



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

PAPEL DE LA FAMILIA DE LAS GALECTINAS COMO MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS EN EL ASMA



**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REALIZADO PARA LA
OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA POR
SILVIA SÁNCHEZ CUÉLLAR**

**DIRIGIDA POR LOS PROFESORES
F. SÁNCHEZ MADRID Y J. ANCOCHEA BERMÚDEZ**

MADRID 2013

FRANCISCO SÁNCHEZ MADRID, CATEDRÁTICO DE INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JULIO ANCOCHEA BERMÚDEZ, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

INFORMAN:

Que D^a. Silvia Sánchez Cuéllar ha realizado bajo nuestra dirección, durante los últimos tres años, la Tesis Doctoral “El papel de la familia de las galectinas como moléculas inmunorreguladoras en el Asma”.

Estimamos que su trabajo es novedoso y original, además de reunir los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptada su presentación.

Madrid, a 2 de Abril de 2013

Francisco Sánchez Madrid

Julio Ancochea Bermúdez

A mi Padre,

Por la ilusión que le hubiera hecho vivir este momento y

por haberme enseñado los valores más importantes de la vida

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor Julio Ancochea Bermúdez, por creer en mí y en este proyecto, por sus grandes consejos a lo largo de todos estos años.
- Al Profesor Francisco Sánchez Madrid, por su generosidad, por ser un ejemplo constante de trabajo para mí, y por contagiarme su positividad y optimismo ante las adversidades.
- A Hortensia de La Fuente, por su ayuda, por su tiempo y su dedicación en la elaboración de este trabajo; sin ella esta tesis nunca se hubiera realizado.
- A Rosa Girón, por su sonrisa, su atención y su entusiasmo en este y otros proyectos.
- A Carolina Cisneros, por sus sabios consejos en el maravilloso mundo del Asma y por sus buenas críticas en la lectura de esta tesis.
- A todo el Servicio de Neumología del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid, en particular a todos los adjuntos, residentes, enfermeras, auxiliares, Alberto y Manoli, por su ayuda y colaboración. Y en especial a Rosa Mar Gómez Punter y a María García Santano por ser las mejores y más grandes "esputadoras" de este trabajo.
- A todo el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid, en especial, a Alicia Vara por hacer que el día a día en el "labo" sea mejor y más divertido; a M^a Angeles Vallejo por su ayuda en los momentos caóticos del papeleo y en otros personales más duros.
- Al Profesor Carlos Gamallo, por sus consejos y recomendaciones en la elaboración de este trabajo de investigación y sobre todo por su amabilidad y su cariño.
- Al Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo, por la concesión del Contrato de Formación en Investigación "Río Hortega", que ha supuesto una gran oportunidad en mi formación como investigadora (Expte CM 08/00024).
- A mis hermanos, Ramón, Mercedes y Javier por estar siempre ahí.
- Particularmente, a mis padres, Mercedes y Ramón, por el sacrificio que hicieron para que estudiara la carrera más bonita y apasionante del mundo.
- En especial, a Tomás, por su esfuerzo y ayuda en los momentos más difíciles y duros de mi vida y por hacerme sentir mejor cuando está a mi lado.
- Y por último, y no por ello menos importante, a todos los pacientes sin cuya colaboración y ayuda desinteresada jamás se podría haber realizado este trabajo.

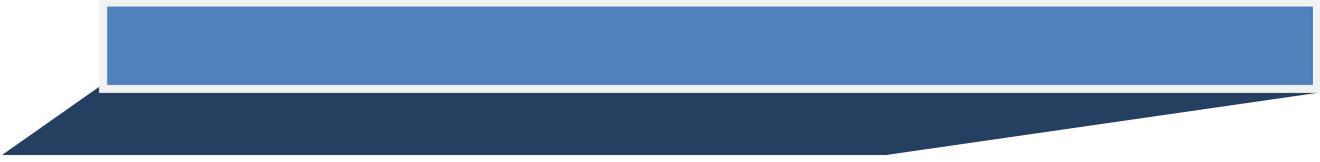
INDICE



| | |
|--|-----------|
| I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 9 |
| A. Asma | |
| B. Galectinas | |
| C. Estudio de la Inflamación Bronquial | |
| D. Esputo inducido | |
| II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 53 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 56 |
| A. Protocolo del estudio | |
| B. Selección de los sujetos incluidos en el estudio | |
| C. Aspectos éticos | |
| D. Métodos empleados | |
| E. Técnica de inducción de esputo | |
| F. Procesamiento del esputo inducido | |
| G. Técnicas inmunológicas que se realizaron con las muestras de esputo | |
| H. Efecto de las galectinas sobre la producción de citoquinas por células mononucleares derivadas de sangre periférica | |
| I. Análisis estadístico | |
| IV. RESULTADOS | 89 |
| A. Características clínicas de los pacientes y sujetos sanos | |
| B. Citospin de las muestras de esputo inducido | |
| C. Análisis de las células de esputo por citometría de flujo | |
| D. Expresión de las galectinas y citoquinas Th2 en las células de esputo por RT-PCR | |
| E. Expresión de las galectinas en los leucocitos del esputo medido por citometría de flujo e inmunofluorescencia | |
| F. Relación de las galectinas con el estado atópico | |
| G. Relación de las galectinas con el hábito tabáquico | |
| H. Asociación de las galectinas con la dosis de esteroides inhalados | |
| I. Asociación de la galectina 9 con la Fracción exhalada de Óxido Nítrico | |
| J. Producción de citoquinas por las galectinas | |

| | |
|---|------------|
| V. DISCUSIÓN | 109 |
| A. Discusión del método | |
| B. Discusión de los resultados | |
| VI. CONCLUSIONES | 123 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 125 |
| VIII. CLAVES DE LAS ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS | 149 |
| IX. ANEXOS | 151 |
| 1. Consentimiento informado de la técnica de Inducción de Esputo- Hoja de información del estudio- Protocolo de la técnica de Inducción de Esputo- hoja de análisis del Esputo Inducido- Aprobación del estudio por el CEIC- Cuestionario ACT. Clasificación de la GINA | |
| 2. Base de datos de los pacientes y donantes sanos | |
| 3. Publicaciones obtenidas en el transcurso de la realización de la tesis | |

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



A. ASMA

Prevalencia, Morbilidad y Mortalidad

El asma es una de las enfermedades respiratorias crónicas más prevalentes en la actualidad y se considera un importante problema de salud. Se calcula que afecta a unos 300 millones de personas a nivel mundial y que la prevalencia global del asma varía del 1% al 18% de la población, según los diferentes países, como muestra la Figura 1 (1). Hay evidencias que estiman que la prevalencia del asma ha aumentando recientemente en algunos países, pero se ha estabilizado en otros. Sin embargo, la carencia de una definición precisa y universalmente aceptada sobre la enfermedad impide la posibilidad de realizar una comparación fiable sobre la prevalencia entre los diferentes países del mundo. En España, se estima que alrededor de un 5% de la población padece asma según datos del Estudio Europeo de Salud Respiratoria (2).

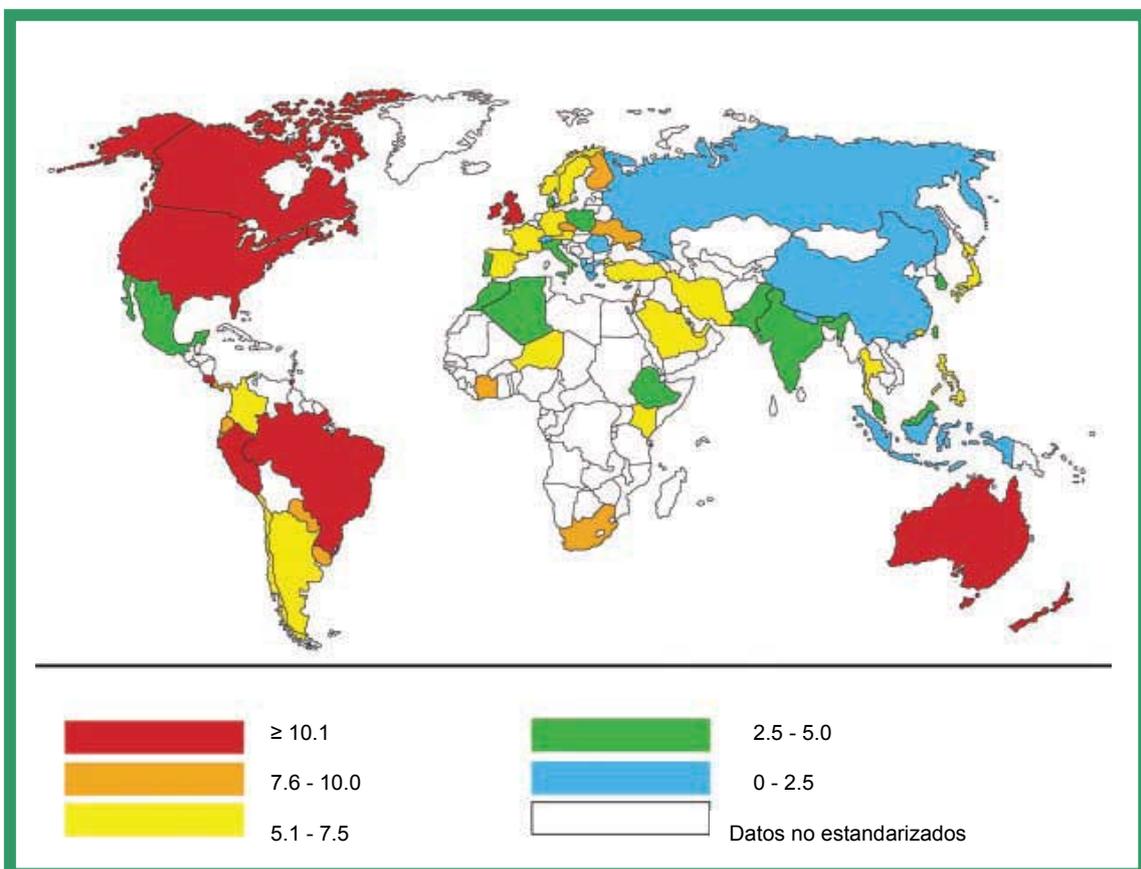


Figura 1. Prevalencia mundial del asma. Modificado de (1)

Las muertes mundiales por asma se han estimado en 250.000 por año y la mortalidad no parece correlacionarse con la prevalencia como se demuestra en la Figura 2 (1, 3).

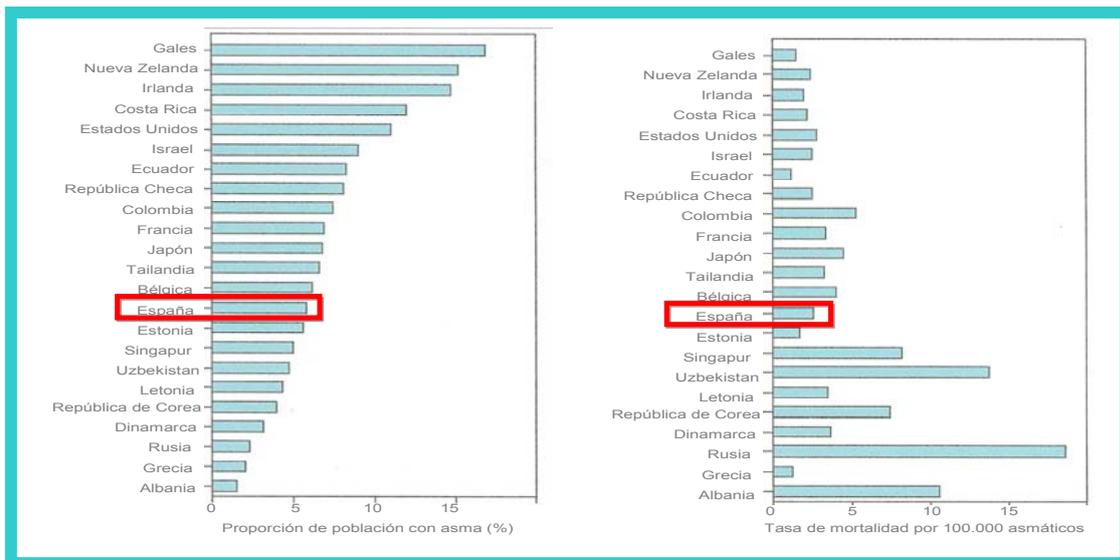


Figura 2. Relación entre la prevalencia y la mortalidad en el asma a nivel mundial. Modificado de (1)

El asma supone un gran impacto en la sociedad por el importante gasto sanitario que conlleva y por la gran pérdida de productividad que ocasiona en el estilo de vida del enfermo. Esta enfermedad es la causa más frecuente de absentismo laboral en países tan desarrollados como Australia, Suecia, Reino Unido o Estados Unidos (4-6).

Definición de asma

La Estrategia Global para el Manejo y Prevención del Asma (GINA) (7) define el asma como *“Inflamación crónica de las vías aéreas en la que desempeñan un papel destacado determinadas células y mediadores. Este proceso se asocia a la presencia de hiperrespuesta bronquial que produce episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, particularmente durante la noche o la madrugada. Estos episodios se asocian generalmente con un mayor o menor grado de obstrucción al flujo aéreo a menudo reversible de forma espontánea o con tratamiento”*.

El asma es un trastorno definido por sus características clínicas, fisiológicas, y patológicas. Las *características clínicas* que predominan son los episodios de dificultad respiratoria, particularmente en la noche, acompañada frecuentemente por tos, siendo las sibilancias el hallazgo físico encontrado más frecuentemente. La *característica fisiológica* del asma es la hiperreactividad de la vía aérea. La *característica patológica* predominante es la inflamación de la vía aérea, asociada, a veces, a cambios estructurales de la misma.

Los síntomas típicos del asma son la disnea, la tos, las sibilancias y la opresión torácica. Estos síntomas son característicos, pero no específicos de la enfermedad. Aunque lo que caracteriza a la enfermedad es que dichos síntomas suelen ser variables, intermitentes, empeoran por la noche y son desencadenados por diversos estímulos.

La hiperreactividad de la vía aérea es la característica funcional principal del asma, la cual provoca un estrechamiento de la vía aérea en respuesta a estímulos que serían inocuos en personas sanas. Este estrechamiento a su vez provoca una limitación variable del flujo aéreo y, por tanto, síntomas intermitentes.

Inflamación de la vía aérea en el asma

En la actualidad, el asma está considerado como un trastorno de origen inflamatorio producido en la vía aérea, en el que participan diferentes células inflamatorias y múltiples mediadores que dan lugar a los cambios fisiopatológicos característicos (8). De una manera aún no del todo aclarada, este patrón de inflamación está fuertemente asociado a la hiperreactividad de la vía aérea y a los síntomas de la enfermedad.

Alrededor de cien citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, liberados por las células inflamatorias y estructurales de la vía aérea, crean un entorno complejo de señalización, e intervienen en la respuesta inflamatoria que existe en el asma. La disminución del calibre de la vía aérea es el evento final común, que conduce a los síntomas y a los cambios fisiológicos en el asma.

El asma ha sido clasificada desde que se comenzó a estudiar como asma “no alérgico” o “intrínseco” y asma “alérgico” o “extrínseco”. El asma “alérgico” en contraposición al “no alérgico” se caracteriza por niveles elevados de la Inmunoglobulina E (IgE) en suero y por la presencia de otras manifestaciones alérgicas. Sin embargo, esta clasificación es meramente esquemática ya que la mayoría de las características clínicas se superponen y el patrón de inflamación parece ser similar en todas las formas clínicas de asma, ya sea alérgica, no-alérgica o inducida por aspirina, y en todas las edades. La mayor parte de los estudios de los que deriva nuestro conocimiento sobre la inmunopatogénesis del asma proviene de investigaciones realizadas en modelos animales de asma alérgico. Por este motivo, a lo largo de la tesis, encontraremos que las definiciones y modelos propuestos se refieren a este tipo de asma.

El cuadro clínico del asma es muy variable y se observan diferentes patrones celulares, pero la presencia de la inflamación es persistente. El proceso inflamatorio afecta a toda la vía aérea incluyendo, en la mayoría de los pacientes, el tracto respiratorio superior y la nariz, aunque estos efectos son más pronunciados en los bronquios de mediano calibre.

Patogénesis del asma

El asma es una enfermedad multifactorial, que se desarrolla en un individuo previamente susceptible sobre el que interactúan una serie de factores entre los que destacan los factores ambientales, los factores propios del huésped y los factores desencadenantes. En la patogenia del asma existen tres pilares básicos: la disfunción del músculo liso, la remodelación de la vía aérea y el proceso de inflamación, tanto aguda como crónica.

La remodelación bronquial se produce de forma paralela al proceso de inflamación, y conlleva una serie de cambios estructurales secundarios a los fenómenos de reparación-

cicatrización. La remodelación es la consecuencia final de una pérdida progresiva de función pulmonar, que es proporcional a la duración y gravedad de la enfermedad (9). Se ha estipulado que la inflamación crónica produce la remodelación en la vía aérea, observándose alteraciones estructurales responsables de la patogénesis y de las manifestaciones clínicas del asma.

El modelo actual del asma, que se representa en la figura 3, propone que el daño epitelial, ocasionado por factores ambientales y/o infecciosos, favorece la migración de las células dendríticas (DCs o del inglés *dendritic cells*). En la fase de sensibilización, las DCs procesan a los antígenos (o alérgenos) y migran hacia los ganglios linfáticos locales donde interactúan con linfocitos T (LT) vírgenes o *naïve* induciendo la diferenciación de las células T, principalmente a células T *helper 2* (Th2). Diferentes citoquinas y quimioquinas influyen en la activación de las DCs y en la maduración de los linfocitos Th2 así como en su migración hacia la mucosa epitelial. Las citoquinas producidas por los linfocitos Th2 inducen la producción de la IgE y otros cambios asociados al asma como la eosinofilia de la vía aérea, la linfocitosis pulmonar y la mastocitosis. Cuando se produce una nueva exposición al alérgeno, se desencadena una respuesta donde la IgE unida a la superficie de los mastocitos tiene un papel esencial al inducir la secreción de mediadores que activan, a su vez, a las células del sistema inmune innato, como los eosinófilos y a las células del sistema inmune adaptativo, principalmente, células Th2 perpetuando así la respuesta inflamatoria en el asma.

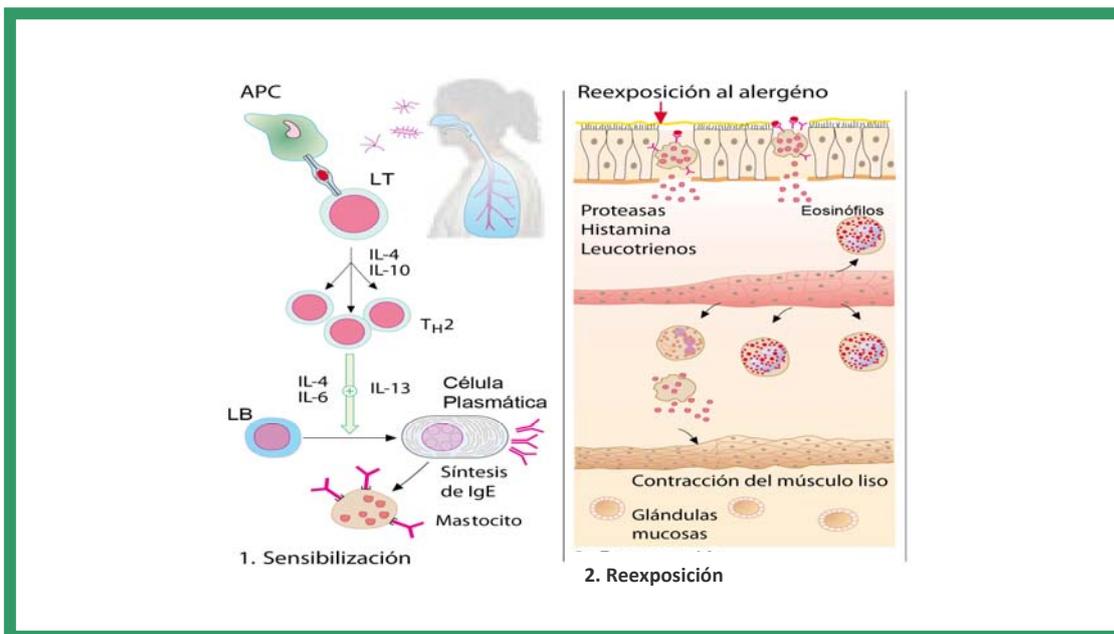


Figura 3. La sensibilización a los alérgenos puede ocurrir durante la infancia. Las células presentadoras de antígeno de la mucosa bronquial capturan al alérgeno inhalado y lo presentan a los LT CD4+, los cuales se diferencian a un fenotipo Th2. Estas células secretan interleuquina (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13, las cuales promueven la producción de IgE por parte de los linfocitos B. La IgE se une a su receptor FcεRI en los mastocitos, basófilos, eosinófilos y macrófagos. Durante la fase de exposición, el alérgeno puede interactuar de forma muy rápida con las moléculas de IgE ya unidas a la superficie de la membrana celular induciendo la liberación de mediadores tales como la histamina, proteasas, leucotrienos y prostaglandinas, entre otros. Modificado de (10)

Los principales componentes que actúan en la patogénesis del asma se resumen en la tabla 1.

| PRINCIPALES COMPONENTES QUE ACTÚAN EN LA PATOGÉNESIS DEL ASMA | |
|--|--|
| CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE INNATO | CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO |
| <ul style="list-style-type: none"> • Mastocitos • Eosinófilos • Basófilos • Neutrófilos • Células dendríticas • Monocitos-Macrófagos | <ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T <i>helper</i> (Th2, Th17, T reguladoras) • Linfocitos B <p>MOLÉCULAS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inmunoglobulina E • Citoquinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-17, IL-25, IL-33,..) |

Tabla 1: Principales componentes que actúan en la patogénesis del asma

• **Inmunoglobulina E**

Desde su descubrimiento en 1967, la IgE ha tenido un papel importante en muchas enfermedades alérgicas, incluyendo el asma o la rinitis. En la actualidad, se considera que la IgE actúa como parte de una red de proteínas, las cuales incluyen sus dos principales receptores, FcεRI (receptor de alta afinidad de IgE) y CD23 (receptor de baja afinidad de IgE), así como la galectina 3 (gal-3) que es una proteína de unión a FcεRI y a IgE. El FcεRI se expresa en los basófilos, en los mastocitos, en las células presentadoras de antígeno (CPA), en los monocitos, en los eosinófilos y en las células del músculo liso. Aunque la gal-3 será descrita en detalle más adelante, es importante resaltar que esta galectina (gal) se describió, en primer término, como proteína de unión *Epsilon*, por su capacidad de unirse tanto a la IgE como al FcεRI (11-13).

La IgE se encuentra predominantemente en las mucosas siendo esta inmunoglobulina (Ig) una de las primeras moléculas de defensa que un patógeno encuentra al invadir el organismo. La IgE puede ser sintetizada localmente en la vía aérea encontrándose en el lavado broncoalveolar (LBA) de los pacientes asmáticos (14). En el asma, las poblaciones de células B y células plasmáticas de la mucosa del tracto respiratorio están altamente seleccionadas para producir IgE. En la respuesta alérgica, el entrecruzamiento de los complejos IgE-FcεRI sobre la superficie de los mastocitos como consecuencia de la unión a los alérgenos, lleva a la degranulación de los mastocitos y a la síntesis de mediadores inflamatorios que a su vez inducirán el reclutamiento de células inflamatorias al lugar donde se encuentra el alérgeno. Por su parte, la unión de la IgE al FcεRI sobre la superficie de las DCs, resulta en el procesamiento y la presentación del alérgeno a las células Th2, participando así en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa (15). Como veremos más adelante, la IL-4 e IL-13 secretadas por las células Th2 inducen a su vez la expresión de IgE. Los niveles de IgE en el asma se correlacionan positivamente con la presencia de síntomas, con la hiperreactividad bronquial

(HRB), con la eosinofilia, con las crisis agudas o exacerbaciones asmáticas (16, 17). En la figura 4 se representa la producción de IgE a partir de las células del sistema inmune.

