results? *Respiration* 2007; 74: 553-7.
29. Stenson WF, Parker CW. Prostaglandins, macrophages, and immunity. *J Immunol* 1980; 125: 1-5.
30. Lama V, Moore BB, Christensen P, Toews GB, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 752-8.
31. López-Campos Bodineau JL, García Polo C, León Jiménez A. Fármacos inhibidores de la agregación plaquetaria y sangrado en broncoscopia. *Neumosur* 2006; 18: 94-101.

Reimpresos:

Dr. José Luis López-Campos.

Unidad Médico-Quirúrgica de
Enfermedades Respiratorias
Hospital Universitario Virgen del Rocío
Edif. Laboratorios, planta baja.
Av. Manuel Siurot, S/N. 41013
Sevilla. España.
Tel.: +34 955013167. Fax: +34 955013168.
Correo electrónico: lcampos@separ.es

Recibido el 24 de noviembre de 2009.

Aceptado el 12 de abril de 2010.