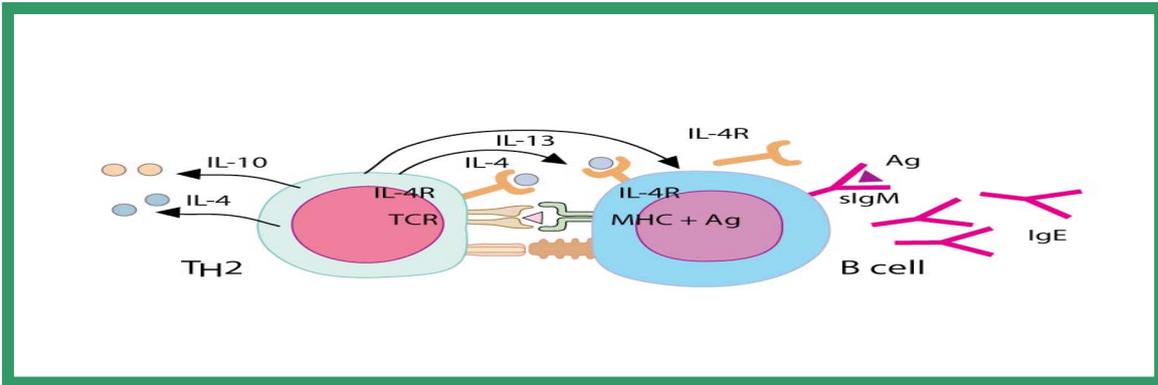


Figura 4. Producción de IgE. Los antígenos captados por las CPA son presentados a los LT vírgenes en presencia de IL-4 o IL-13 favoreciendo así la diferenciación a los linfocitos Th2. Estos, a su vez, interactúan con los linfocitos B a través del complejo mayor de histocompatibilidad-II y las moléculas coestimuladoras y secretan IL-4 e IL-13 que inducen la producción de IgE. Modificado de (10)

- **Mastocitos o células cebadas**

Los mastocitos o células cebadas son células mononucleares, derivadas de la médula ósea, que se encuentran presentes en prácticamente todos los tejidos vascularizados y se localizan preferentemente cerca de las superficies de entrada de agentes patógenos incluyendo el epitelio de las vías aéreas (18, 19).

Los diferentes estímulos o sustancias exógenas y endógenas, así como la señal mediada por la IgE y su receptor son capaces de inducir la activación de los mastocitos, lo que produce la secreción de diferentes productos con actividad biológica que se encuentran almacenados en los gránulos citoplásmicos preformados del mastocito. En una persona alérgica, los mastocitos y otros tipos celulares disponen de IgE específica de antígeno unida ya al FcεRI y son liberados al medio pocos minutos después del reconocimiento antigénico (20).

Los mastocitos de los asmáticos tienen especial facilidad para degranularse ante estímulos que afectan a la osmolaridad del medio como el ejercicio y la hiperventilación. Como se ha mencionado antes, los mastocitos tienen en su superficie una gran número de receptores de alta afinidad para IgE y cuando se produce la unión de la IgE con su receptor, el mastocito libera mediadores preformados, produciéndose, además la síntesis de novo de éstos y otras citoquinas. Entre estos mediadores se encuentran la histamina, los cisteinileucotrienos o las prostaglandinas D₂, que son importantes broncoconstrictores que amplifican la respuesta inflamatoria y alérgica y liberan diferentes citoquinas, activan células de la respuesta inmune innata (eosinófilos, basófilos, neutrófilos y monocitos-macrófagos) y de la respuesta inmune adaptativa (células Th2, y otros tipos de células T y B), que a su vez secretan quimioquinas y citoquinas, capaces de perpetuar la inflamación bronquial.

Los mastocitos infiltran los haces de células musculares lisas en el asma. El aumento de la concentración de los mastocitos, en el músculo liso de la vía aérea, parece estar relacionado con la HRB (21), como se muestra en la figura 5.

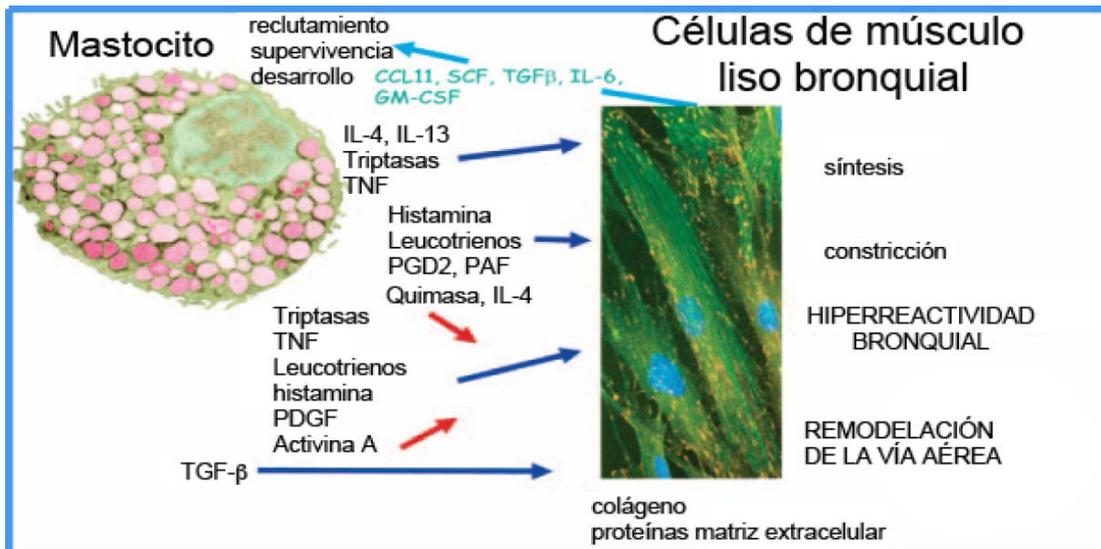


Figura 5. Interacción entre los mastocitos y el músculo liso bronquial. Los mastocitos producen una variedad de mediadores lipídicos, citoquinas, quimioquinas y enzimas que pueden interaccionar con las células musculares lisas bronquiales, inducir proliferación del músculo liso y participar en el desarrollo de la HRB. Modificado de (21).

• Eosinófilos

La participación de los eosinófilos, en los procesos que acompañan al asma, se describió hace ya más de 80 años y nuestros conocimientos sobre el papel de estas células continúan evolucionando en relación con los nuevos descubrimientos que se realizan en este campo (22). Muchos estudios han documentado la relación entre la eosinofilia pulmonar y el asma, siendo la infiltración eosinofílica una de las características principales del asma. Su número en sangre periférica y en el LBA se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (23), mientras que el grado de eosinofilia en la mucosa de las biopsias de pacientes asmáticos se correlaciona con la HRB (24). El aumento de los eosinófilos en el esputo puede predecir una pérdida de control del asma y existen diferentes ensayos clínicos randomizados que muestran que, ajustando la dosis de glucocorticoides inhalados (GCI), se reduce la eosinofilia en el esputo disminuyendo el número de exacerbaciones (25).

Los niveles de eosinófilos están aumentados en el asma atópica (alérgica) y no atópica (no alérgica), sugiriendo que su presencia no se relaciona, necesariamente, con una respuesta inmunitaria mediada por IgE (26). En condiciones normales, los eosinófilos tienen una vida media corta (entre 12 a 24 horas) que se ve aumentada ante la presencia de algunas citoquinas como la interleuquina (IL)-3, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15 y el factor estimulador de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF o del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) que prolongan su supervivencia e inhiben su apoptosis.

Los eosinófilos desempeñan un papel central en la remodelación. Constituyen la principal fuente de la citoquina profibrótica como es el factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β o del inglés *transforming growth factor beta*) induciendo proliferación de fibroblastos, síntesis de colágeno y maduración de miofibroblastos (27, 28). En la vía aérea de los sujetos asmáticos, la IL-3, GM-CSF y la eotaxina 1, 2 y 3 conducen a la diferenciación de los eosinófilos a partir de las células CD34⁺ precursoras de la médula ósea, mientras que la IL-

5, citoquina perteneciente a la familia de las células Th2, posee un papel importante en la diferenciación, modulación y activación de los eosinófilos (29, 30). Por lo tanto, un agente terapéutico frente a IL-5 en pacientes asmáticos podría ser útil. Además, actuando conjuntamente con las DCs, los eosinófilos regulan el reclutamiento de los linfocitos Th2 en respuesta a la sensibilización a alérgenos. Así, el papel central que juegan los eosinófilos y la IL-5 en la respuesta inflamatoria de los pacientes asmáticos se ha demostrado claramente en ensayos clínicos randomizados, donde al utilizar un anticuerpo monoclonal anti-IL-5, en pacientes con asma grave y con persistencia de eosinófilos, a pesar de estar tratados con altas dosis de esteroides, se observa una reducción en las exacerbaciones, junto con una disminución de los eosinófilos en sangre periférica y en el esputo (31, 32). Sin embargo, existen otros estudios, donde la terapia con anti-IL-5 en pacientes con asma reduce notablemente los eosinófilos en sangre, pero mínimamente el número de estos en el pulmón con escaso impacto en los resultados clínicos (33, 34). Estos resultados sugieren que los eosinófilos son células muy relevantes en un subgrupo de pacientes con asma grave.

- **Neutrófilos**

La participación del neutrófilo en la patogenia del asma está aún poco aclarada. Los neutrófilos tienen capacidad para liberar enzimas con actividad proteolítica (proteasas, elastasas, metaloproteinasas-9) y algunas citoquinas como la IL-1 β , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α o del inglés *tumor necrosis factor*), la IL-6 o la IL-8. El neutrófilo es la primera célula que se recluta en la reacción alérgica y juega un papel en el desarrollo del asma grave crónica con una importante influencia en la presentación clínica y en la aparición repentina de las crisis asmáticas, eliminándose por apoptosis durante la resolución de la respuesta alérgica (35). La infiltración neutrofílica se observa frecuentemente en el asma refractaria al tratamiento con obstrucción persistente de la vía aérea (36).

Los neutrófilos están presentes en gran número en la vía aérea y en el esputo de pacientes con asma grave (37), y en pacientes que fallecen de crisis asmática súbita (38). Además, se ha descrito un aumento del número de estas células en asmáticos fumadores y en aquellos con crisis asmáticas secundarias a infecciones víricas o a exposición a contaminantes. El incremento de los neutrófilos en estos enfermos puede ser secundario al tratamiento con esteroides (39), ya que reducen el número de eosinófilos en el esputo y aumenta el número de neutrófilos, al incrementar la expresión de la IL-8 que, a su vez, actúa como quimioatrayente de neutrófilos (40).

- **Macrófagos**

Los macrófagos están aumentados en la vía aérea y pueden ser activados por los alérgenos a través de los receptores para IgE de baja afinidad liberando mediadores inflamatorios y citoquinas que amplifican la respuesta inflamatoria (41). Los macrófagos alveolares, son una de las principales células del sistema inmune y se han implicado en la progresión y desarrollo del asma, ya que regulan la respuesta anti y proinflamatoria en la vía

aérea (42). Avances recientes sugieren que los macrófagos juegan un papel activo en la exacerbación de la respuesta Th2, en la inducción de la inflamación eosinofílica, en la remodelación de la vía aérea, en la fibrosis y en la hiperreactividad. La administración de macrófagos intranasalmente potencia la inflamación alérgica en ratones asmáticos. La IL-13 y la IL-4 son las citoquinas encargadas de estimular la diferenciación de los macrófagos en el pulmón tras el contacto con el alérgeno. Los macrófagos son una fuente extracelular importante de gal-3, que como veremos más adelante, se encuentra implicada en procesos alérgicos.

- **Basófilos**

Los basófilos juegan un papel crucial en el inicio de la inflamación alérgica a través de la unión de los receptores de alta afinidad para la IgE que tienen en su superficie con el alérgeno (43). Tras la interacción, se sintetizan y se liberan múltiples mediadores de la inflamación como la histamina, que participa en la respuesta inflamatoria tardía y son una fuente importante de citoquinas como la IL-4 e IL-13. Los basófilos, y no los mastocitos, son absolutamente indispensables para la diferenciación de las células Th2 a través de la producción de la IL-4 y del contacto directo célula-célula (44, 45).

- **Células dendríticas**

Las DCs son una población de CPA, que se encuentran subyacentes a la mucosa y asociadas al epitelio de la vía aérea. Estas células expresan receptores del sistema inmune innato y tienen la capacidad de captar y procesar alérgenos y presentarlos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) a los LT. Los microorganismos o contaminantes ambientales producen un daño en el epitelio bronquial de los asmáticos, que activa receptores de señalización en las células de la inmunidad innata que conlleva a la secreción de quimioquinas por parte de las células epiteliales de la vía aérea y al reclutamiento de las DCs inmaduras a la mucosa epitelial. En los individuos alérgicos, la captación de alérgenos está facilitada por la interacción de este con la IgE unida a su receptor de alta afinidad (FceRI). Las DCs captan los alérgenos de la superficie de la vía aérea y migran hacia los nódulos linfáticos regionales donde inducen la diferenciación de linfocitos Th2. Las DCs son capaces de detectar los alérgenos inhalados en ausencia de daño en la barrera epitelial, mediante la extensión de sus prolongaciones hacia la luz de la vía aérea. En muestras de esputo de pacientes asmáticos se ha detectado la presencia de estas células, que aumentan en número tras la exposición al alérgeno (46). En la figura 6 se resume el papel de las DCs durante la fase de sensibilización en el asma.

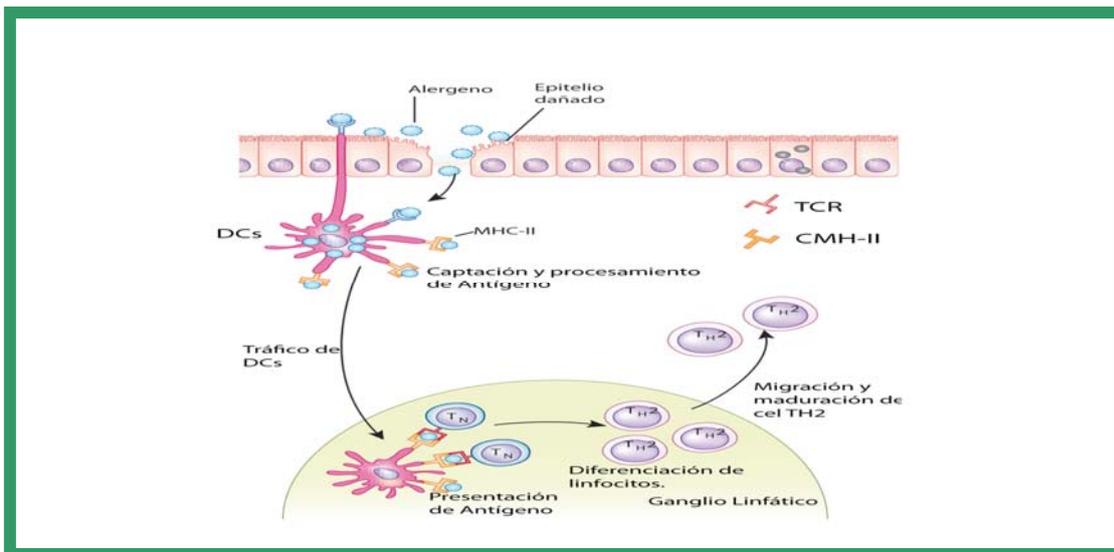


Figura 6. Papel de las células dendríticas en la fase de sensibilización. Las DCs procesan a los alérgenos detectados en el lumen de las vías aéreas, a través de sus prolongaciones o procesan aquellos alérgenos que han atravesado el epitelio previamente dañado. Las DCs migran a los ganglios locales donde presentan el antígeno a las células T vírgenes, a través del receptor de antígeno de las células T; CMH-II y las moléculas coestimuladoras, proceso que resulta en la diferenciación de los linfocitos Th2. Modificado de (47).

- **Linfocitos T CD4 colaboradores o helper**

Las alteraciones alérgicas, tales como el asma o la atopia, son causadas por alteraciones de la respuesta inmune. Los investigadores en el pasado han revelado que estas enfermedades son a menudo el resultado de una alteración entre los linfocitos Th1/Th2, los cuales son responsables de la respuesta humoral y de la respuesta de hipersensibilidad, respectivamente.

Actualmente las subpoblaciones Th1 y Th2 están muy bien caracterizadas, conociéndose los factores que influyen en su diferenciación, las citoquinas que producen y sus funciones en la respuesta a patógenos, tumores y autoantígenos (48, 49). Las células Th1 secretan, entre otras, el interferón gamma (IFN- γ) y regulan la inmunidad celular, mientras que las células Th2 secretan la IL-4, la IL-5, la IL-9 y la IL-13, mediando en la inmunidad humoral y en las respuestas alérgicas. Las citoquinas secretadas por las células Th2 se resumen en la figura 7.

La diferenciación de las células T *helper* está regulada por mecanismos transcripcionales específicos para cada linaje celular. Los mecanismos responsables de la diferenciación de linfocitos Th2 durante las fases iniciales de la sensibilización en el asma no están del todo definidos. Sin embargo, es claro que la polarización hacia una respuesta Th2 requiere de la presencia de IL-4. Esta citoquina gobierna la diferenciación hacia las células Th2, a través de la acción del factor de transcripción STAT-6 (50), que a su vez induce la expresión de la proteína 3 de unión de GATA (GATA-3), uno de los principales factores, junto con c-Maf de la diferenciación hacia las células Th2 (51).

Han pasado 20 años desde que el asma atópica se asoció a la activación de las células Th2 en la vía aérea (52). Estudios posteriores, tanto clínicos, genéticos como en modelos

animales han demostrado que las células Th2 actúan y participan también en el asma no atópico (53).

Las células Th2 tienen un papel primordial en la patogénesis del asma leve moderado, sin embargo, cuando la enfermedad comienza a ser más severa y crónica es posible que los linfocitos Th1 puedan actuar a través de la secreción de IFN- γ , la cual inhibe la proliferación de la respuesta Th2 (54). Durante la exacerbación asmática, las células Th1 y Th2 incrementan su número tanto en sangre como en el esputo (55). Se esperaría que las citoquinas Th1 tuvieran un papel inhibitorio en el asma al impedir el desarrollo de las células Th2 (56). En apoyo a esto, la inhibición del factor de transcripción T-bet asociado a la respuesta Th1 en ratones produce un desarrollo espontáneo de la HRB y de la eosinofilia (57). Sin embargo, cuando se administra el IFN- γ en las vías respiratorias de los pacientes con asma, no hay mejoría de los síntomas asociados a la enfermedad (58). En un modelo animal de asma alérgico crónico, se ha demostrado recientemente que la hiperreactividad de la vía aérea es dependiente del IFN- γ (59). La correlación entre el número de células Th2 y gravedad sugiere un papel esencial para las citoquinas Th2 en el asma (60). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que en el asma existen diferentes fenotipos clínicos como el asma eosinofílico o asma no eosinofílico sugiriendo que existen otros mecanismos además de las células Th2 que actúan en la fisiopatología de algunos pacientes (61).

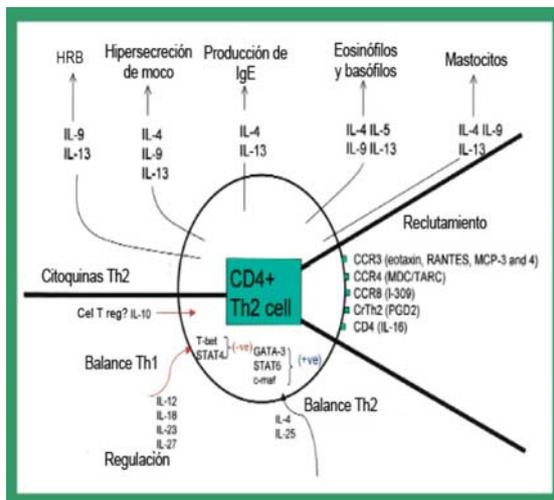


Figura 7. Representación de los factores que influyen en la regulación, reclutamiento y funciones efectoras de las células Th2. Modificado de (60)

• Interleuquina 4

La IL-4 está implicada en la diferenciación y en la estimulación de las células Th2, como se ha comentado anteriormente, en la síntesis de la IgE y en la activación de macrófagos (62). En un modelo animal de exposición crónica a los ácaros, se observó que los ratones deficientes para IL-4, no presentaban signos de remodelación, a pesar de existir inflamación en la vía aérea (63).

IL-4: síntesis de IgE y diferenciación a linfocitos Th2.

IL-5: diferenciación y reclutamiento de los eosinófilos.

IL-9: reclutamiento y crecimiento de los mastocitos.

IL-13: regulación de la HRB.

- **Interleuquina 5**

La IL-5 actúa en el crecimiento, en la supervivencia y activación de eosinófilos (64). Los niveles de la IL-5 en el esputo de pacientes asmáticos se correlacionan con las exacerbaciones de estos pacientes (65). Además, la asociación de la IL-5 con la sinusitis crónica y con los pólipos nasales apoya el papel de la IL-5 en la patogénesis de este subconjunto de pacientes con asma grave (66). La sobreexpresión de la IL-5 produce un aumento de los eosinófilos en el LBA con mayores cambios fibróticos en un modelo animal de asma (67).

- **Interleuquina 9**

La IL-9 es una citoquina que actúa mejorando la producción de citoquinas Th2, la producción de moco de la vía aérea y la diferenciación de los eosinófilos y basófilos entre otras acciones (68). Al bloquear la IL-9 en un modelo animal de asma, se reduce la hiperreactividad de la vía aérea, así como el número de mastocitos. Su expresión está incrementada en la vía aérea de pacientes asmáticos (69).

- **Interleuquina 13**

Se ha demostrado un aumento de los niveles de IL-13 en las vías respiratorias de los pacientes con asma atópica y aquellos con asma no atópica (70). Además, la IL-13 comparte la actividad con la IL-4 en la producción de la IgE por las células B, en la activación de los monocitos y macrófagos y aumenta la producción de moco a través de la hiperplasia de las células escamosas (71). Al bloquear el receptor de la IL-13, que también comparte con la IL-4, se observa una reducción drástica de la hiperreactividad de la vía aérea en un modelo murino de alergia (72). Así, la IL-13 tiene efectos pleiotrópicos en el asma, incluyendo un importante papel en el desarrollo de la hiperreactividad de la vía aérea y en la remodelación (73).

- **Células efectoras Th17**

Una amplia variedad de evidencias experimentales han sugerido que el espectro del repertorio inmune podría no deberse a un simple destino binario, adoptado por las células T CD4⁺ (74-76). Estas hipótesis han culminado con el descubrimiento de una nueva subpoblación de LT CD4⁺, las células Th17 (77).

Esta subpoblación Th17 se caracteriza por producir un patrón de citoquinas, entre las que se encuentran la IL-17A, la IL-17F, la IL-21 y la IL-22. Evidencias recientes indican que las células Th17 muestran un efecto patogénico en muchas enfermedades autoinmunes y en reacciones de hipersensibilidad (49, 78). Actualmente la subpoblación de células Th17 está muy bien caracterizada, conociéndose al igual que ocurre con la subpoblación de linfocitos Th1 y Th2, los factores que influyen en su diferenciación, las citoquinas que producen y sus funciones en la respuesta a patógenos, tumores y autoantígenos (79, 80), como se resume en la tabla 2.

| POBLACIONES EFECTORAS DE LOS LINFOCITOS T CD4 ⁺ | | | |
|--|---|------------------------------------|--|
| TIPO | FUNCIÓN | CITOQUINAS | FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN |
| Th1 | Protección contra bacterias intracelulares y algunos virus | IL-2 IFN- γ | STAT-1 STAT-4 T-bet |
| Th2 | Activan los eosinófilos y participan en la defensa contra infecciones contra helmintos Respuesta inmune específica mediada por anticuerpos | IL-4 IL-5 IL-9 IL-13 | STAT-6 GATA-3 |
| Th17 | Respuesta inmune contra hongos y bacterias extracelulares Autoinmunidad | IL-17A IL-17E IL-21 IL-22 | ROR γ T ROR α STAT-3 |
| Treg | Respuesta inmune Autotolerancia | IL-10 | FOXP3 |

Tabla 2: Principales poblaciones efectoras de los Linfocitos T CD4⁺

En la Figura 8 se muestra un resumen de la diferenciación de las subpoblaciones de los LT CD4⁺.

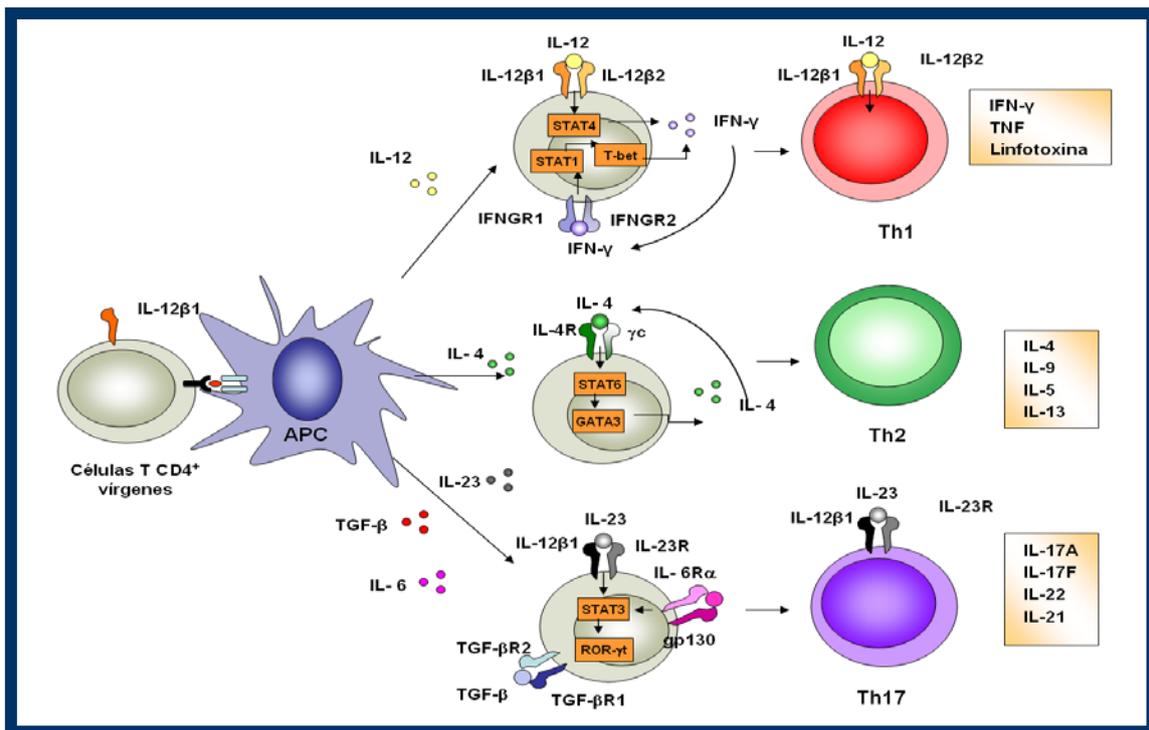


Figura 8. Diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ efectoras. La activación de las CPA está mediada por la interacción con las moléculas de la superficie de los microorganismos, a través de receptores de reconocimiento expresados en la membrana. Las señales transmitidas a partir de estos receptores dirigen a la CPA a un fenotipo capaz de mediar el desarrollo de las diferentes células efectoras Th1, Th2 o Th17 durante la presentación antigénica a los LT vírgenes. Modificado de (74)

Muchas patologías previamente explicadas por la activación de los linfocitos Th1 o Th2 parecen ahora estar relacionadas, al menos en parte, con las células Th17. Así, se ha descrito la implicación de los linfocitos Th17 en diferentes modelos de enfermedades inflamatorias

como la Artritis Inducida por Colágeno (AIC) (81), la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) (82), la Miocarditis Autoinmune Experimental (83) o en la Hipersensibilidad por Contacto (84), entre otras. La diferenciación y estabilización de las células Th17 se muestra en la figura 9.

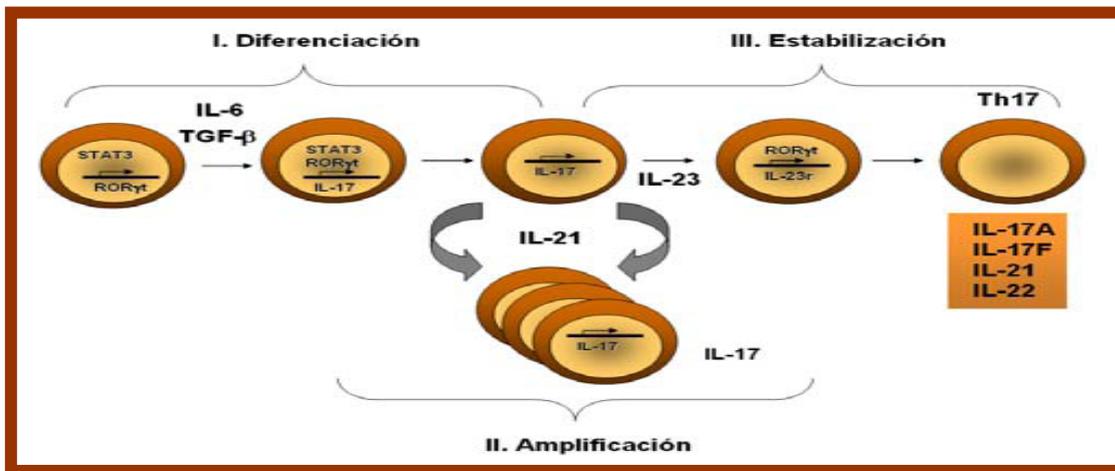


Figura 9. Modelo de desarrollo de las células Th17. La activación de las células Th17, que se inicia por la activación de las células T vírgenes, en presencia de la IL-6 y el TGF-β. Esto produce la activación del factor de transcripción RORγt y la producción de IL-17. La IL-21 es producida masivamente durante el desarrollo de las células Th17, actuando de manera autocrina sobre ellas y amplificando la población. La IL-23 producida por las células CPA, estabiliza la población diferenciada de Th17 y permite su expansión. Modificado de (85).

Aunque el asma es considerada como una enfermedad inflamatoria dependiente de linfocitos Th2, en los últimos años, han surgido evidencias consistentes sobre la contribución de las células Th17 en esta enfermedad (81, 86). La implicación de la respuesta Th17, en la patogénesis del asma, se ha demostrado por la sobreexpresión de la IL-17, a nivel de ácido ribonucleico (ARN), en la vía aérea en un modelo de asma animal (87), que fue confirmado en pacientes asmáticos observando un incremento de los niveles de esta citoquina en los pulmones, esputo, en el LBA o suero de pacientes asmáticos, con respecto a sujetos sanos (88-90). Se ha descrito que los niveles de IL-17 se correlacionan con el grado de severidad de la enfermedad (91), sugiriendo la contribución de esta citoquina en la patogénesis del asma. Además, la IL-17 induce la liberación de una amplia variedad de citoquinas y quimioquinas de diferentes tipos celulares asociándose al reclutamiento de los neutrófilos en la vía aérea (92).

En el modelo murino también se ha estudiado la posible contribución de la IL-17 en el desarrollo del asma en diferentes modelos de la enfermedad (81, 93). Se ha demostrado en varios estudios que la IL-17E o IL-25 actúa, en la respuesta inmune y adaptativa, amplificando la respuesta Th2 (94-96). Además, se ha descrito que el reclutamiento de los eosinófilos está reducido en los ratones deficientes para el receptor de la IL-17 (IL-17R) (93). Asimismo, la transferencia de las células Th17 aumenta el reclutamiento de eosinófilos mediado por las Th2 en las vías respiratorias (97). Las células Th17 inducen neutrofilia, producen una inflamación resistente a esteroides e hiperreactividad en un modelo animal de asma (98).

- **Células T reguladoras**

Las células T reguladoras (Treg) ejercen un papel muy importante en la tolerancia y regulación de la respuesta inmune (99), como se muestra en la tabla 2. Existen dos tipos principales de células T reg, las naturales que derivan del timo, que son CD4⁺ CD25⁺, y expresan niveles elevados del factor de transcripción Foxp3, el cual es esencial para su desarrollo y función. El otro tipo son las Treg inducidas o adaptativas que se desarrollan en la periferia a partir de LT CD4⁺ bajo condiciones particulares de presentación antigénica. Este tipo de células T reg secretan citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β . Las células Treg son capaces de impedir una respuesta producida por células T efectoras por medio de citoquinas supresoras como la IL-10 y TGF- β o por contacto célula-célula (100). Durante los últimos años se ha publicado un número creciente de estudios que apoyan el papel de las células T reg en la supresión de la enfermedad alérgica de la vía aérea (101-104). Los mecanismos propuestos que median la supresión del asma alérgico por las células Treg involucran a las citoquinas inmunomoduladoras, IL-10 y TGF- β , como se muestra en la figura 10.

Por otro lado, se ha observado que, en el ratón, las exposiciones repetidas a bajas dosis de alérgeno producen el desarrollo de células Treg y que la inhalación de dosis altas de alérgeno estimula el desarrollo de células T productoras de IL-10 (105).

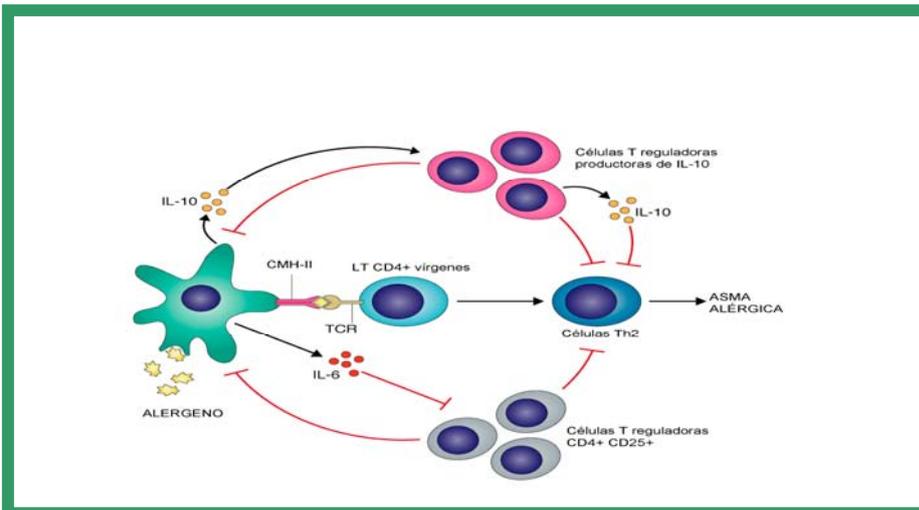


Figura 10. Células T reguladoras en el control del asma. El asma es una enfermedad causada por una respuesta Th2 inapropiada hacia antígenos o alérgenos. Las células T reg pueden regular la sensibilización alérgica a través de efectos inhibitorios sobre las células Th2 o sobre las DCs en el pulmón. A su vez, las DCs pueden producir citoquinas como la IL-6, la cual puede inhibir la función de las células T reg, o la IL-10, la cual induce la diferenciación de las células T reg productoras de IL-10.

Características fisiopatológicas de la remodelación

La remodelación en el asma implica una amplia variedad de cambios de la vía aérea, como se observa en la figura 11, que se resumen de la siguiente forma:

- Cambios en el epitelio.
- Aumento de la secreción de moco por las células caliciformes.
- Incrementos en la producción de citoquinas y quimioquinas por las células epiteliales.
- Inflamación de la submucosa.
- Engrosamiento de la capa muscular de la vía aérea con incremento del tamaño, número y funciones de la musculatura lisa bronquial.
- Incrementos del número de fibroblastos/miofibroblastos activados.
- Fibrosis subepitelial.
- Cambios vasculares principalmente en la vía aérea grande.

Todos estos fenómenos llevan a un engrosamiento y mayor rigidez de la vía aérea que condicionaría una menor respuesta al tratamiento y una obstrucción bronquial.

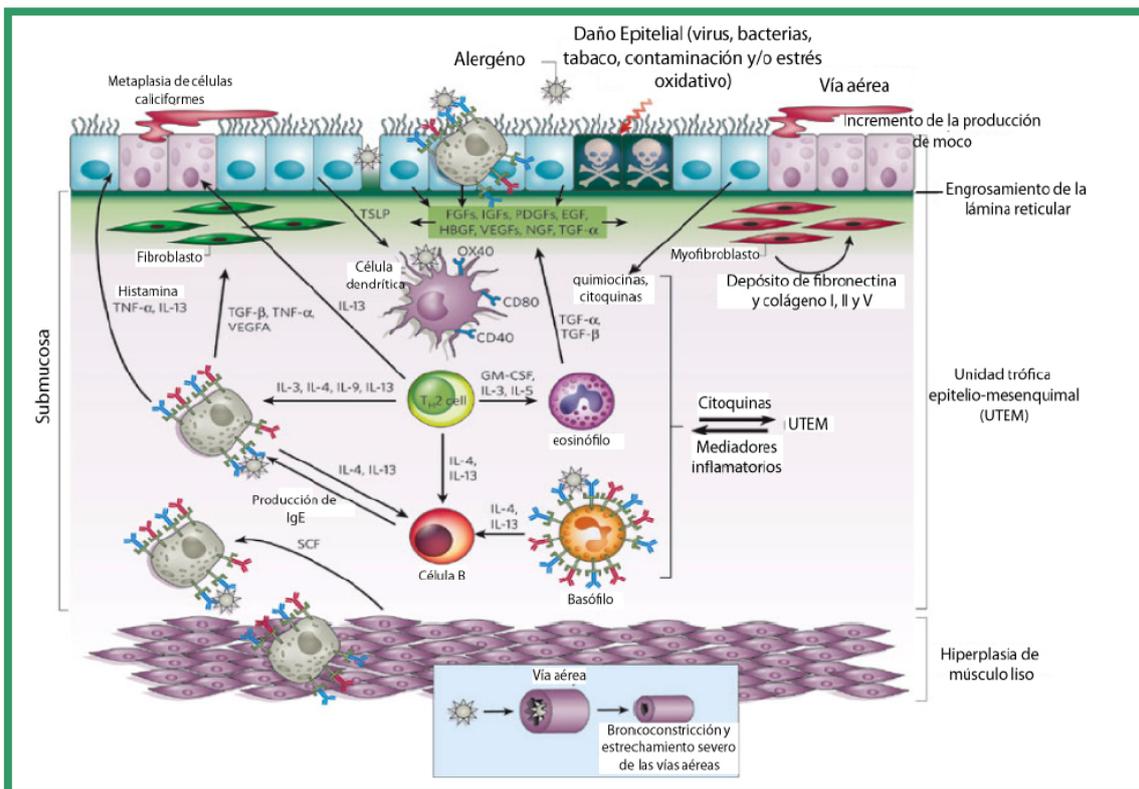


Figura 11. Fase crónica de la inflamación de la vía aérea del asma inducida por alérgenos. La exposición persistente y repetitiva de los alérgenos actúa en el epitelio bronquial de la vía aérea, donde actúan las células del sistema inmune y del sistema adaptativo produciendo cambios importantes como el engrosamiento de las paredes de las vías aéreas (incluyendo el epitelio, la lámina reticular, la submucosa, el músculo liso), el aumento del depósito de la matriz extracelular, la hiperplasia de las células caliciformes que se asocia a la producción de moco. Modificado de (106)

La remodelación de la vía aérea en los pacientes asmáticos se descubrió, por primera vez, hace más de 85 años, a través del estudio del asma de riesgo vital (22). Inicialmente, se pensó que la contracción de la musculatura lisa y, por supuesto, las alteraciones intrínsecas de los miocitos eran los causantes de producir el asma. El papel central que jugaba la inflamación en el asma no tomó protagonismo hasta que numerosos estudios realizados en biopsias de pacientes asmáticos, con diferentes grados de severidad, demostraron la existencia de células y mediadores de la inflamación (107-109). Posteriormente, el beneficio clínico que producían los esteroides confirmó el importante papel de la inflamación en el asma.

- **Cambios en el epitelio**

El epitelio bronquial representa la barrera que protege el medio interno contra los factores externos ambientales (110). Diferentes publicaciones sugieren que el asma desarrolla primitivamente una serie de defectos en la capa epitelial, lo que permite a los alérgenos ambientales (patógenos, alérgenos, contaminación o el hábito tabáquico), microorganismos y toxinas o virus respiratorios acceder a las vías respiratorias (110, 111). Estos microorganismos o factores mecánicos estresantes producen un daño epitelial, con la subsiguiente liberación de mediadores de inflamación, que contribuyen a la remodelación en la submucosa subyacente (112).

Las alteraciones del epitelio bronquial incluyen la pérdida y/o hiperplasia de las células ciliadas, la regulación positiva de factores de crecimiento, de citoquinas y de quimioquinas, produciendo una rotura en el epitelio, con escasa probabilidad de reparación (112, 113).

Múltiples mediadores de inflamación, incluyendo el TGF- β y quimioquinas, son liberados del epitelio dañado o en respuesta a mediadores de inflamación como la IL-13. Estos mediadores poseen un papel importante en el desarrollo de la fibrosis subepitelial y en el incremento de la musculatura lisa bronquial (114, 115). Esto ha permitido al Profesor Holgate proponer que, en el asma, se desarrolla, inicialmente, un trastorno en la “unidad trófica epitelio-mesenquimal” que parece que regula el fenómeno de la remodelación, tan característico de la inflamación crónica de las vías aéreas en los pacientes asmáticos (111, 116), como se muestra en la figura 12. Posteriormente, esta alteración de la unión entre el epitelio y el mesénquima se confirmó en un modelo de ratón expuesto a un aeroalérgeno de forma crónica (117).

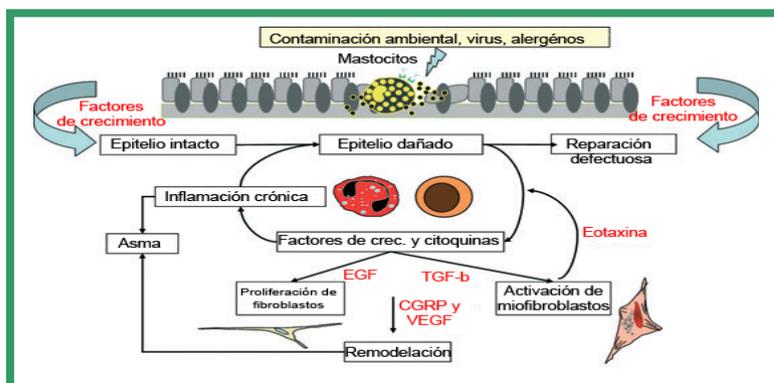


Figura 12. Relación entre el epitelio y el mesénquima. La unidad trófica epitelio-mesenquimal produce diversos factores de crecimiento y citoquinas que perpetúan la inflamación crónica de la vía aérea. Modificado de (118)

A pesar de estas hipótesis, el conocimiento sobre los cambios tisulares crónicos, que ocurren en el paciente asmático, es complejo y son necesarios más estudios para determinar el papel que tiene, el epitelio bronquial, en la patogénesis del asma, para identificar futuras terapias, que puedan proteger la vía aérea de los factores de riesgo. La mayoría de las investigaciones sobre la inflamación crónica implican modelos animales experimentales que no pueden considerarse idénticos a las enfermedades humanas, o bien estudios de biopsias, en pacientes que padecen la enfermedad.

- **Secreción de moco y células escamosas**

La hipersecreción de las mucinas MUC5AC y MUC5B, por las células escamosas, es una característica fisiopatológica de la remodelación de la vía aérea en sujetos asmáticos (119). Las citoquinas Th2, principalmente la IL-9 e IL-13, además de la IL-1 β y el TNF- α han demostrado estar involucradas en la regulación de la síntesis de mucina y en el desarrollo de la hiperplasia de las células escamosas.

- **Mediadores de inflamación**

Las células inflamatorias y estructurales secretan mediadores inflamatorios, citoquinas y quimioquinas que son fundamentales en la iniciación y en la sincronización de la remodelación de la vía aérea de los pacientes asmáticos (120). Entre estos mediadores de inflamación, se han identificado las siguientes citoquinas:

- Citoquinas reguladoras de la respuesta inmune: TGF- β e IL-11.
- Citoquinas Th2: IL-4, IL-5, IL-9 e IL13.
- Citoquinas Th17: IL-17A, IL-17F, IL-17E (IL-25).
- Citoquinas antiinflamatorias: IL-10.
- Quimioquinas derivadas del epitelio: RANTES, proteínas inflamatorias del macrófago 1 alfa, IL-8 y eotaxina.
- Metaloproteinasas.

TGF-beta

El TGF- β es una citoquina pleiotrópica con diferentes funciones dependiendo del microambiente y de las condiciones celulares. Aunque muchas células secretan TGF- β , los eosinófilos constituyen una de las fuentes principales de secreción de esta citoquina en los pacientes asmáticos (109). El TGF- β se ha implicado en la remodelación que existe en el asma y en otras enfermedades respiratorias inflamatorias (117, 121), al promover la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos, e inducir la proliferación de las células de la musculatura lisa bronquial (122). Además, actúa en la expresión de las metaloproteinasas y de sus inhibidores, influyendo así en la síntesis y en la degradación de la matriz extracelular y aumenta la proliferación de las células escamosas así como la secreción de moco (122, 123). Los pacientes con asma muestran incrementos de la expresión del TGF- β en las biopsias

bronquiales y en el LBA en comparación con sujetos sanos y sus niveles de expresión, se correlacionan con el grado de fibrosis subepitelial (120).

Interleuquina 11

La IL-11 es una citoquina producida por las células del estroma de la médula ósea y se expresa selectivamente en los eosinófilos y en las células epiteliales de pacientes con asma moderado severo (124). Actúa en la fibrosis subepitelial, en el engrosamiento de las paredes de la vía aérea, en la diferenciación de los miofibroblastos y en la proliferación de las células de la musculatura lisa bronquial (125). Se ha observado que los niveles de expresión de la IL-11 se correlacionan con la gravedad del asma y con la fibrosis subepitelial (124).

Interleuquina 10

La IL-10 es una citoquina con potentes propiedades antiinflamatorias que juega un papel crucial e importante y, a menudo, esencial, en la prevención de las patologías inflamatorias y autoinmunes regulando la inflamación local al inhibir la respuesta Th1 y Th2. Esto ha conducido a un considerable interés por su potencial terapéutico en el tratamiento de una amplia gama de patologías inmunes, incluyendo el asma (126), aunque los mecanismos reguladores de esta citoquina no han sido todavía claramente resueltos.

Los potentes efectos antiinflamatorios de la IL-10 se han observado en múltiples modelos de enfermedades experimentales, incluyendo varios modelos de artritis (127), psoriasis (128), lupus eritematoso sistémico (129), esclerosis sistémica y cáncer (130).

La IL-10 fue inicialmente descrita como una citoquina Th2 (131-133), pero hoy se acepta que se expresa en todos los subconjuntos de las poblaciones de linfocitos T CD4+, incluyendo Th1, Th2, Th17 y las células T reg (126). *In vivo*, la mayor fuente de IL-10 incluye células T *helper*, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Además, las células epiteliales o queratinocitos, son capaces de producir IL-10 en respuesta a una infección o a un daño tisular (134).

En el contexto del asma, la IL-10 inhibe la eosinofilia en parte por la supresión de la IL-5 y el GM-CSF (135-137). Se ha descrito que los macrófagos alveolares de los pacientes con asma alérgica atópica presentan una deficiencia en la producción de la IL-10 (138, 139). La disminución de la expresión de la IL-10 ha sido recientemente asociada a la disminución de la capacidad de las células T reg de pacientes con asma alérgica para inducir un fenotipo tolerogénico en las DCs (140).

Quimioquinas

Las quimioquinas se han descrito recientemente como moléculas importantes en el desarrollo de la remodelación de la vía aérea y pueden ser expresadas por muchas células en el pulmón, incluyendo las células epiteliales (141, 142) y las células de la musculatura lisa bronquial en los pacientes asmáticos (143). Actúan en el reclutamiento de las células inmunes

al lugar de la inflamación, contribuyendo así a la remodelación de la vía aérea que existe en el asma.

Metaloproteinasas

La metaloproteinasa de la matriz (MMP)-9 es quizá el mediador inflamatorio más estudiado en el asma. Niveles elevados de la MMP-9 se han encontrado en el esputo y en el LBA de pacientes con asma, correlacionándose con la extensión de la infiltración de las células inflamatorias (144) y con la gravedad del asma (145).

- ***Incremento de la musculatura lisa bronquial***

Las células de la musculatura lisa bronquial constituyen las principales células estructurales dentro del bronquio. En la vía aérea de los asmáticos existe una proliferación o hiperplasia y un incremento del tamaño o hipertrofia de las células del músculo liso, produciendo una obstrucción de la vía aérea (9). Como se ha descrito anteriormente, los mastocitos que son una fuente importante de mediadores inflamatorios, aparecen en grandes cantidades en la musculatura lisa bronquial, pudiendo influir en el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas, característica típica del asma.

- ***Fibrosis subepitelial***

Los fibroblastos son células planas, estrelladas, grandes que residen en la proximidad del epitelio basal. En un ambiente inflamatorio, como ocurre en los asmáticos, los fibroblastos se activan/diferencian a miofibroblastos, los cuales secretan mediadores inflamatorios y proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno I, II y V o fibronectina; (146-149). El compartimento de la matriz extracelular de la vía aérea es dinámico, reflejando una lucha constante entre la síntesis y la degradación, que es regulada por la acción de las MMP y de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (150). Un cambio, en el balance, hacia un incremento en el depósito de la matriz extracelular, produce fibrosis, dando lugar a alteraciones estructurales de la vía aérea afectando sus propiedades mecánicas. En los pacientes asmáticos, la susceptibilidad hacia el daño y hacia la respuesta aberrante en la reparación, produce una activación persistente de los fibroblastos, permitiendo así el desarrollo de la fibrosis subepitelial (110).

- ***Angiogénesis***

Existen evidencias que indican un incremento anormal en el número y tamaño de los microvasos, dentro del tejido bronquial, característico de la remodelación de la vía aérea (151). El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF o del inglés *vascular endothelial growth factor*) actúa aumentando la permeabilidad de los vasos sanguíneos anormales, provocando una dilatación del vaso y edema, lo cual contribuye al estrechamiento de la vía aérea (152). Además, estos vasos son una fuente importante de células inflamatorias y citoquinas (151).

Otras citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias

- ***Interleuquina 12***

La IL-12 es una citoquina proinflamatoria producida en los macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígeno. Su papel crucial en la diferenciación de las células T CD4+ a Th1 está establecido y se considera una citoquina, con un papel crítico, que actúa en la respuesta inmune y adaptativa (153, 154).

- ***Factor de necrosis tumoral alfa***

El TNF- α es una proteína del grupo de las citoquinas liberadas por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación. La liberación del TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, Ig y complemento, provocando la activación de los LT y linfocitos B (155).

- ***Interleuquina 1 beta***

La IL-1 β es una citoquina esencialmente proinflamatoria que posee múltiples funciones y afecta a múltiples células (156, 157). Se expresa en los monocitos, en los macrófagos de los tejidos y en las células dendríticas, pero es producida por los linfocitos B y por las células epiteliales (156, 158, 159). Es un mediador de la fase aguda de la inflamación por inducción de la respuesta local, al ser liberada por las células epiteliales de la vía aérea tras el contacto con el alérgeno.

- ***Interleuquina 33***

La IL-33 es un miembro de la familia de la IL-1 β . La IL-33 induce lesiones en el pulmón como la hipertrofia de la capa media de las arterias, la infiltración vascular de los eosinófilos y células mononucleares y la hipertrofia del epitelio bronquial con un incremento de la producción de moco (160). Recientemente se ha descrito un incremento en la producción de la IL-33 en el pulmón de ratones con asma, así como en el LBA de pacientes con asma (161, 162). En ratones, la IL-33 parece ser importante en la inducción y persistencia de la hiperreactividad (136, 161), mientras que su papel en pacientes con asma requiere ser estudiado.

- ***Interleuquina 25***

La IL-25, o también conocida como IL-17E fue descrita por primera vez como una citoquina Th2 (163), sin embargo, hoy se conoce como un miembro de la familia de las citoquinas Th17. Además, los eosinófilos, los basófilos y las células epiteliales pueden producirla en respuesta a alérgenos y virus respiratorios (164, 165). Las células inflamatorias de la submucosa de biopsias bronquiales de pacientes con asma muestran niveles altos de la

IL-25, comparado con los controles sanos (166). *In vitro*, la IL-25 promueve la diferenciación de las células Th2 en un modelo IL-4 y STAT-6 dependiente (165).

La administración sistémica de la IL-25 o la sobreexpresión de la IL-25 induce citoquinas Th2 y producción de eotaxinas, lo cual produce eosinofilia, incremento de la IgE en el suero, secreción de moco y otros cambios patológicos (163, 167, 168). Al bloquear la IL-25 en un modelo experimental de asma alérgico se produce una disminución de la IL-5, IL-13, Ig E, de los infiltrados de los eosinófilos e HRB (169).

En la figura 13 se muestra un resumen de las principales células que participan en la respuesta inflamatoria existente en el asma.

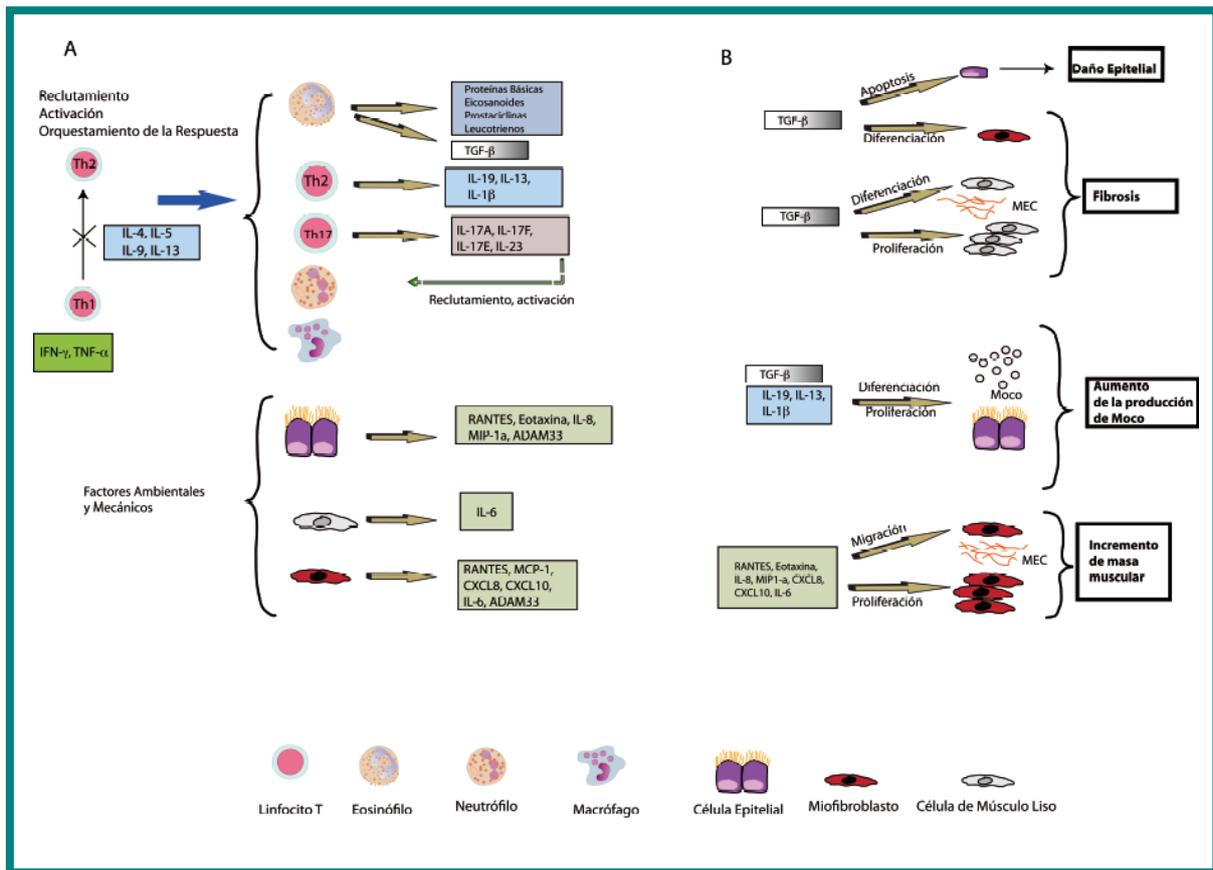


Figura 13. Mediadores de inflamación y células envueltas en la remodelación de la vía aérea de los pacientes asmáticos. Los mediadores de inflamación asociados al asma ejercen sus efectos en diferentes tipos de células en el pulmón produciendo fibrosis, producción excesiva de moco, angiogénesis y aumento de la masa del músculo liso bronquial. Modificado de (9)

B. LAS GALECTINAS

El equilibrio entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias es crítica para mantener la homeostasis inmune en condiciones fisiológicas, así como para el control de la inflamación en diferentes situaciones patológicas (170). Durante los últimos años, numerosos estudios se han centrado en la comprensión de los mecanismos que regulan la respuesta inmune. Nuevas moléculas de señalización, receptores de superficie celular o proteínas solubles como son las galectinas (gal) se han postulado como críticas para limitar la respuesta inflamatoria.

Generalidades

Las gal son un grupo creciente de lectinas animales con gran afinidad a los beta-galactósidos o residuos galactósidos presentes en diferentes glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular. Estas proteínas reconocen de forma específica unidades repetitivas, a través de un dominio altamente conservado, de 135 aminoácidos, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) (171). Actualmente, se han descrito 15 miembros de esta familia de proteínas en los mamíferos, las cuales se clasifican de acuerdo a su estructura en gal “prototipo”, “quimera” y “repeticiones en tándem” como se representa en la figura 14 (172).

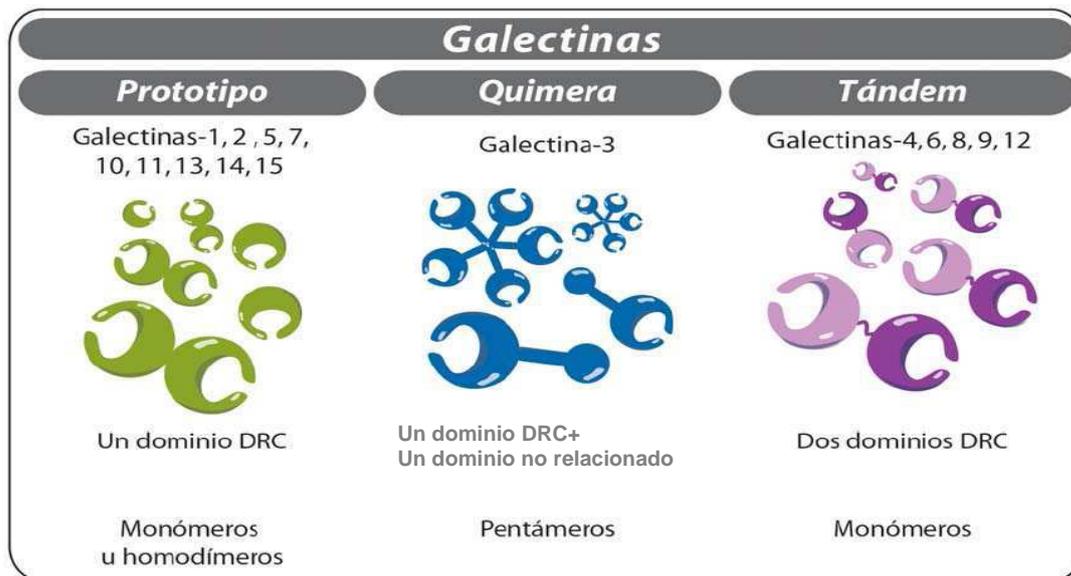


Figura 14. Clasificación estructural de las galectinas

Las gal “prototipo” (gal-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14 y -15) poseen un único DRC. La gal-3 es la única gal tipo “quimera” descrita y posee un DRC y otro dominio no relacionado que facilita su oligomerización (173). Las gal del tipo “repeticiones en tándem” (gal-4, -6, -8, -9, y -12) poseen dos DRC en una misma cadena polipeptídica (171).

Las gal son proteínas pleiotrópicas ampliamente distribuidas en tejidos y encontradas en células epiteliales, células dendríticas y células inflamatorias. Las gal se sintetizan en el citosol de las células y se dirigen al núcleo o se secretan al espacio extracelular, donde se unen a los glicanos de la matriz extracelular o de la superficie celular (172) como se muestra en la figura 15. Se localizan tanto intracelular como extracelularmente y pueden detectarse sobre la superficie celular a través de su unión lectina-carbohidrato y ejercer funciones en ambos compartimentos (174).

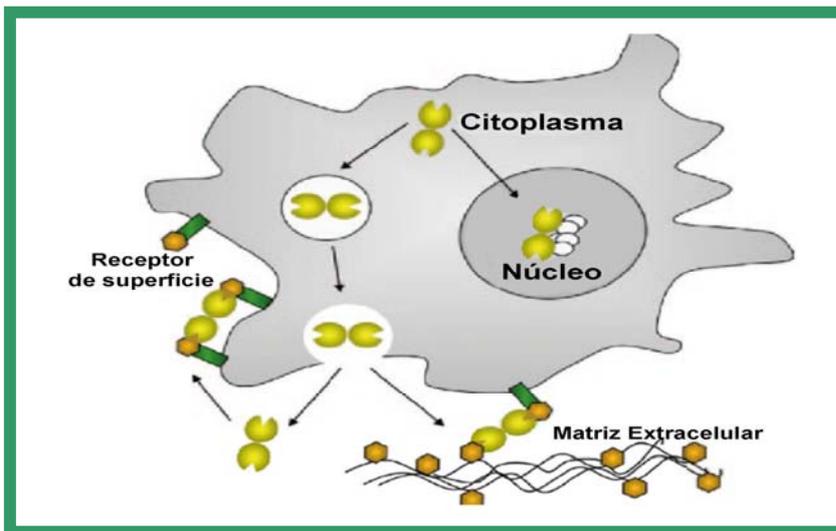


Figura 15. Localización subcelular y extracelular de las galectinas .Modificado de (172)

Las gal están involucradas en procesos tales como el crecimiento y la supervivencia celular, son también capaces de modular las adhesiones celulares e inducir la migración celular. Intracelularmente, pueden regular el crecimiento y la supervivencia celular al interactuar con proteínas citoplásmicas y nucleares, a través de interacciones proteína-proteína, lo que afecta a las vías de señalización intracelulares (175).

Actualmente se ha observado que las gal juegan un papel importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la respuesta inmune e inflamatoria, el desarrollo y la progresión tumoral, la degeneración neuronal, la aterosclerosis o la diabetes.

Durante los últimos años se ha demostrado que las gal son fundamentales en la regulación de la respuesta inmune (173, 176). La gal-1, la gal-3 y la gal-9 son importantes desde el punto de vista inmunológico y es en el estudio de ellas en lo que se centrará esta tesis.

La gal-1 y la gal-9 se han propuesto como reguladores negativos de la respuesta inmune. Ambas gal inducen apoptosis de LT activados, suprimen la expresión de determinadas citoquinas inflamatorias e influyen en la generación y función de células T reg. Tanto la gal-1 como la gal-9 parecen favorecer el balance hacia una respuesta Th2. La eficacia inmunosupresora de estas gal se ha demostrado mediante su aplicación exógena en diferentes modelos animales de enfermedades inflamatorias. Por su parte, el papel de la gal-3 parece ser más complejo, la gal-3 podría ser vista como una molécula reguladora que actúa en estadios

diferentes de la respuesta inflamatoria. La mayoría de los datos, *in vivo*, sugieren que durante la inflamación aguda, la gal-3 tiene principalmente un papel proinflamatorio, mientras que en la fase crónica se asocia a la fibrogénesis.

Galectina 1

La gal-1 es la primera gal que se descubrió y se encuentra ampliamente expresada en tejidos de muchos organismos vertebrados e invertebrados. Tras su secreción, la gal-1 requiere una rápida unión a sus ligandos extracelulares a fin de mantener la estabilidad (177).

Entre las funciones de la gal-1 destacan la participación en procesos tan variados como la apoptosis celular, la renovación celular, la adhesión celular, el desarrollo de células T, la inmunorregulación, el cáncer, el desarrollo de las células B o la angiogénesis, como se resume en la figura 16.

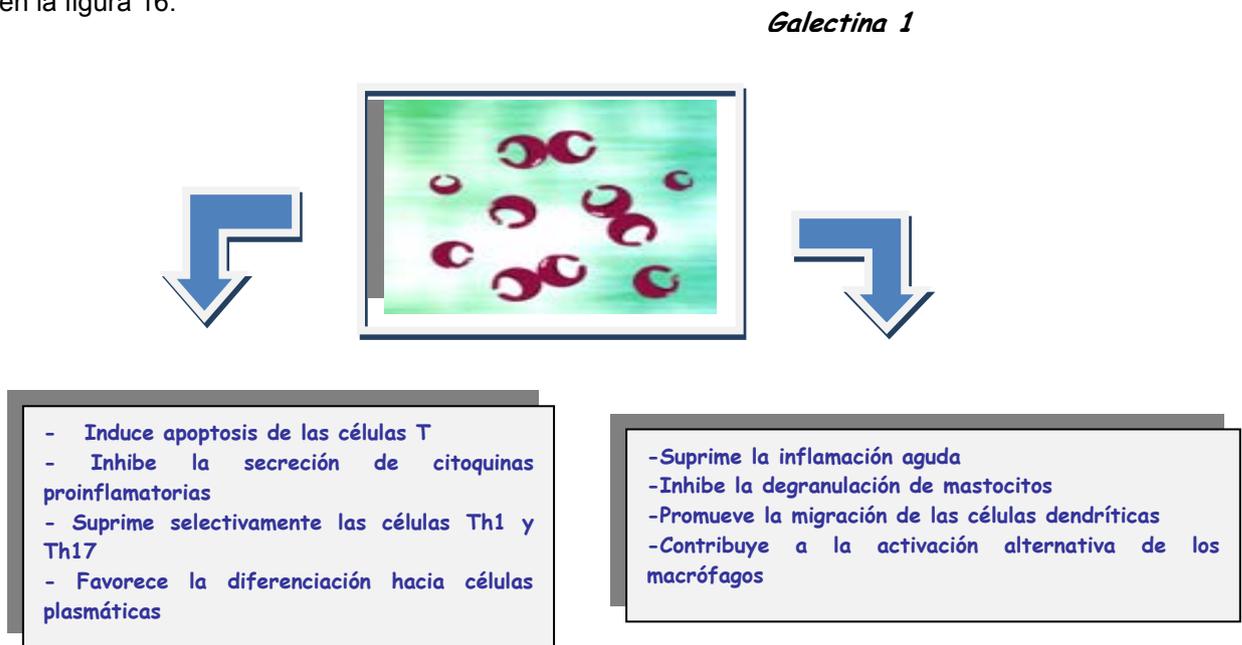


Figura 16. Funciones principales de la galectina 1

Durante el desarrollo de la respuesta inmune innata, se ha demostrado que la gal-1 contribuye a la resolución de la inflamación aguda. Un estudio reciente ha demostrado que la gal-1 es capaz de inducir la migración de los neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ello, la gal-1 puede estar actuando como quimiotrayente o como molécula que regula negativamente la migración de los neutrófilos en condiciones inflamatorias agudas (178).

En este sentido, la gal-1 inhibe el reclutamiento y la degranulación de mastocitos y eosinófilos (179). En neutrófilos, esta proteína bloquea el reclutamiento al sitio de la inflamación (180-182). La gal-1 en macrófagos inhibe la síntesis de óxido nítrico (NO), ácido araquidónico y prostaglandina E2, e interfiere en la capacidad estimuladora de células T (174, 181, 183) como se resume en la figura 17.

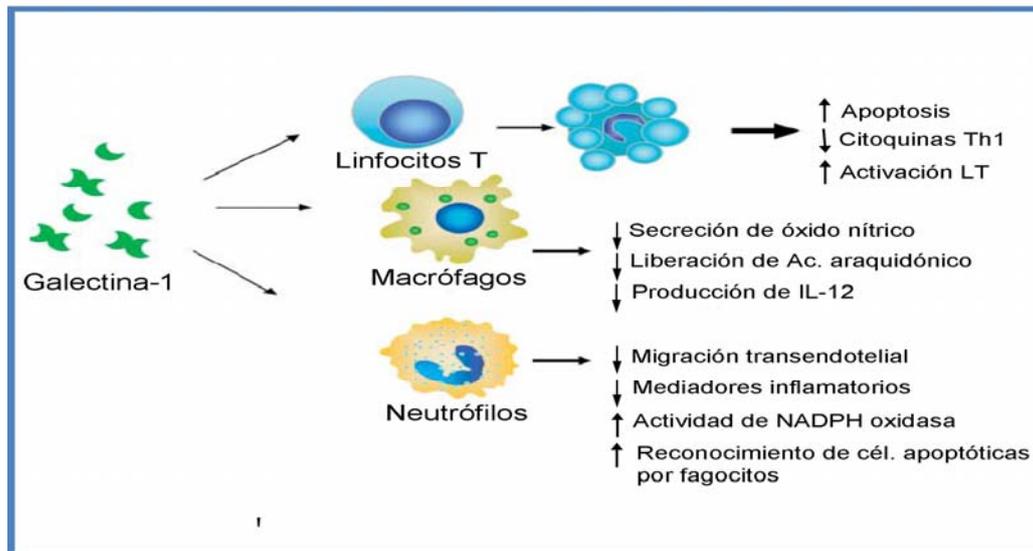


Figura 17. Influencia de la galectina 1 en las células del sistema inmune. Modificado de (184)

En particular, la gal-1 ha sido implicada en la regulación de la maduración, migración, activación de los LT. Se ha demostrado que esta proteína inhibe la proliferación y expansión clonal de los LT activados, mediante mecanismos que involucran bloqueo de la activación celular (185) y del ciclo celular (186, 187) e inducción de apoptosis (188-190). Un estudio en un modelo de ratón demostró que la gal-1 induce apoptosis selectivamente en las células proinflamatorias Th1 y Th17, pero no en las células Th2, ni en las células vírgenes o en las células T reg (191). La inducción de apoptosis de células T activadas es uno de los principales mecanismos inmunorreguladores de la gal-1, pero se ha observado que a bajas concentraciones posee propiedades inmunosupresoras independientes de su efecto proapoptótico como es la inducción de la síntesis de IL-10, que como se ha dicho anteriormente, es una molécula antiinflamatoria (192). Además, se ha descrito que las células T reg expresan niveles superiores de la gal-1 en comparación con los LT efectores en ensayos *in vitro*, por lo que la gal-1 es un posible mediador en la función inmunosupresora en estas células (193). Los macrófagos activados producen niveles considerables de gal-1 (194), la cual regula el balance entre el estado proinflamatorio y antiinflamatorio en estas células (183).

Existen múltiples ejemplos de la eficacia inmunosupresora de la administración de la gal-1. *In vivo*, posee efectos inmunosupresores y antiinflamatorio en varios modelos animales experimentales de inflamación e inmunidad como se muestra a continuación. En 1990, Offner y colaboradores consiguieron prevenir las formas más leves de la EAE en ratas tratadas con gal-1 recombinante (gal-1r) (195). Años más tarde, Rabinovich y colaboradores demostraron, en un modelo de ratón de AIC tratados con Gal-1r, un cambio de la respuesta Th1 (característica de la AIC) hacia una respuesta Th2 (196). De igual manera, el tratamiento con gal-1r previene la lesión hepática en un modelo de hepatitis inducida por concavalina-A (197), en un modelo animal de colitis (198), y en un modelo de uveítis autoinmune experimental (199). Además, se ha demostrado que el tratamiento retrasa la aparición de diabetes tipo 1 en un modelo murino a través de la inducción de altos niveles de IL-10 (200).

Sobre el papel de la gal-1 en el asma no existe actualmente ningún estudio, sin embargo, se ha observado, en un modelo *in vitro*, que la gal-1 inhibe la migración de los eosinófilos en la poliposis nasal. Esta evidencia experimental sugiere que dicha gal puede jugar un papel en el asma, por la implicación de los eosinófilos en esta patología y su relación con la poliposis nasal (201).

Galectina 3

La gal-3 se expresa en prácticamente todos los tipos de células inmunes e inflamatorias (202) y está involucrada en diversos procesos que ocurren durante la inflamación aguda incluyendo la activación de los neutrófilos, la adhesión y quimioatracción de monocitos/macrófagos, la opsonización de neutrófilos apoptóticos y la activación de mastocitos (203, 204). La gal-3 participa, además, en la inflamación crónica a través de inducir la activación y proliferación de los fibroblastos (205).

Como el resto de las gal, la gal-3 se encuentra tanto intracelular como extracelularmente y, una vez secretada al medio extracelular, puede unirse a la superficie celular a través de su interacción con distintas moléculas, entre ellas la IgE y el receptor FcεRI. La gal-3 se ha detectado sobre la superficie de eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, macrófagos, células T y B, siendo los macrófagos una de las principales fuentes de gal-3 extracelular. A través de su interacción con la IgE y FcεRI, la gal-3 es capaz de inducir la liberación de mediadores inflamatorios tanto de mastocitos como de eosinófilos. Por otro lado, la gal-3, *in vitro*, inhibe la expresión de la IL-5 en diferentes tipos celulares como los eosinófilos o las células T (206), a través de su unión al receptor de IgG de baja afinidad (CD32) (207). En la figura 18 se resumen las principales funciones de la gal-3.

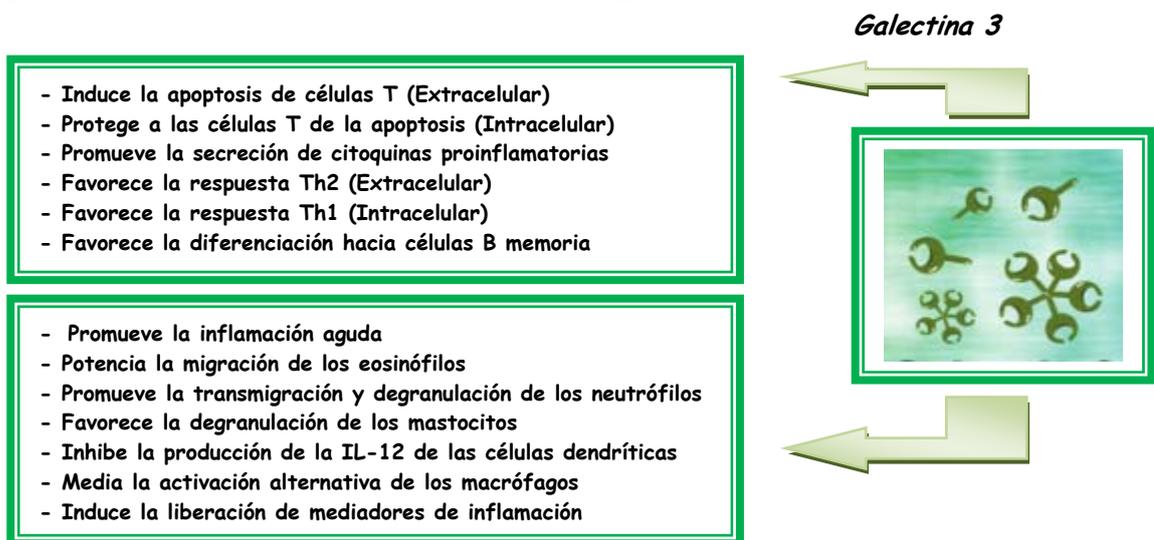


Figura 18. Funciones principales de la galectina 3

Los datos que apoyan el posible papel de la gal-3 en la patogenia del asma bronquial provienen de estudios *in vitro* y de modelos animales.

Existen dos estudios que observan que, al administrar ovoalbúmina (OVA) para inducir asma, en un modelo de ratón deficiente para gal-3 ($gal-3^{-/-}$), se desarrolla una enfermedad menos severa, observando lo siguiente: niveles más bajos de expresión de la IgE e IL-4 y mayores niveles de expresión del IFN- γ en el LBA; menores niveles de IgE, de las citoquinas Th2 y mayores niveles de Th1 en sangre periférica y menos hiperreactividad, menos metaplasia de las células escamosas y menos eosinófilos en las biopsias pulmonares, con respecto a los ratones con fenotipo silvestre o normal (del inglés *wildtype*-WT) ($Gal-3^{+/+}$) (208). Estos mismos datos aparecieron en un estudio posterior, al administrar de forma repetida OVA durante 12 semanas a los dos mismos grupos de ratones, observando en las biopsias de los ratones $gal-3^{-/-}$ una mejoría de las características asociadas a la remodelación con una disminución de la secreción de moco, de la fibrosis subepitelial, del espesor del músculo liso y de la angiogénesis peribronquial, así como una disminución de la infiltración de los eosinófilos además de constatar que los niveles de eotaxina-1, IL-5, IL-13, TGF- β en el LBA fueron sustancialmente menores en relación a los ratones WT (209).

Por el contrario, dos trabajos consecutivos de un mismo grupo español estudiaron el papel de la gal-3 en un modelo animal de asma con inflamación aguda y crónica. En el modelo agudo, al instilar intratraquealmente a las ratas un plásmido codificante para gal-3, se apreció que se inhibe la inflamación de las vías aéreas observando la normalización del número de eosinófilos, y de las células T en el LBA. Además, el tratamiento con gal-3 mejoró los parámetros funcionales como la presión pulmonar y los flujos espiratorios (210). Posteriormente, en el modelo crónico, se instiló de la misma forma la gal-3 durante 12 semanas constatando una mejoría importante de muchos parámetros asociados a la remodelación de la vía aérea, como la fibrosis subepitelial, la secreción de moco o la de colágeno, junto a una normalización de la hiperrespuesta de la metacolina y el número de eosinófilos (211). Este mismo grupo español ha demostrado, recientemente, que la terapia génica con gal-3 produce efectos beneficiosos en el mismo modelo de asma murino a través de la inhibición de la expresión de SOCS1 y SOCS3 (212), proteínas que pertenecen a una familia, con funciones supresoras de la señal de citoquinas, que actúan en la respuesta inmune a través de la diferenciación Th1/Th2. Estos datos muestran la potente utilidad de la gal-3 como futuro tratamiento para el asma, a través de su acción inhibitoria sobre la IL-5, asociada a SOCS1 y SOCS3.

Los datos opuestos que observamos en estos trabajos pueden ser debido a que la gal-3 tiene la capacidad de actuar dualmente, pudiendo proteger a las células de la apoptosis o muerte celular dependiendo de si la proteína actúa intra o extracelularmente. Extracelularmente, la gal-3 induce apoptosis en las células T activadas y líneas celulares, jugando un papel importante de la respuesta inflamatoria, la cual contribuye a las enfermedades autoinmunes (213-215). Intracelularmente, protege a las células de la apoptosis y promueve la proliferación de las células T (216, 217), ya que suprime la vía de la apoptosis (216). Numerosos estudios han demostrado la propiedad de protección de la gal-3 frente a la apoptosis. Por ejemplo, las células transfectadas que expresan gal-3 proliferan más rápido que

las células transfectadas control, o la sobreexpresión de la gal-3 protege a las células T de toxinas que inducen la apoptosis (218).

En los macrófagos se ha observado que la gal-3 presenta igualmente una función dual. Los macrófagos de ratones deficientes para gal-3 fueron más sensibles a estímulos apoptóticos, disminuyendo la respuesta inflamatoria medida por la disminución del número de leucocitos (219). Por el contrario, la adición de gal-3 recombinante actúa como quimioatrayente de macrófagos a modo dosis dependiente, exacerbando la respuesta inmune (220).

A diferencia de la gal-1, la gal-3 se postula como molécula proinflamatoria tanto en el asma como en otras diferentes enfermedades como es la EAE (221), la hepatitis producida por concavalina A (197), la diabetes inducida por estreptozotocina (200) o el melanoma metastático a través de la prevención de la apoptosis de las células, el aumento de la IL-17, la síntesis de IFN- γ y la disminución de la IL-10 (222).

Galectina-9

La gal-9 se identificó por primera vez en la década de los noventa como quimioatrayente y factor de activación de los eosinófilos (223-225). Posteriormente, se ha descrito su participación en distintos procesos biológicos como la adhesión, agregación y muerte celular como se resume en la figura 19. La gal-9 está ampliamente distribuida en el organismo y se ha detectado en el hígado, intestino delgado, timo, riñón, bazo, pulmón, músculo cardíaco y esquelético, reticulocitos y cerebro (226).

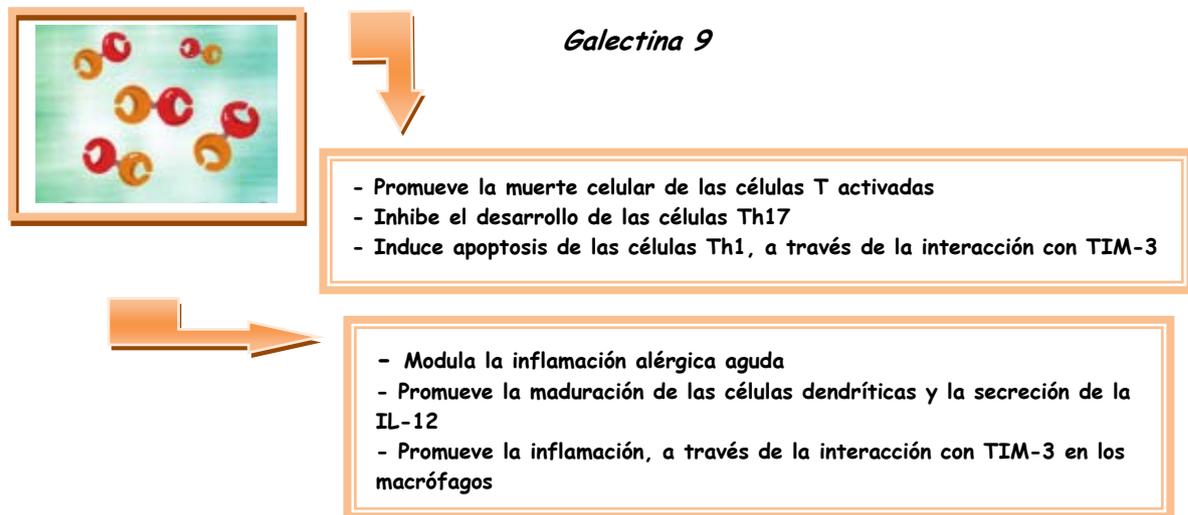


Figura 19. Funciones principales de la galectina 9

La gal-9 regula las células Th1 y Th17, inhibiendo a las células Th17, mientras que aumenta las células T reg FoxP3 (227). Existen múltiples modelos animales de enfermedades como la EAE (228) o la AIC (227) donde la administración de la gal-9 exógena a los ratones deficientes para gal-9 (gal-9^{-/-}) inhibe el desarrollo de las células Th17 e induce la diferenciación de las células T vírgenes a células T reg, mejorando la respuesta inflamatoria de la enfermedad. Recientemente, se ha identificado a la gal-9 como un ligando de Tim-3. Esta molécula es una molécula de la familia de las Ig que se expresa selectivamente en las células Th1, actuando negativamente en estas células (229). Al bloquear o activar la señal Gal-9/Tim-3 se ha visto la progresión de múltiples enfermedades autoinmunes, como la diabetes tipo1 (230), la artritis autoinmune (227), la esclerosis múltiple (231), la EAE (229), las enfermedades alérgicas (232, 233) o el rechazo de trasplante (234). Debido a su potente papel en la supresión de las células T y en la inducción de la tolerancia, la gal-9 se ha considerado una posible candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (229-231). En el caso del asma, el papel de la gal-9 parece ser más complejo y los datos obtenidos en modelos animales muestran datos contradictorios.

Se ha demostrado que la gal-9 tiene un papel como inductor de la apoptosis de las células Th1 (229, 235), por lo que es posible que juegue un papel en el desarrollo de la inflamación de la vía aérea alérgica al actuar no solo como un atrayente de los eosinófilos, sino también al favorecer el balance de la respuesta inmune hacia una respuesta Th2. Lo anterior se apoya en un trabajo realizado en un modelo de ratón de asma inducido por OVA, donde el bloqueo de TIM-3 (ligando de gal-9) tiene efectos beneficiosos al favorecer una respuesta Th1 (236). Otro trabajo realizado en cobayas alérgicas muestra que la gal-9 no actúa en la hipersensibilidad de las vías aéreas pero sí en prolongar la acumulación de los eosinófilos en la inflamación que presenta el pulmón (237).

Sin embargo, existen datos que señalan que la administración intranasal de gal-9 disminuye la HRB y la inflamación de vías aéreas, así como la infiltración de células Th2 en un modelo de ratón de asma inducido por alérgeno (238). Además, se ha observado que en un modelo de ratón con daño pulmonar agudo, la gal-9 reduce los niveles de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, como el TNF- α , IL-1 β , IL-6, neutrófilos, e incrementa la IL-10 en el LBA (239).

En cuanto a la expresión de gal-9 en el asma, se ha descrito que el número de linfocitos, eosinófilos y granulocitos gal-9 positivos, así como los niveles de citoquinas Th2 están aumentados en el LBA de ratones con asma alérgico inducido por OVA comparado con el grupo control (233).

La poliposis nasal es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas superiores que se relaciona de forma significativa con el asma. En este estudio reciente se observa un aumento de la expresión de la gal-9 secretada por los fibroblastos de los pólipos, que son importantes mediadores de la inflamación local (36).

Se ha observado la implicación de la gal-9 en otras enfermedades respiratorias, además del asma. En la eosinofilia pulmonar (tanto en la neumonía eosinofilia aguda como en la crónica) se observa un incremento de la expresión de la gal-9 en el LBA de estos pacientes en comparación con donantes sanos, además de existir una buena correlación con el número de eosinófilos. Por lo que podemos concluir que la gal-9 regula la expresión de los eosinófilos activados en el sitio de la inflamación (240). Posteriormente esto se confirmó en un modelo de ratón con inflamación pulmonar eosinofílica inducida por un parásito, donde existía mayor número de células inflamatorias y mayores niveles de gal-9 comparado con un modelo WT de ratón. Al administrar gal-9 intranasal recombinante en estos ratones se observó una mejoría de la inflamación eosinofílica existente en el pulmón (241).

C. ESTUDIO DE LA INFLAMACIÓN BRONQUIAL

La inflamación bronquial del asma causa directa o indirectamente la aparición de todas las manifestaciones típicas de la enfermedad (síntomas, broncoconstricción e HRB), de las exacerbaciones e incluso las alteraciones estructurales que sufren las vías aéreas (242). La inflamación en la vía aérea es fundamental en la patogenia del asma, aunque no siempre se correlaciona con los síntomas o con el grado de obstrucción bronquial existentes. Por lo tanto, si existiera alguna forma de cuantificar dicha inflamación sería más fácil ajustar el tratamiento y se podría controlar mejor a los pacientes, sabiendo, en cada momento, la situación patológica fundamental que va a provocar los síntomas.

Las recomendaciones actuales para valorar el control del asma no incluyen medidas de inflamación de la vía aérea, pero la necesidad de un método no invasivo y validado para medir dicha inflamación, es vital para el estudio de las enfermedades respiratorias inflamatorias tan prevalentes como es el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Esta inflamación puede ser evaluada de diversas formas, por una parte, se pueden evaluar las consecuencias, es decir los síntomas del paciente y la repercusión funcional. En este sentido la persistencia de la HRB podría ser un marcador de la existencia de inflamación. Sin embargo, las pruebas de función pulmonar, muchas veces, no tienen una clara correlación con la situación clínica del enfermo.

El asma está empezando a ser considerado como un síndrome *overlap*, con otras patologías y fenotipos contribuyendo a una importante heterogeneidad en las manifestaciones clínicas, en la progresión de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento. Los parámetros habituales de evaluación de la inflamación, como son la función pulmonar, son útiles para valorar al paciente asmático, pero son incapaces de discernir entre los distintos subtipos de enfermedad y discriminar qué individuos responderán a los regímenes de tratamiento habituales. La caracterización de los fenotipos del asma y el reconocimiento de estos se asocian con una importante variabilidad en respuesta a las nuevas terapias, lo que ha impulsado la búsqueda de diferentes marcadores de inflamación en el asma.

Sin embargo, el papel de los biomarcadores de inflamación es incierto, pero deberán utilizarse como prueba complementaria a los métodos de diagnóstico clínico, así como en la monitorización de la enfermedad.

La introducción del fibrobroncoscopio durante la década de los 80, permitió obtener, con mayor facilidad, muestras seriadas en distintas circunstancias y, paralelamente, se desarrollaron técnicas de microscopía electrónica, técnicas inmunohistológicas y moleculares, que son la base actual del conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad (243).

La biopsia sigue siendo considerada, hoy en día, por algunos expertos como la prueba de referencia o *gold standard* para la investigación del proceso inflamatorio sobre la mucosa de la vía aérea (244). No obstante, las muestras provienen de la vía aérea central, siendo los cambios existentes en este tramo, no necesariamente extrapolables a los presentes en tramos distales. Mediante la fibrobroncoscopia, podemos obtener muestras del material existente en la luz de la vía aérea central mediante el lavado bronquial (LB), de la vía periférica y

compartimento alveolar mediante el LBA o células de la superficie mucosa (cepillado bronquial), que complementan la información obtenida por la biopsia.

La exploración de la vía aérea mediante el fibrobroncoscopio es una técnica invasiva y, por lo tanto, su utilidad está limitada por su propia agresividad. Tampoco es una prueba aplicable a sujetos con asma grave o durante una agudización ya que un 20% de asmáticos sometidos a la prueba presentan caídas del volumen espiratorio en el primer segundo (FEV₁) superiores al 40% (245, 246).

El método ideal para medir la inflamación a nivel bronquial sería aquel que fuera barato, no invasivo, fácil de realizar, reproducible en el tiempo, con amplia aplicabilidad en diferentes edades y enfermedades, estandarizada, con buena reproducibilidad y buena correlación con el patrón de referencia. En los últimos años se han desarrollado varias técnicas que evalúan de manera no invasiva la inflamación bronquial, que pueden aportar información, importante y precisa, sobre la vía aérea y pueden ser futuros marcadores de inflamación (247). Los más destacados son:

- La determinación de la concentración del Óxido Nítrico en el aire expirado (NO exhalado).
- La cuantificación de diferentes sustancias obtenidas del Condensado del aire exhalado (CAE).
- El Esputo Inducido (EI) y la cuantificación del tipo y número de células existentes en esta muestra.
- La nariz electrónica. En el caso del asma, además de ser útil para el diagnóstico, puede facilitar la identificación de diferentes patrones de compuestos orgánicos volátiles que discriminen de forma rápida y sencilla distintos fenotipos inflamatorios celulares que existen en esta enfermedad, permitiendo un manejo terapéutico más óptimo.

Básicamente, las pruebas de valoración de la inflamación en la vía aérea se dividen en aquellas que evalúan los mediadores (volátiles y no volátiles) en el aire exhalado, en el aire condensado o en la nariz electrónica y aquellas técnicas que valoran la celularidad en el esputo.

De todos los métodos de medida no invasiva de la inflamación bronquial en el asma, el NO exhalado y la cuantificación de eosinófilos en el EI son los que han mostrado una mayor eficacia y su realización se encuentra estandarizada y validada.

D. EL ESPUTO INDUCIDO

La inducción de esputo con suero salino hipertónico para el diagnóstico de la tuberculosis y el carcinoma bronquial aparece en los años sesenta (248), pero no fue hasta la década de los años ochenta cuando volvió a resurgir con el auge de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (249).

La primera utilización moderna con intención de cuantificar la inflamación en pacientes asmáticos data del año 1989 con esputo espontáneo (250) y de 1992 con EI (251), aunque la presencia de células inflamatorias en el esputo de estos pacientes fue descrita por Gollast un siglo antes con el descubrimiento de las espirales de Curschmann y los cristales de Charcot-Leiden. Desde entonces su empleo se ha ido extendiendo, fundamentalmente en el asma pero también en otras patologías como la EPOC.

Existen, al menos, dos escuelas que han estudiado en profundidad y han procurado estandarizar el procedimiento y el análisis del EI. La primera escuela liderada por Dr. Hargreave de la Universidad de Mc Master en Hamilton (Ontario, Canadá) fue pionera en la utilización del recuento de los eosinófilos en las muestras de esputo, como posible medida indirecta de la inflamación de la vía aérea, en pacientes asmáticos. La segunda técnica de inducción de esputo fue diseñada por los Dres. Fahy y Sterk de la Universidad de California (San Francisco, Estados Unidos).

A lo largo de los años, la Universidad de Mac Master ha descrito una serie de publicaciones a través de las cuales se ha validado y difundido el estudio del esputo. En 1989, Gibson demuestra la repetitividad en el análisis del esputo espontáneo obtenido en dos días consecutivos (250). Pin en 1992 salva el problema de la obtención de muestras mediante la inhalación de suero salino hipertónico que induce la expectoración y mejora la calidad de la muestra (251). En 1994, Popov, describe la técnica basada en la adición de ditiotreitól (DTT) a la muestra, permitiendo la obtención de la citocentrífugados, que permiten mejorar la calidad de los recuentos celulares (252). Esta escuela preconiza la selección de acúmulos de moco para posteriormente ser tratados y estudiados. El otro grupo de la Universidad de California ha tenido un papel importante en la estandarización y difusión de la técnica, defendiendo el estudio de todo el material completo expectorado por el paciente para su posterior análisis (253). Cada una de las dos técnicas posee ventajas y desventajas que se resumen en la tabla 3.

| TÉCNICAS DE INDUCCIÓN DE ESPUTO | | |
|---------------------------------|---|--|
| | Selección de acúmulos de moco (Mc Master, Ontario, Canadá) | Selección de la muestra completa (San Francisco, EEUU) |
| VENTAJAS | - Seguridad de que se estudia el material subglótico - Permite expresar los resultados de los recuentos celulares y mediciones de químicos por mg o ml de esputo | - Incluye todo el volumen expectorado de material subglótico - El recuento diferencial de las células no escamosas representa el del fluido que baña la vía aérea. - Los químicos son representativos del tracto subglótico (previa demostración de que sus niveles son inferiores y no se modifican en la saliva) - Rápido - No precisa de criterios de validez de la muestra |
| INCONVENIENTES | - El contenido de las células y químicos puede ser no representativo del fluido de la vía aérea - Significa el establecimiento de conceptos arbitrarios de fiabilidad - Necesita más tiempo para su realización | - La saliva ejerce un efecto dilucional variable sobre la cuantificación de químicos en el esputo, que puede dificultar la repetitividad en los químicos del sobrenadante |

Tabla 3: Ventajas e inconvenientes de los métodos de tratamiento de la muestra de esputo inducido

En 2002, La Sociedad Europea de Respiratorio (ERS o del inglés “*European Respiratory Society*”) elaboró un documento con recomendaciones para la estandarización de la inducción, colección, procesamiento y análisis del EI (254). La técnica de EI ha demostrado validez y reproducibilidad en los recuentos celulares y en las sustancias solubles suficientes para su uso clínico (255, 256) y se han publicado valores de referencia en sujetos sanos (257, 258).

El EI es una muestra de secreción de origen bronquial obtenido de pacientes que no expectoran espontáneamente y a quienes, por tanto, se les induce a producirlo habitualmente con suero salino hipertónico. El esputo está compuesto por básicamente células que se encuentran inmersas en una trama de glicoproteínas, donde también quedan retenidas muchas sustancias incluyendo tanto productos celulares como extracelulares. Todo ello forma un microambiente muy particular que, se supone, refleja lo que sucede a nivel bronquial (259).

La técnica de EI se encuentra sobradamente estandarizada, pero tiene sus limitaciones para su utilización en la práctica clínica habitual, ya que es una técnica laboriosa que requiere de personal de laboratorio entrenado, de una infraestructura específica y los resultados a veces son difíciles de reproducir. La eficacia de los resultados como la inducción de esputo depende de varios factores (260), que se describen a continuación:

- Factores relacionados con las características propias del paciente: historia de tabaquismo, sano/enfermo, grado de inflamación de la vía aérea, edad y diagnóstico.
- Factores relacionados con el procedimiento utilizado: débito del nebulizador (261), tamaño de las partículas producidas, concentración de solución salina, duración de la inhalación, experiencia del técnico, procesado de la muestra (262), éxito de la selección de los tapones de moco (263) y la posterior efectividad en el procesado de la muestra (264).

El mecanismo a través del cual la inhalación de suero salino hipertónico induce la expectoración en el paciente asmático es desconocido, pero es probable que el efecto volumen

sobre las secreciones sea el mecanismo ya que es más efectivo cuando se utiliza suero salino hipertónico que isotónico (260).

Calidad de la muestra

La interpretación del recuento celular total (RCT) y del recuento celular diferencial (RCD) de eosinófilos, neutrófilos, basófilos, macrófagos/monocitos, linfocitos y células epiteliales bronquiales debe tener en cuenta la viabilidad celular, el grado de degeneración celular y el grado de contaminación escamosa celular como indicadores de buena calidad.

INDICADORES DE BUENA CALIDAD DE LA MUESTRA DE ESPUTO

- Viabilidad celular > 50%.
- Grado de degeneración celular (exclusión por Azul de Tripano)
- Grado de contaminación escamosa < 20%

Si la viabilidad celular es baja con un alto grado de degeneración celular, el RCT puede ser artificialmente bajo y el RCD puede ser inexacto. Si la contaminación escamosa es alta, se asume que la cantidad de esputo procedente del tracto respiratorio inferior es baja en la muestra procesada. Cantidades excesivas de contaminación escamosa pueden producir una fiabilidad menor en el RCD al dificultar la identificación de otras células por yuxtaposición (son células muy grandes) y, además, supone una muestra de dudosa representabilidad del tracto respiratorio inferior (263)

La presencia de macrófagos indica que la muestra es del tracto respiratorio inferior y, aunque también pueden observarse monocitos, estos suelen aparecer en las secreciones del tracto respiratorio superior (secreción nasal) donde no hay macrófagos. Por lo tanto, en las muestras con una proporción excesiva de monocitos (>10%) debe sospecharse gran contaminación nasal.

Valores de referencia

Los valores de referencia del RCT y el RCD en sujetos sanos pueden consultarse en la tabla 4 y 5 (257). El RCD del esputo en personas sanas nos muestra un predominio de macrófagos y de neutrófilos, con muy poca proporción de eosinófilos y linfocitos.

El RCT se incrementa en muchas enfermedades respiratorias como la EPOC, el asma no controlada (263, 265), fumadores (263, 266) y, particularmente, en las infecciones. El RCT alcanza sus valores máximos en la infección bacteriana.

| RECuento CELULAR TOTAL Y DIFERENCIAL EN EL ESPUTO (Absolutos, x 10 ⁶ células/g) | | | | | | |
|---|------------------|------------------|---------------|------------------|-------------|-------|
| | MEDIA (DS) | INTERVALO NORMAL | | MEDIANA (IQR) | PERCENTILES | |
| | | MEDIA (- 2DS) | MEDIA (+ 2DS) | | 10 | 90 |
| MACRÓFAGOS | 2,126 (2,027) | -1,928 | 6,18 | 1,644 (1,873) | 0,296 | 4,859 |
| NEUTRÓFILOS | 1,962 (3,027) | -4,092 | 8,016 | 0,865 (1,959) | 0,098 | 4,860 |
| EOSINÓFILOS | 0,013 (0,037) | -0,061 | 0,087 | 0,000 (0,008) | 0,000 | 0,042 |
| LINFOCITOS | 0,043 (0,069) | -0,095 | 0,181 | 0,018 (0,048) | 0,009 | 0,086 |
| CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES | 0,014 (0,037) | -0,06 | 0,088 | 0,006 (0,010) | 0,000 | 0,031 |

Tabla 4. Recuento celular total y diferencial (absolutos, x 10⁶ células/gramos) en esputo. IQR: rango intercuartílico. Modificado de (257)

| RECuento CELULAR DIFERENCIAL EN EL ESPUTO (%) | | | | | | |
|--|---------------|------------------|---------------|------------------|-------------|------|
| | MEDIA (DS) | INTERVALO NORMAL | | MEDIANA (IQR) | PERCENTILES | |
| | | MEDIA (- 2DS) | MEDIA (+ 2DS) | | 10 | 90 |
| MACRÓFAGOS | 58.8 (21.0) | 16.8 | 100.8 | 60.8 (28.9) | 33.0 | 86.1 |
| NEUTRÓFILOS | 37.5 (20.1) | -2.7 | 77.7 | 36.7 (29.5) | 11.0 | 64.4 |
| EOSINÓFILOS | 0.4 (0.9) | -1.4 | 2.2 | 0.0 (0.3) | 0.0 | 1.1 |
| LINFOCITOS | 1.0 (0.04) | -1.2 | 3.2 | 0.5 (1.8) | 0.01 | 2.6 |
| CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES | 1.6 (3.9) | -6.2 | 9.4 | 0.3 (1.3) | 0.0 | 4.4 |

Tabla 5. Recuento celular diferencial del esputo en sujetos sanos en porcentajes. IQR: Rango intercuartílico. Modificado de (257).

Características de las células principales del esputo

• Macrófagos

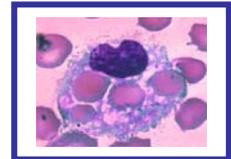
El valor del recuento simple de macrófagos no tiene valor clínico reconocido. Sin embargo, el estudio de su inmunofenotipo por citometría de flujo se ha descrito en el estudio de enfermedad intersticial, tuberculosis y otras enfermedades. Igualmente, el análisis de las inclusiones citoplasmáticas de los macrófagos puede aportar información interesante para el estudio de las broncoaspiraciones (inclusiones lipídicas), hemorragias alveolares o fallo cardíaco izquierdo (hemosideróforos), cuerpos extraños por exposición laboral o viriasis.

Forma variable: esférica, ovoidea, poligonal...

Son células de tamaño medio (12–15 μm).

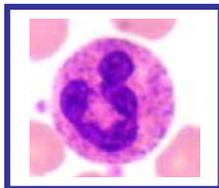
Citoplasma: poco visible que puede ser tanto basófilo como eosinófilo.

Núcleo: ovoide y casi vacío, con poca cromatina. La membrana celular posee invaginaciones y evaginaciones. El núcleo es esférico, excéntrico y con uno o dos nucléolos.



• Neutrófilos

La proporción de neutrófilos es mayor en los fumadores con obstrucción crónica al flujo aéreo (OCFA) que en aquellos que no presentan OCFA. Los neutrófilos aparecen aumentados en los fumadores respecto a no fumadores y en población urbana respecto a la rural. La presencia de neutrofilias mayores del 60% con RCT superiores a 15 millones/ml indica infección en asmáticos y, si el RCT es superior a 25 millones/ml o las neutrofilias superan el 80% es muy sugestivo de infección bacteriana. Su valor en la EPOC está menos establecido.



Miden de 8.5 a 10 μm .

Citoplasma: contiene abundantes gránulos finos color púrpura (con el colorante Giemsa).

Núcleo: cromatina compacta segmentada multilobulado de 2 a 5 lóbulos conectados por delgados puentes.

• Eosinófilos

En sujetos sanos aparecen muy pocos eosinófilos (cercano al 0%). Se consideran valores anormales por encima del 3%. Un aumento de los eosinófilos en el esputo se observa en la bronquitis eosinofílica con o sin las características de asma. La bronquitis eosinofílica sin asma suele asociarse con tos crónica productiva o no y su diagnóstico es imposible sin un recuento de eosinófilos en una secreción del tracto respiratorio inferior.

Su tamaño es semejante al del neutrófilo (10–12 μm).

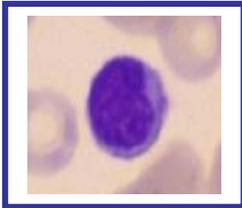
Citoplasma: casi completamente ocupado por unos 20 gránulos acidófilos, pues se tiñen de color naranja o marrón anaranjado con las coloraciones panópticas.

Núcleo bilobulado con un fino puente de cromatina uniendo los dos lóbulos con cromatina agrupada y densa.



• Linfocitos

Los linfocitos son difíciles de identificar de forma exacta, por lo que tienden a incluirse entre los macrófagos/monocitos, obteniéndose valores muy bajos. Actualmente, su recuento tiene escasa utilidad en la práctica, excepto cuando hay un aumento de linfocitos acompañado de un incremento moderado del RCT y de neutrófilos, que es altamente sugestivo de infección vírica.



Son los leucocitos de menos tamaño (7-15 μm).

Citoplasma: Se observa frecuentemente como un anillo periférico de color azul.

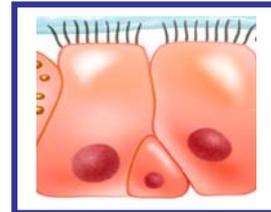
Núcleo: Presentan un gran núcleo esférico que se tiñe de violeta –azul, con una pequeña hendidura y la cromatina es densa sin nucleolos.

La relación núcleo/citoplasma se decanta al núcleo. Poseen un borde delgado de citoplasma.

• Células epiteliales bronquiales

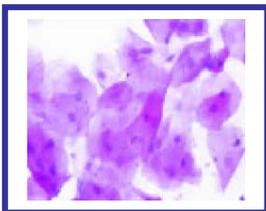
La presencia de abundantes células bronquiales suele verse en las viriasis y tras la recuperación de las exacerbaciones asmáticas. Su presencia fuera de esas circunstancias es de significado desconocido. Principalmente se distinguen dos tipos de células epiteliales: las ciliadas y las caliciformes. Estas últimas están presentes en el esputo en menor cantidad que las células ciliadas.

Las células epiteliales bronquiales ciliadas se reconocen por sus cilios y el núcleo ovoide desplazado basalmente, el citoplasma granular y la base o cola afilada que representa el acoplamiento de la célula a la membrana basal.



• Células escamosas o células epiteliales de vías altas

Las células escamosas proceden de la descamación del epitelio de la cavidad oral, faringe, laringe superior y cuerdas vocales. Se disponen de forma aislada o en grupos simulando sábanas.



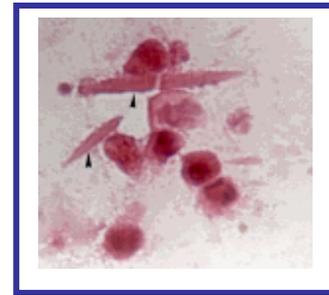
Las células epiteliales de vías altas son células planas con núcleos vesiculares. El citoplasma es basófilo o eosinófilo y no suele presentar inclusiones. La relación núcleo/citoplasma se decanta hacia el citoplasma. El núcleo es central picnótico, redondo u oval, con la cromatina densa dándole una tonalidad oscura.

• Otras elementos visibles

- **Gránulos Eosinofílicos Libres:** Son los gránulos que se visualizaban en el interior de los eosinófilos, que han sido liberados o bien proceden de la fragmentación de éstos. Son estructuras pequeñas granuladas de coloración eosinófila (naranja), que presentan birrefringencia. Suelen estar formando grumos.

- **Cristales de Charcot-Leyden:**

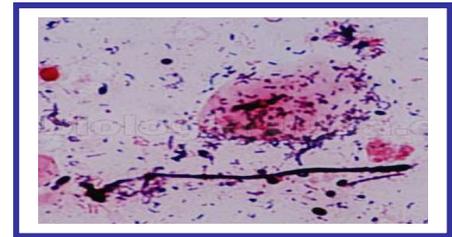
Son estructuras en forma de rombo procedentes de la condensación de gránulos eosinofílicos libres. En las tinciones de May-Grünwald-Giemsa se observa una tonalidad azul pálido.



- **Moco:** Son estructuras mucoides que presentan gran variabilidad en el tamaño y en las formas: bolas, filamentos; más o menos densas y de color azulado.

- **Agentes contaminantes:**

En las muestras de esputo pueden observarse otras estructuras celulares como bacterias y hongos pertenecientes a la flora comensal de las vías aéreas superiores que no son motivo de informe a no ser que se observe una proliferación anormal.



Las bacterias están presentes en diferentes formas (cocos, diplococos, bacilos), agrupaciones y tamaño; los hongos pueden presentarse en forma de levadura o pseudohifas, generalmente pertenecen al género *Candida*.

Tras el procesamiento y el centrifugado de la muestra de esputo se obtienen dos fases: una fase sólida o *pellet*, con las células entrelazadas entre el moco, y la fase líquida o sobrenadante, sin células.

Fase sólida o pellet de la muestra de esputo

El conteo de las células inflamatorias en las muestras de esputo se está posicionado como un método complementario muy valioso para la toma de decisiones en el algoritmo del manejo del asma. La determinación del número de eosinófilos en las muestras de esputo se ha postulado como un parámetro útil para el diagnóstico y el control evolutivo del asma (267, 268). Su utilidad se ha estudiado recientemente por algunos autores. Estos trabajos demuestran que cuando se añade el recuento de los eosinófilos del EI en el manejo del asma, la frecuencia y la severidad de las exacerbaciones de estos pacientes disminuye de forma significativa (256, 269, 270).

Esta técnica se ha utilizado para identificar subpoblaciones de asmáticos, que diferencia entre asma eosinofílico y asma neutrofílico y, por tanto, estos últimos menos propensos a responder a corticoides (271).

En pacientes con asma moderada severa, la ausencia de eosinofilia en esputo no distingue entre pacientes que sufren asma no eosinofílico y asmáticos cuya eosinofilia es

controlada por esteroides. La proteína catiónica del eosinófilo/peroxidasa del eosinófilo positivas, ambas, en macrófagos están incrementadas en el esputo de pacientes con asma moderada severa tratada con GCI, en pacientes con bronquitis eosinofílica y en pacientes que sufren eosinofilia tras la retirada de los corticoides. Por lo tanto, la proteína del eosinófilo, en el macrófago del esputo, es un marcador indirecto de la eosinofilia de la vía aérea que puede identificar asmáticos sometidos a tratamiento con esteroides (272).

En conclusión, el recuento de los eosinófilos y los neutrófilos en el asma son considerados marcadores reproducibles y validados para medir la inflamación de la vía aérea de estos pacientes y, su número, se relaciona con la severidad de la enfermedad (273).

Fase líquida de la muestra de esputo

En la actualidad, existen numerosos mediadores inflamatorios que incluyen una variedad de proteasas, citoquinas, quimioquinas, eicosanoides y que pueden ser medidos en el sobrenadante del esputo. Sin embargo, la validez y reproducibilidad de las distintas técnicas no ha sido todavía establecida.

Además de la propia técnica de inducción de esputo, existen otras tres razones que pueden afectar a la medida de los marcadores de inflamación en el sobrenadante de las muestras de esputo. La primera de ellas es que al procesar la muestra se puede afectar la medición del marcador. En la mayoría de los protocolos se utiliza el DTT, que es agente reductor que recupera las células del esputo a través de la escisión de los puentes disulfuro del moco (262) Sin embargo, el DTT afecta a los puentes disulfuro y también a la medición de algunos marcadores, incluyendo a muchas citoquinas y quimioquinas. Diferentes grupos de investigación han realizado modificaciones en el procesamiento de la muestra de esputo, para optimizar la recuperación de los diferentes marcadores (274). En segundo lugar, las diferentes diluciones que se utilizan para cuantificar el marcador pueden afectar al resultado. En la actualidad no existe ningún factor validado para corregir este problema (275). Y por último, algunos marcadores pueden permanecer por debajo del límite de detección de técnicas ampliamente utilizadas, por lo tanto se requieren técnicas de detección más sensibles (276).

Utilidad del esputo en la práctica clínica habitual

A pesar de las limitaciones de la técnica de EI se han descrito una serie enfermedades en las cuales la utilidad es clara y establecida. En la práctica clínica habitual, el EI se utiliza para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades respiratorias tan prevalentes como son el asma, la EPOC, la tos crónica, el goteo postnasal, o la Insuficiencia cardíaca.

Aunque la mayor utilidad del EI se ha realizado en pacientes con asma y EPOC, el estudio de las muestras de esputo obtenidas mediante nebulización ultrasónica con suero salino hipertónico ha mostrado utilidad para otras enfermedades respiratorias como tumores, enfermedades infecciosas o incluso enfermedades intersticiales (277-279).

El esputo es útil en los pacientes asmáticos en los siguientes casos:

- En pacientes con asma de control difícil ayuda a ajustar la dosis de corticoides puesto que los eosinófilos son muy sensibles a los corticoides, ya que una dosis adecuada que mantenga el control de la enfermedad reducirá los límites a la normalidad. La identificación de un patrón citológico no eosinofílico en un paciente con asma que está asintomático permite presuponer que el incremento de la dosis de esteroides, probablemente, no aportará beneficio alguno al control del proceso (280).
- Permite aclarar si el paciente está cumpliendo el tratamiento de forma correcta. La eosinofilia persistente en esputo puede ser indicador de incumplimiento terapéutico por parte del paciente, que la dosis de esteroides es insuficiente (281, 282) o un marcador de mal control, ya que hay algunos trabajos que han podido establecer una correlación entre la eosinofilia en esputo y la gravedad de la enfermedad (283). Se acepta por la mayoría de los autores que un asmático bien controlado presenta un porcentaje de eosinófilos inferior al 3% en las muestras de esputo.
- Poder diferenciar el tipo de inflamación y sus diferentes causas. Varios estudios han demostrado que la eosinofilia en esputo precede, incluso semanas, a los síntomas y a los cambios funcionales (284). Pero en el esputo, además de los eosinófilos, pueden aparecer otras células. Incrementos de los neutrófilos y los linfocitos, nos orientan hacia otro tipo de inflamación neutrofílica (infección, fumadores...) o linfocítica (Sarcoidosis, *Chlamidia pneumoniae*...) (285)
- Valorar si mejora o no la inflamación en esputo en pacientes que siguen tratamiento con antileucotrienos (286).

En la enfermedad laboral, nos ayudará a llegar al diagnóstico realizando mediciones seriadas durante el trabajo y en los periodos de vacaciones (287). El recuento de eosinófilos en esputo es útil tanto, si se observa un incremento o la aparición de los mismos tras la exposición laboral, sin otras causas que lo justifiquen, como si desaparecen o se reducen cuando el paciente se separa del ambiente laboral.

En el reflujo gastroesofágico o en la sospecha de broncoaspiraciones, el esputo nos puede ayudar ya que podemos observar inclusiones lipídicas en los macrófagos con la tinción de aceite O Rojo (288, 289).

Para el diagnóstico de la Bronquitis eosinofílica si observamos más de un 3% de eosinófilos en el esputo, en ausencia de otros criterios de asma (250, 290-292).

La presencia de hemosiderina en los macrófagos el esputo demuestra alteraciones de los capilares en los pacientes con disfunción del ventrículo izquierdo. Por lo tanto, la presencia de hemosiderina en los macrófagos del esputo es un método sensible y específico para la detección de la Insuficiencia cardíaca izquierda en pacientes con disnea con o sin la existencia de enfermedad respiratoria y podría ser una alternativa al ecocardiograma (289).

La técnica de EI con suero salino hipertónico puede aportar interesantes posibilidades clínicas y de investigación, ya que el estudio citológico de las muestras y de los marcadores celulares de inflamación, como los eosinófilos o neutrófilos, así como de determinadas

citoquinas y quimioquinas ofrece la posibilidad de progresar, con método no invasivo, en el conocimiento de los mecanismos de enfermedades inflamatorias de sistema respiratorio como el asma o la EPOC (293), y ser una alternativa, práctica y viable, para estudiar muestras seriadas en un gran número de pacientes.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



A. JUSTIFICACIÓN

El asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica donde participan múltiples células y mediadores de inflamación. La inflamación de las vías aéreas en esta enfermedad se relaciona con una respuesta inapropiada de los LT a alérgenos ambientales, con la activación de numerosos tipos celulares, donde los linfocitos Th2 tienen un papel fundamental en la producción de la IgE y de la eosinofilia.

Por otra parte, las gal son proteínas que han emergido como importantes reguladores de la respuesta inflamatoria, donde ejercen importantes funciones sobre gran variedad de células entre las que se encuentran: los LT, las DCs, los neutrófilos y los eosinófilos entre otras células del sistema inmune. Estas proteínas influyen en el balance de las respuestas Th1, Th2 y Th17 y su papel, como moléculas inmunorreguladoras, está apoyado por su estudio en múltiples modelos animales de distintas enfermedades inflamatorias autoinmunes, incluida el asma donde el papel de la gal-3 y la gal-9 se ha estudiado en profundidad. Los datos que apoyan la influencia de las gal en la patogenia del asma bronquial provienen de estudios *in vitro* y de modelos animales.

Se ha descrito que la gal-1 y la gal-9 inducen la apoptosis de LT activados, suprimen la expresión de determinadas citoquinas inflamatorias e influyen en la generación y función de células T reg. Ambas proteínas parecen favorecer el balance hacia una respuesta Th2 (173, 176). La aplicación exógena de ambas gal han demostrado tener eficacia inmunosupresora en diferentes modelos animales de enfermedades inflamatorias autoinmunes (195-200). Sin embargo, no existe actualmente ningún estudio sobre el papel de la gal-1 en el asma, ni siquiera en modelos animales. Aunque, existe evidencia de que esta gal inhibe la migración de los eosinófilos en la poliposis nasal (201). Estas observaciones sugieren que dicha gal puede desempeñar un papel en el asma, por la implicación de los eosinófilos en esta patología y su relación con la poliposis nasal. Además, como se ha dicho anteriormente, las funciones que la gal-1 ejerce sobre las células del sistema inmune apoyan fuertemente su implicación en la respuesta inmune del asma.

La función más conocida de la gal-9 es la de presentar actividad quimiotáctica selectiva para los eosinófilos (223-225). Los datos que apoyan el efecto de esta gal en modelos animales de asma son dispares, y no existen estudios en la actualidad con pacientes asmáticos que aclaren el papel de la gal-9 en la respuesta inmune del asma.

La gal-3 se postula como molécula proinflamatoria pero su papel en un modelo humano de asma sólo se ha estudiado a través de sus ligandos en un estudio reciente.

B. HIPÓTESIS

Las gal, entre ellas la gal-1, la gal-3 y gal-9, pueden actuar como moléculas inmunorreguladoras en la respuesta inmune e inflamatoria que presenta el asma.

C. OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Determinar el posible papel de la gal-1, gal-3 y gal-9 en la inmunopatogénesis del asma.

Objetivos Secundarios:

- I. Determinar los niveles de expresión de la gal-1, gal-3 y gal-9 en muestras de EI de pacientes adultos con diagnóstico de asma y de sujetos sanos mediante RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction), citometría de flujo e inmunofluorescencia.
- II. Estudiar el posible papel de las gal en la regulación del asma, modulando la respuesta Th2.
- III. Estudiar la expresión de las gal sobre diferentes citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS



A. Protocolo del estudio

Diseño del estudio

Para conseguir los objetivos enunciados en el capítulo anterior de este trabajo, se planteó un estudio prospectivo de casos controles sobre una cohorte de enfermos con asma bronquial estables, en seguimiento en la consulta monográfica de asma del Hospital Universitario de La Princesa en Madrid, en comparación con sujetos sanos.

La indicación de la prueba de EI fue establecida, en todos los casos, por un médico especialista en Neumología. La realización de la técnica de inducción de esputo fue realizada siempre por el mismo Neumólogo para evitar sesgos en la obtención de la muestra

Procedimientos

A cada paciente se le realizaron, siempre en este mismo orden, los siguientes procedimientos o determinaciones:

- Revisión de la historia clínica.
- Explicación del estudio y obtención del consentimiento informado.
- Cuestionario de control de asma (únicamente en los pacientes asmáticos).
- Medición de la Fracción exhalada de Oxido Nítrico (FeNO).
- Explicación de la Técnica de inducción de esputo y obtención del consentimiento informado.

B. Selección de los sujetos incluidos en el estudio

La selección de pacientes incluidos en el estudio se llevó a cabo de modo consecutivo en la consulta monográfica de asma, desde enero 2010 a enero 2011 en el Servicio de Neumología del Hospital Universitario de La Princesa en Madrid. Para ello, se establecieron los siguientes criterios:

Para los pacientes asmáticos:

1. Criterios de inclusión:

- Diagnóstico de asma bronquial según los criterios actuales de la GINA.
- Capacidad de realización de la técnica de EI.
- Situación clínica estable, en ausencia de crisis asmáticas durante las 4 semanas previas a su inclusión.
- Consentimiento informado por escrito para la participación en el estudio.

2. Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnósticos alternativos al asma, como otras enfermedades respiratorias crónicas como la EPOC, Fibrosis Quística,...

- Pacientes que no acepten participar en el estudio.
- Pacientes en tratamiento con corticoides orales las 4 semanas previas al inicio del estudio.
- Crisis asmática o ingreso hospitalario en las 4 semanas previas al inicio del estudio.
- Administración de antibióticos orales ó antibióticos intravenosos en las 4 semanas previas al inicio del estudio.
- Contraindicaciones relativas, ya que no existen contraindicaciones absolutas, para realizar la técnica de inducción de esputo,. Se recomienda no realizar la inducción a pacientes con hipertensión arterial descontrolada o severa, en pacientes con un FEV1 postbroncodilatador menor de 1.5 litros o en pacientes con antecedentes de neumotórax espontáneo o hemotórax.

Para los controles:

1. Criterios de inclusión:

- Pacientes sanos que voluntariamente acepten participar en el estudio, sin enfermedades respiratorias conocidas, ni otras enfermedades crónicas inflamatorias que puedan alterar los resultados del mismo.

2. Criterios de exclusión:

- Todos aquellos voluntarios sanos que no acepten formar parte del estudio.

C. Aspectos éticos

Para la inclusión en el estudio, todos los sujetos firmaron el consentimiento informado para la realización de la técnica de Inducción de Esputo, además de la hoja de información del estudio, aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario de La Princesa en Madrid.

La carta de aprobación del estudio por parte de este Comité de Ética, el consentimiento informado de la prueba de inducción de esputo y la hoja de información de estudio que se entrego a cada uno de los participantes del trabajo se muestran en el Anexo 1

D. Métodos empleados

Revisión de la historia clínica y recogida de variables clínicas

Se realizó una valoración de los antecedentes clínicos y funcionales de cada sujeto y se recogieron una serie de variables clínicas en todos ellos.

Variables analizadas:

1. **Edad:** Años.
2. **Sexo:** Masculino / Femenino.
3. **Variables antropométricas:** Todos los sujetos fueron pesados y medidos descalzos previa a la realización de la espirometría.
4. **Historia de tabaquismo:** Si / No / Exfumador.
Se consideró fumador activo a aquellos pacientes que fumaban al menos 1 cigarro al día durante más de un año y ex fumador a los que llevaban más de 6 meses sin fumar.
5. **Índice de paquete-año (IPA):** Es el índice que indica el consumo de tabaco a lo largo de toda la vida del sujeto.

Es el cociente que resulta de la siguiente división:

$$\frac{\text{Número de cigarros/día x número de años que han fumado}}{20 \text{ (= número de cigarros que contiene un paquete)}}$$

6. **Clasificación del asma según gravedad:** Intermitente / Persistente leve / Persistente Moderado / Persistente grave.
Dado que se trataba de pacientes que recibían tratamiento previo, la clasificación de los pacientes asmáticos se realizó en función del escalón terapéutico que necesitaban para mantener su control clínico según GINA (294). En el Anexo1 se muestra la clasificación de la GINA.
7. **Tiempo de evolución de la enfermedad:** Años.
8. **Historia de poliposis nasal y/o rinitis:** Si / No.
La rinitis fue diagnosticada cuando el paciente refería obstrucción nasal, rinorrea, picor, dolor facial, estornudos frecuentes o anosmia. La poliposis nasal fue diagnosticada por un escáner de senos paranasales o por una rinoscopia.
9. **Estado de atopia:** Si / No.
Los pacientes se clasificaron en atópicos y no atópicos según presentarán sensibilización a uno o más aeroalérgenos por IgE específica en sangre y/o pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata (“prick test positivo”).
10. **Función pulmonar.**
La espirometría que evaluó la función pulmonar se realizó mediante un espirómetro (Jaeger, Wuerzburg, Alemania). Dicho equipo cumple todas las especificaciones requeridas por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (295), por la “American Thoracic Society” (ATS) (296) y por la “European Respiratory Society” (ERS) (297). Siguiendo las recomendaciones vigentes (295-297), se efectuó una calibración diaria con una jeringa de tres litros. Los sujetos fueron instruidos antes de llevar a cabo la exploración, debiendo permanecer sentados, en posición erecta, sin cruzar las piernas y con la nariz ocluida con una pinza nasal. Todos realizaron un mínimo de tres maniobras reproducibles y un máximo de ocho. Se seleccionaron los siguientes valores de forma automática, según la normativa de la ATS (296) (mejor resultado de las tres maniobras satisfactorias, que no exceda al siguiente en más del 5% ó 100 ml): capacidad

vital forzada (FVC) y su porcentaje sobre el valor teórico, el FEV₁ y su porcentaje sobre el valor teórico, y el cociente entre FEV₁/FVC.

- 11. Síntomas:** según la puntuación obtenida en el cuestionario Asma Control Test (ACT) entre 5 a 25.

En 2004, se desarrolló un cuestionario conocido como ACT, consistente en 5 preguntas en relación a la frecuencia de los síntomas (disnea, síntomas nocturnos, limitaciones en la actividad), uso de medicación de rescate que el paciente ha precisado en las últimas 4 semanas y la calificación subjetiva del paciente respecto al control del asma, con puntuaciones que pueden oscilar desde 5 (peor control) a 25 (control total). Se ha estudiado la relación de este cuestionario con los grados de control según GINA para establecer los puntos de corte. Así, valores >20 indican asma bien controlado, mientras que valores <15 indican asma mal controlado (298). En la sección de Anexo1 se muestra el cuestionario de ACT.

- 12. Tratamiento habitual del paciente.**

Se registraron los fármacos que pudieran interferir y que estuvieran tomando en el momento de la prueba y en las cuatro semanas previas a la inclusión del estudio. En concreto, se preguntó directamente por el consumo de corticoides inhalados (SI/NO) y esteroides sistémicos (SI/NO). A todos los pacientes asmáticos se les permitió continuar con su medicación antiasmática, incluyendo los GCI, clasificando a los pacientes según la dosis que tomarán de los mismos de la siguiente forma: menos de 500 µg de dipropionato de beclometasona o su equivalente al día; 501- 1000 µg de dipropionato de beclometasona o su equivalente al día y más de 1000 µg de dipropionato de beclometasona o su equivalente al día.

- 13. FeNO:** en partes por billón (ppb).

La fracción de óxido nítrico exhalada se realizó por electroquímica a través del aparato portátil Niox-Mino^R (Aerocrine, Solna, Suecia) para cuantificar la inflamación eosinofílica de la vía respiratoria.

Todas las variables fueron incluidas en una base de datos elaborada mediante el programa Microsoft Excell 2003 (Microsoft Office).

E. Técnica de inducción de esputo (ver Protocolo en Anexo1)

1. Todos los participantes del estudio fueron informados sobre el procedimiento de la prueba a realizar firmando previamente el consentimiento informado.
2. A todos los pacientes se les realizó una espirometría, registrando el valor del FEV₁, según los criterios previamente descritos.
3. Tras esto, se administraron 200 µg de salbutamol por vía inhalatoria con un dosificador medido. Se esperaron 10 min y se repitió la espirometría. Si el FEV₁ era igual o menor de 1.5 litros, no se continuaba con la prueba excepto bajo supervisión médica. La prueba se suspendió en aquellos sujetos donde el FEV₁ era menor de 1 litro. Si el FEV₁ era mayor de 1.5 litros se continuó con la prueba. Se le explicó al paciente cómo debía obtener el esputo desde sus pulmones por medio de la tos y el carraspeo profundo.
4. La solución salina se colocó en la cazoleta del nebulizador y se montaron las piezas estériles en el aparato para poder iniciar la inducción. La solución salina isotónica (0.9%) se obtiene de frascos comerciales estériles y herméticamente cerrados (Suero Fisiológico 0,9%, Braun Medical, España). La solución salina hipertónica al 3,4 y 5% fue reconstituida por el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de La Princesa, a partir de 50 mililitros (mL) de agua destilada con el adecuado peso de Cloruro Sódico y colocado en botellines de plástico de 50 mL, estériles y con tapón hermético.



*Nebulizador
Ultrasónico
Omron U-17*



*Solución Salina
Hipertónica al 4%*



Piezas estériles del Nebulizador Ultrasónico:

- Boquilla.
- Tubo corrugado.
- Cazoleta y adaptador para el suero salino hipertónico.

Posteriormente se realizó una nebulización con solución salina hipertónica al 3% (Nebulizador Ultrasónico Omron U-17) por un periodo de siete minutos. La inhalación se paraba si el paciente comenzaba con tos persistente, tirantez torácica, sibilancias o disnea.



Inducción de Esputo en sujeto sano

5. Previo al intento de expectoración, se solicitó al paciente eliminar las secreciones nasales, enjuagar la boca y la garganta con agua corriente y luego se le pidió que tosiera con energía para expectorar las secreciones bronquiales.
6. Se realizó una espirometría para medir el FEV1. Si el FEV1 posterior a la nebulización disminuía menos del 10% del valor previo, se continúa la inducción con una concentración de suero salino al 4% durante otros 7 min. Y, posteriormente, se continuaba con una solución salina al 5%. Si por el contrario, el FEV1 disminuía entre un 10 y un 20% del valor previo, se continuó con la misma concentración de suero salino hipertónico. La técnica se suspendió si el paciente presentaba síntomas de dolor torácico, tirantez torácica, sibilancias o disnea ó si el FEV1 era menor del 20% del valor basal.
7. El esputo expectorado se procesaba de inmediato. Si no era posible, la muestra se conservaba a 4°C por un periodo no mayor de 2 horas.

NOTAS GENERALES PARA LA INDUCCIÓN DE ESPUTO

- ✓ Limpiar el nebulizador para evitar que la sal se seque y se pegue a las paredes.
- ✓ Es más importante la CALIDAD DEL ESPUTO, que la cantidad (es importante explicárselo a los pacientes).
- ✓ Es importante que no degluta el esputo.
- ✓ Si el paciente no puede expectorar: pedir al paciente que realice maniobras de carraspeo, una inspiración máxima y, posteriormente, un golpe de tos para conseguir que la muestra proceda de los pulmones.
- ✓ Si no tose espontáneamente, se puede dejar al paciente que descanse 1 o 2 minutos y posteriormente volver a intentarlo.
- ✓ Mantener la zona aireada.
- ✓ Cuando el paciente está tosiendo, el observador debe mantenerse al menos a un metro de distancia y cubrir el área de trabajo. Después de cada paciente limpiar el área de trabajo.

F. Procesamiento del esputo inducido

1. Protocolo de procesamiento para obtener una solución de células sin moco.
2. Protocolo para el recuento celular total y viabilidad celular de la muestra.
3. Protocolo de tinción de la muestra y citospin.

F.1. Obtención de una solución de células sin moco

- A. Para el procesamiento de la muestra se utilizó el método de Hargreave (263) con algunas modificaciones, que a continuación vamos a describir.

Material de laboratorio que se utilizó para el procesamiento de las muestras de esputo inducido



- B. El esputo se colocó en una placa de Petri desde el recipiente de recogida y se anotó la apariencia macroscópica del esputo en la hoja de datos (ver anexo 1). Con unas pinzas finas seleccionamos los tapones de moco hasta conseguir un volumen de peso entre 100-800 miligramos (mg), procurando siempre que existiera la menor cantidad posible de saliva.

Tapones de moco en la placa de Petri



- C. El volumen total de esputo obtenido se depositó en un tubo de 10 mL para poder pesarlo en una balanza analítica. Se anotó el peso en la hoja de datos (ver anexo 1).



Peso de tubo



La balanza se pone a 0 con el tubo blanco

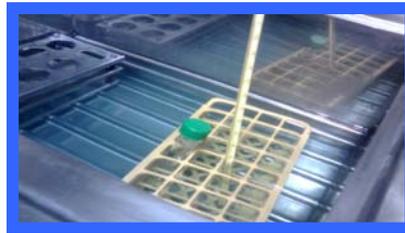


Peso de la muestra de Esputo Inducido

- D. A la muestra se le añadió DTT al 1% (Sputolysin® Reagent Cat No 560000 Calbiochem, La Jolla, USA) en un volumen equivalente a 4 veces el peso de la fracción seleccionada. (4 x peso de la muestra=mL de DDT que habría que echar). El DTT es una sustancia que actúa rompiendo los puentes disulfuro y liberando a las células de la matriz mucoproteica que contiene el esputo. La muestra se agitó en un mezclador a velocidad media durante 10-15 seg. y, posteriormente, se mezcló con una pipeta Pasteur hasta asegurarnos visualmente que la muestra estaba adecuadamente mezclada. A continuación, el tubo se colocó en un baño con agitación a 37°C durante 30 min.



Vórtex 15''



Baño con agitación 30' a 37°C

- E. Se agregó tampón de fosfato salino 0.1 M (PBS) al mismo volumen que se utilizó el DTT, agitándose en un mezclador a velocidad media durante 10-15 seg.

La muestra se agitó con vortex durante 15'' a velocidad media y se utilizó la pipeta Pasteur para homogeneizar bien el esputo

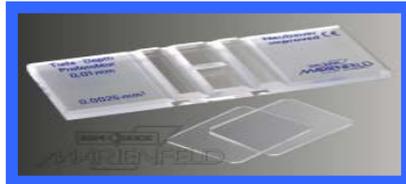
- F. Para aumentar la pureza de la muestra se utilizó un filtro de 70 μm de poro (Cell Strainer; BD Falcon Erembodegem, Bélgica). Posteriormente, la solución se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min.

Filtro de 70 μm de poro



F.2. Recuento celular total y viabilidad celular de la muestra

- A. El *pellet* se resuspendió en 1 mL de PBS y se realizó el contaje celular con la cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se determinó con la técnica de exclusión Azul de Tripano. Finalmente, las células se ajustaron a una concentración final de 1 millón de células/mL en PBS.



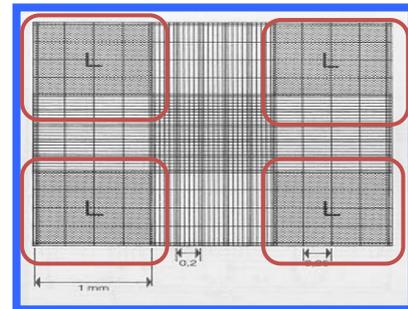
Cámara de Neubaver



Cámara de Neubaver montada con la muestra de Esputo Inducido en Azul de Tripano.

Las células se clasificaron como: Viables (V), no viables o muertas (M) y células escamosas (CE). La tinción de Azul de Tripano colorea aquellas células cuya membrana celular está dañada, excluyendo aquellas que están intactas, sanas o viables. Por lo tanto, distingue como “células viables” aquellas que NO se tiñen de azul y como “células no viables” aquellas que SI se tiñen de azul.

Se contaron todas las células (incluidas las escamosas) presentes en cada una de los cuadrados de las 4 esquinas de 1x1 mm de la cámara (cada uno de los cuadrados tiene 16 cuadraditos de 0.25x 0.25 mm).



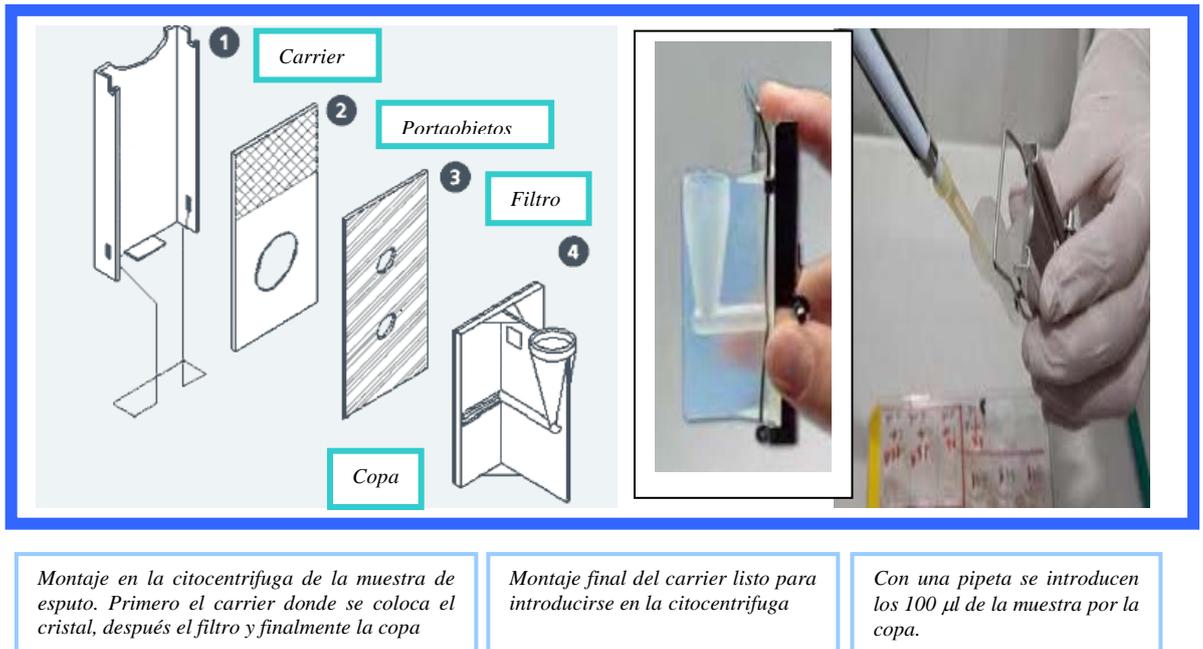
El recuento celular total y la viabilidad se anotó en la hoja de análisis del esputo (Ver anexo1)

RCT (Recuento celular total) = E (total de las células)-CE (células escamosas)

V (Viabilidad) (%)=V (vivas) / RCT x 100

F.3 Tinción de la muestra y citospin

- A. Para la realización del citospin, se tomaron 100 microlitros (μl) de la muestra resuspendida a 1×10^6 células/mL y se colocaron en el portaobjetos mediante un sistema de montaje de una citocentrífuga, de manera que las células se sitúan en un área circular bien ordenada. Se colocaron varios cristales con 100 μl de células en suspensión a una concentración conocida para realizar el RCD y la inmunofluorescencia. Una vez colocadas las muestras en la citocentrífuga, se centrifugaron a 500 rpm 5 min.

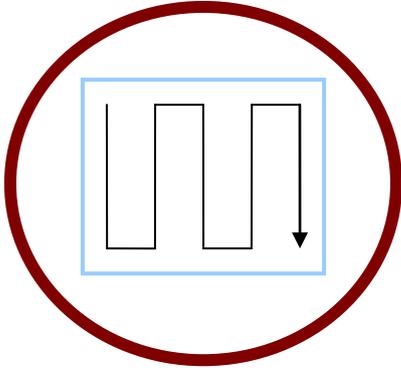


- B. TINCIÓN DE DIFF-QUICK: un único cristal se utilizó para realizar la tinción. Una vez teñido, se realizó el RCD de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, linfocitos y células epiteliales bronquiales. La tinción es muy fácil y muy rápida, consiste en 5 pasos que se muestran a continuación:

1. Fijar las preparaciones-METANOL 5 pases de 1 segundo.
2. Teñir con colorante 1 (hematoxilina): 5 pases de 1 segundo.
3. Teñir con colorante 2 (eosina): 5 pases de 1 segundo.
4. Lavar y dejar secar al aire.
5. Montar la preparación con DPX y dejar secarlo bien.

C. RECUENTO CELULAR DIFERENCIAL:

Una vez seco el cristal teñido, se procede al RCD sobre 400 células en un microscopio óptico.



Dirección que se sigue en el campo del microscopio para evitar pasar por zonas donde ya se ha realizado el conteo

*Se realiza un examen rápido de toda la preparación en un microscopio óptico con el objetivo de 100x.
El recuento se realiza con el objetivo de 400x o 1000x (con aceite de inmersión) con un mínimo de 400 células inflamatorias
Anotándose el RCD y los porcentajes sobre el total de las células en la hoja de análisis del esputo (ver anexo1)*



G. Técnicas inmunológicas que se realizaron con las muestras de esputo

Una vez hecho el conteo celular y con las células resuspendidas a una concentración conocida (1×10^6 /mL) se realizaron las siguientes técnicas inmunológicas:

G.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA SEMICUANTITATIVA A TIEMPO

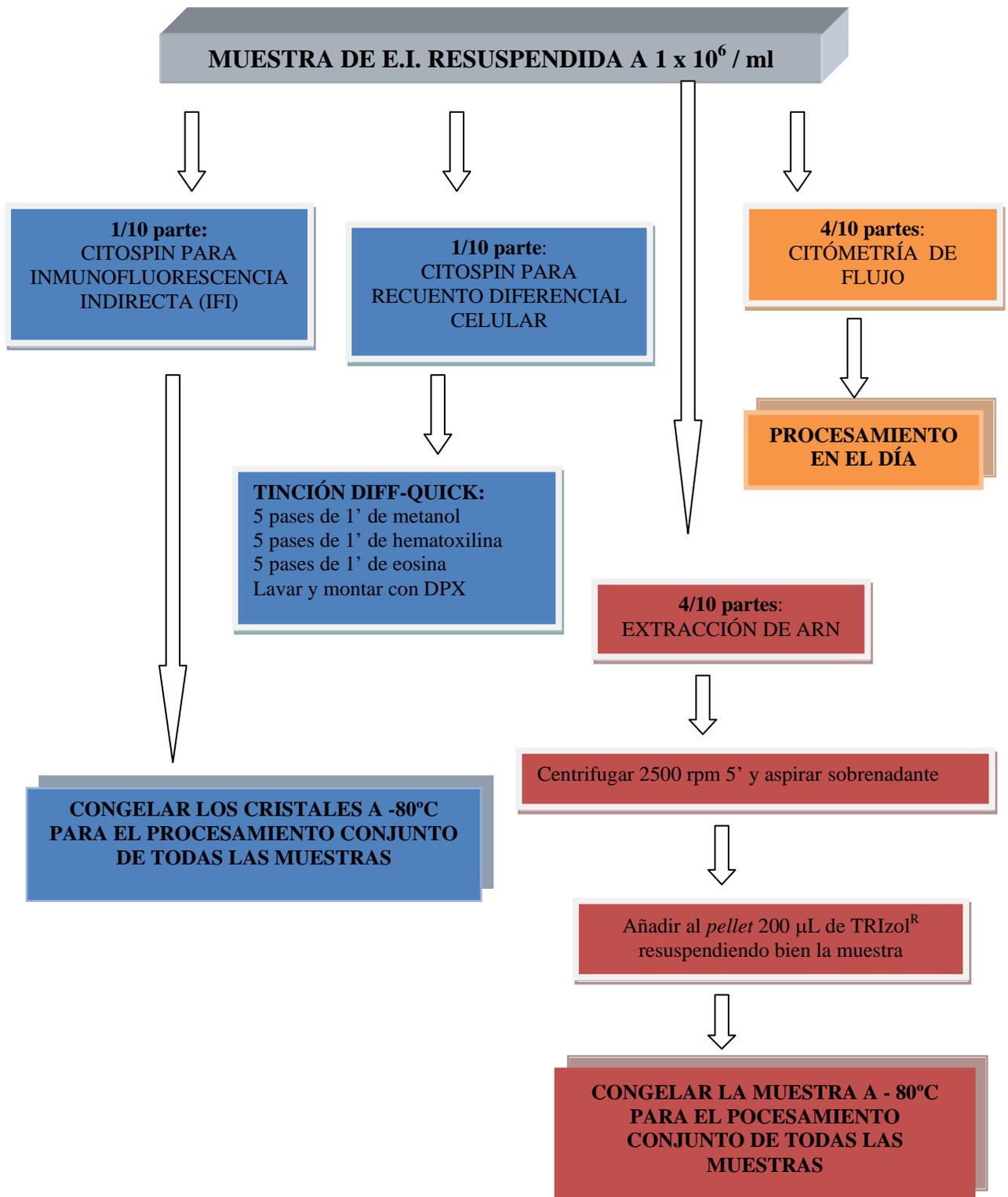
REAL (RT-PCR): se extrajeron 4 décimas partes de la muestra resuspendida en PBS (es decir, si teníamos 1 millón células en 1 mL cogíamos 400 mL), se centrifugó y se aspiró el sobrenadante y se añadieron 200 mL de TRIzol^R resuspendiendo bien la muestra y congelándola a -80°C hasta su procesamiento. Una vez capturadas todas las muestras de esputo de los pacientes y sujetos sanos, se realizó la extracción del ARN para la determinación de la expresión génica mediante RT-PCR (esquema en ROJO).

G.2. CITOMETRÍA DE FLUJO: Para la técnica de citometría de flujo se utilizaron 4 décimas partes de la muestra resuspendida en PBS, esta técnica se llevó a cabo el mismo día de la toma del esputo (esquema en NARANJA)

G.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI): el resto de la muestra, es decir 1 décima parte, se utilizó para realizar los citospines obtenidos a través de la citocentrífuga como se describe previamente. Uno de los cristales se utilizó para realizar el RCD, y el resto para realizar IFI (esquema en AZUL)

* Si al realizar el RCT existían $<5 \times 10^5$ células en el esputo, la muestra sólo se analizó bien para RT-PCR bien para citometría de flujo.

ESQUEMA GENERAL DE LAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS UTILIZADAS EN LA MUESTRA DE ESPUTO



G.1. Análisis por PCR semicuantitativa a tiempo real en el esputo

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP), cuyas iniciales en inglés son PCR (*polymerase chain reaction*), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Esta técnica ha revolucionado el campo de la biología molecular por sus importantes características de sensibilidad, especificidad, eficiencia, mínimo riesgo de contaminación y relativa sencillez de uso y ha puesto al alcance de cualquier laboratorio de investigación y diagnóstico la capacidad de realizar ensayos moleculares.

La esencia de la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro gen de interés. Con este método se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de un enzima, la ADN polimerasa, que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina) y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, o en inglés *primer*). Para ello, se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las hebras de ADN para que vuelvan a ser duplicadas.

El primer paso que se realizó en las muestras de esputo fue aislar el ARN de la muestra con TRIzol RNA reagent^R (Invitrogen, OR, USA). Todas las muestras se congelaron a -80°C con TRIzol^R hasta que conseguimos finalizar el reclutamiento de todas ellas, tanto de pacientes como de sujetos sanos. Una vez recolectadas todas las muestras, se realizó en todas ellas la extracción de ARN y la síntesis de la primera cadena de ADN mediante retrotranscripción inversa, como se muestra en la figura 20, para posteriormente realizar la PCR semicuantitativa a tiempo real.

El TRIzol^R es un reactivo que se utiliza en el aislamiento del ARN de células y tejidos. Es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que, durante la homogenización o lisis de la muestra, mantiene la integridad del ARN.

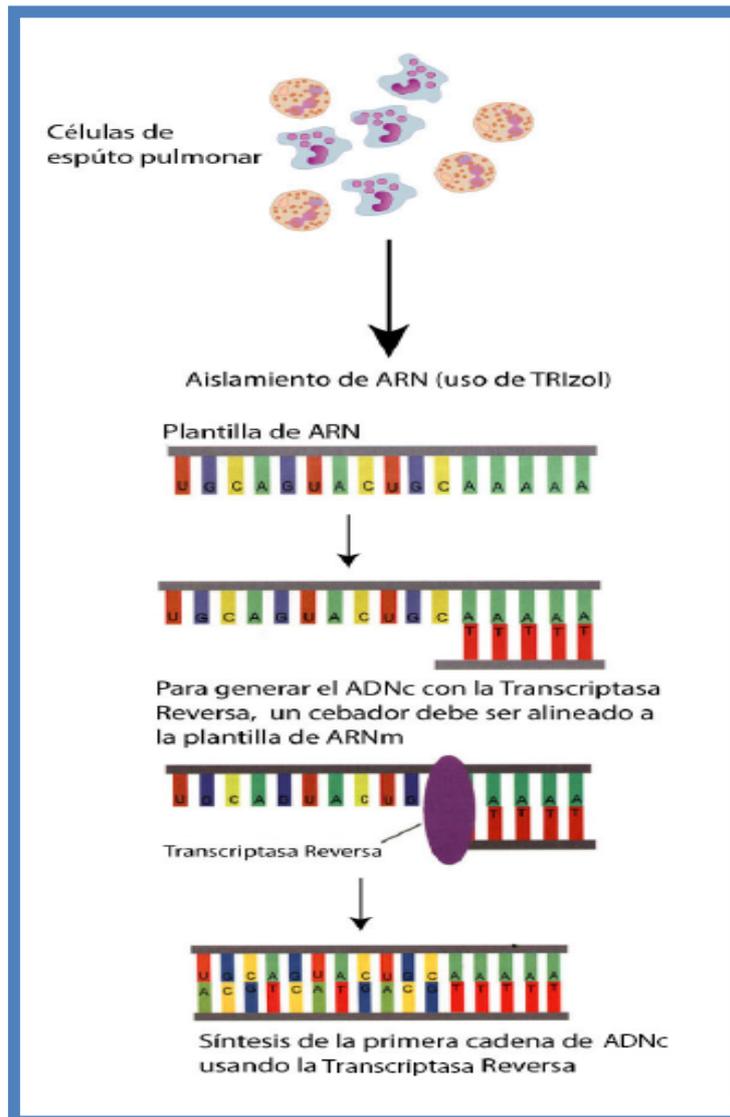
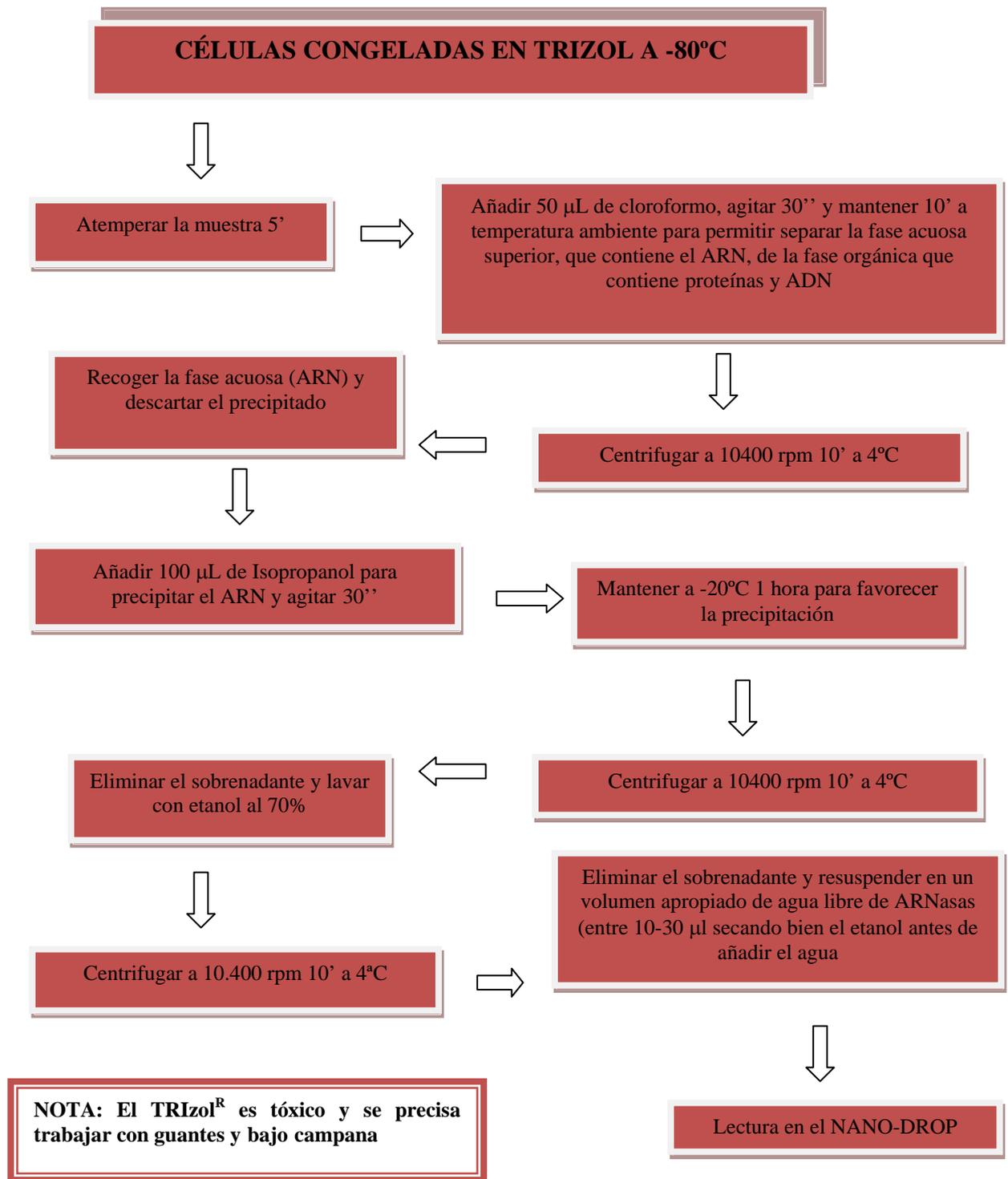


Figura 20. Retrotranscripción inversa o reversa. Extracción de ARN y síntesis de la primera cadena de ADN

El protocolo utilizado para la extracción del ARN se expone en el siguiente esquema.

ESQUEMA DE PROTOCOLO UTILIZADO PARA LA PCR SEMICUANTITATIVA



Un espectrofotómetro ND-100 o nanodrop (Nano-drop, Wilmington, USA) para medir la cantidad de ARN de cada muestra en ng/mL a través de leer la absorbancia de luz ultravioleta a 260nm (A260) (figura 21-22). Con el Nano-Drop es posible determinar con precisión la pureza y la concentración inicial de ARN.

Figura 21. Espectrofotómetro o Nano-Drop 1000

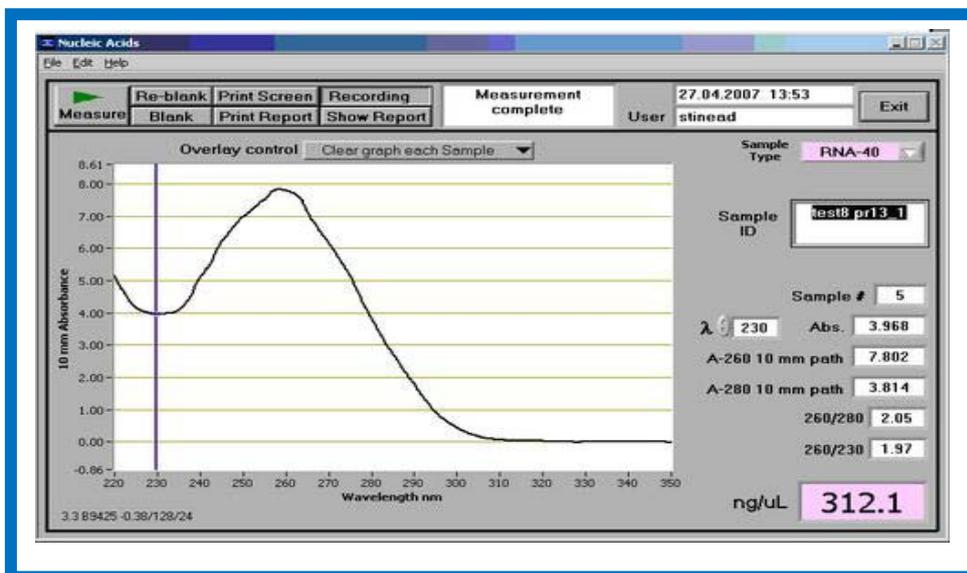


Figura 22. Medición de la concentración de ARN a través del espectrofotómetro

Una vez purificado el ARN, se realizó la síntesis de la primera cadena de ADNc, mediante retrotranscripción inversa, a partir de 250 ng de ARN (figura 20). Finalmente, se llevó a cabo la reacción de la PCR en un termociclador, también conocido como máquina de PCR o reciclador térmico de PCR.

Para llevar a cabo la realización de la técnica de PCR se necesitan las siguientes moléculas:

- Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para polimerizar nuevo ADN.
- Dos cebadores o iniciadores, oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona

de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

- Iones divalentes. Se puede usar Magnesio, agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$) o algún otro catión divalente.
- Iones monovalentes como el potasio.
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (la más común es la polimerasa Tag). En este trabajo se utilizó la enzima ImPromII Reverse Transcriptase (Promega GmbH, Mannheim, Germany).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo (figura 23).



Figura 23. Termociclador utilizado para realizar la PCR

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado **termociclador**, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción y aprovechar las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las enzimáticas de la ADN polimerasa.

Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico (figura 24) Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción.

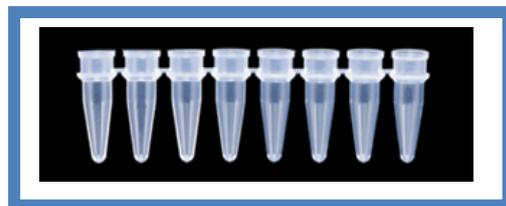


Figura 24. Tubos especiales para realizar la PCR

La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción entre 15-100 μL en pequeños tubos de 0.2-0.5 mL que se colocan en el termociclador. El proceso de la PCR, por lo general, consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura, llamados ciclos, donde cada ciclo posee un mínimo de 3 etapas a diferentes temperaturas, que, a continuación, se detallan y se muestra en la figura 25:

Fase 1^a- Desnaturalización: En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (permite la separación de las dos hebras de las cuales está constituido) a una temperatura de 94-95°C.

Fase 2^a- Alineamiento o unión del cebador: A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento de los cebadores al ADN molde.

Fase 3^a- Extensión o elongación de la cadena: Finalmente, actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5' -fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de el ADN polimerasa que utilizemos.

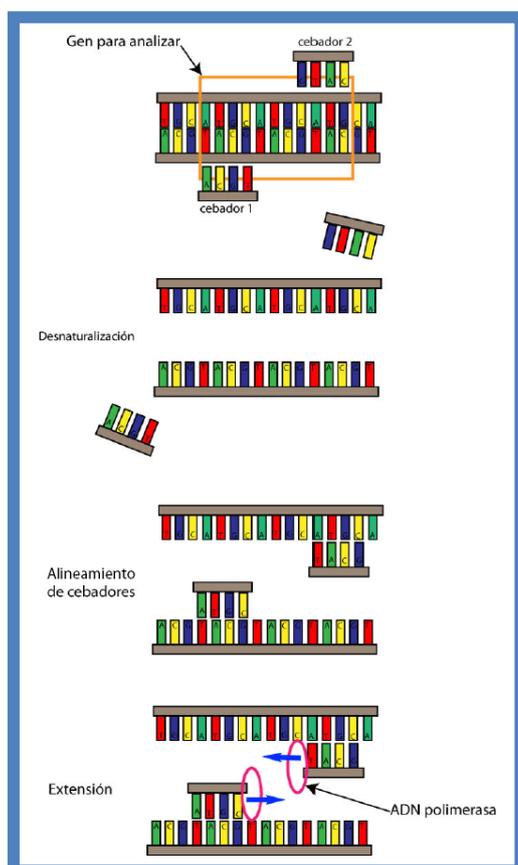


Figura 25. Reacción de la cadena de la Polimerasa o del inglés *Polimerase Chain Reaction*

Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros utilizamos como la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y la temperatura de unión de los cebadores

Podemos clasificar las técnicas de PCR cuantitativa según si se emplean fluorocromos no específicos o bien si se utilizan sondas moleculares dependientes de la secuencia. En este trabajo se utilizó la técnica basada en fluorocromos. El ADN, que ve multiplicada su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo inespecífico (en este proyecto se utilizó el SYBR Green) que detecta el ADN de doble cadena produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador. Esta técnica posee la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización y es mucho más económica que la que usa sondas específicas. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizarse en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando. Se cuantifica la cantidad de fluorescencia en cada ciclo y se representa una gráfica: fluorescencia *versus* ciclo PCR para cada gen analizado, como muestra la figura 26.

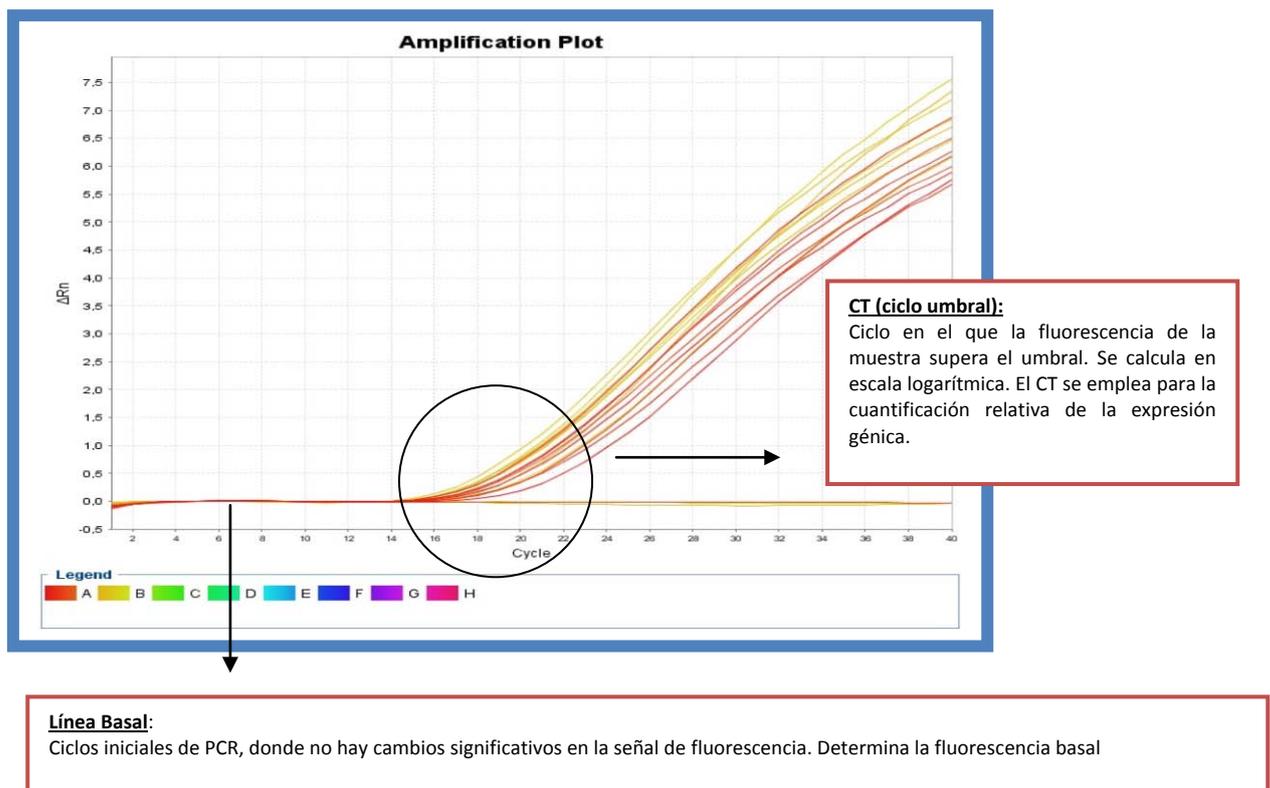


Figura 26. Gráfica que mide la fluorescencia *versus* ciclo PCR para el gen de la galectina 1

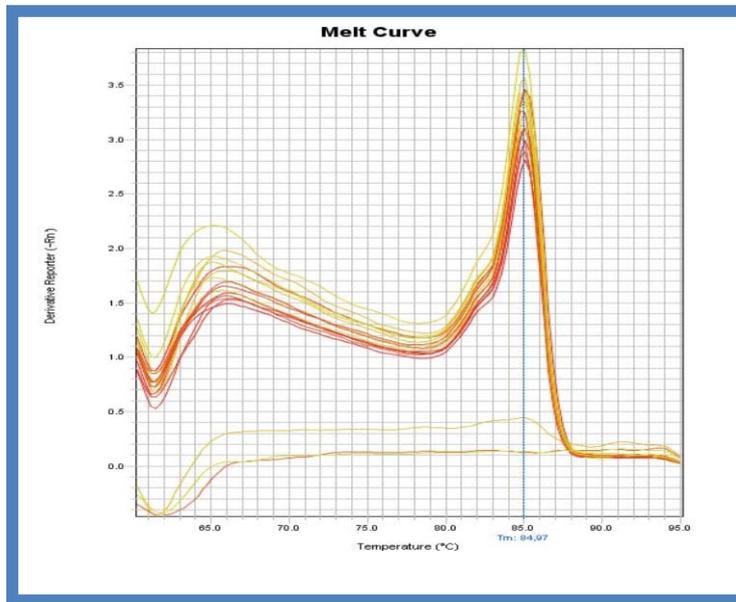


Figura 27. Temperatura de fusión o del inglés *melting curve* de la galectina-1

Al emplear un fluorocromo de unión inespecífica a la doble hebra de ADN, el SYBR Green, identifica fragmentos amplificados de ADN concretos a partir de la temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés *Melting temperature*), que es específica para el fragmento amplificado que se está buscando (figura 27).

Para el análisis posterior, se realiza una curva estándar usando diluciones seriadas de una muestra de ADNc. Se determina el CT de las muestras estándar y de las muestras desconocidas. Se realiza una curva estándar a partir de los datos de CT y de la concentración de las muestras estándar. Se calcula la concentración de las muestras desconocidas extrapolando el valor de CT de dichas muestras en la curva estándar.

En nuestro trabajo se realizó la PCR semicuantitativa a tiempo real en un termociclador Lightcycler (Roche) utilizando oligonucleótidos (oligos) específicos para las diferentes citoquinas que generan productos de unas 200 pares de bases de longitud.

En este estudio se analizaron los niveles de expresión de la gal-1, gal-3 y gal-9 en paralelo a las citoquinas Th2 (IL-5 e IL-13) y a las citoquinas Th17 (IL-17 e IL-23). El resultado de cada citoquina se normalizó a los niveles de expresión de beta-actina. Las secuencias de los oligos utilizados para cuantificar la expresión de los genes se muestran en la tabla 6.

| Oligo | Secuencia 5'-3' Forward | Secuencia 3'-5' Reverse |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| B-Actin | ATCATGTTTGAGACCTCAA | AGATGGGCACAGTGTGGGT |
| IL-5 | TGAAAGAGACCTTGGCACTGC | CAGTTTGACTCTCCAGTGTGCC |
| IL-13 | AGCCCTCAGGGAGCTCAT | CTCCATACCATGCTGCCATT |
| Gal-1 | AGCGGGAGGCTGTCTTTC | CCTGGTCGAAGGTGATGC |
| Gal-3 | GAGCCTACCCTGCCACTG | AGGCAAAGGCAGTTATAAGG |
| Gal-9 | CACACATGCCTTCCAGAAG | AAGAGATCCCGTTCAACAT |

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR

G.2 Análisis por citometría de flujo en el esputo

La citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico, es decir que pueden combinar las medidas de distintos parámetros medidos sobre una misma célula y relacionarlos. Es una técnica sencilla, que se aplica en la rutina diaria de los laboratorios de investigación, capaz de proporcionar resultados de forma rápida que pueden ser aplicables al diagnóstico. Gracias a su gran especificidad es capaz de distinguir entre varias poblaciones diferentes y detectar una población celular en una muestra donde predominen otras poblaciones celulares mayoritarias. La citometría de flujo representa un método rápido y cuantitativo de análisis de células u otras partículas en suspensión. Su mecanismo de acción es hacer pasar a las células, alineadas y de una en una, por delante de un haz luminoso

Las partículas al pasar por el rayo luminoso generan señales, las cuales se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan en el ordenador. La información generada procede por un lado de la dispersión de la luz y por otro de la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o en una parte de la célula al ser excitada por el rayo luminoso (figura 28).

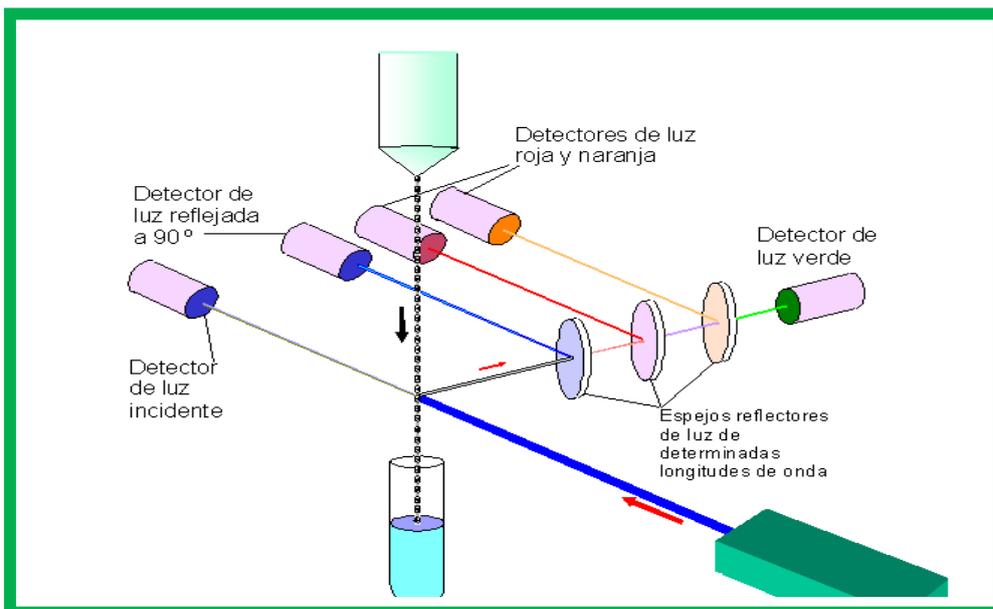


Figura 28. Mecanismo de acción de la citometría de flujo. Las partículas al pasar por el rayo luminoso generan señales, las cuales se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan en el ordenador. La información generada procede por un lado de la dispersión de la luz y por otro de la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o en una parte de la célula al ser excitada por el rayo luminoso

Al atravesar el rayo de luz, las células interactúan con este causando dispersión de la luz, basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan (parámetro denominado *Forward Scatter*) y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de estas (parámetro denominado *Side Scatter*) como se representa en la figura 29.

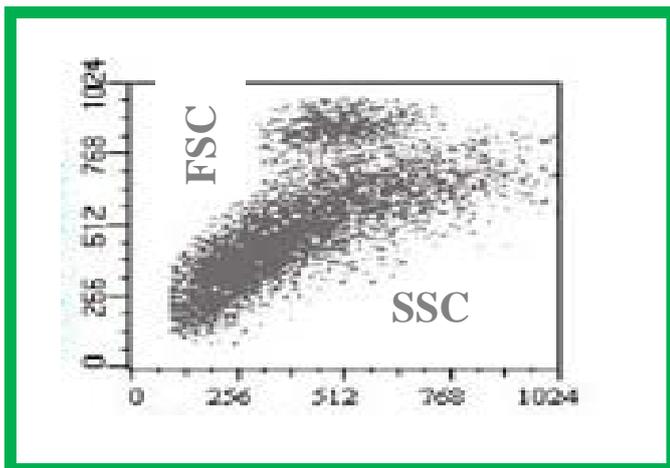


Figura 29. Diagrama de puntos o *Dot-Plot* que mide la complejidad de las células (SSC) en el eje de las abscisas o X y el tamaño de las células (FSC) en el eje de las ordenadas o Y.

Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos o fluoróforos, se pueden evaluar qué células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales utilizados. Los fluorocromos se unen químicamente a los anticuerpos con una elevada eficiencia, sin interferir en la especificidad inmunológica del anticuerpo y sin perder la intensidad de su fluorescencia. Las moléculas fluorescentes tienen la particularidad de que emiten luz de una determinada longitud de onda al ser excitadas con luz de otra determinada longitud de onda permitiendo así su cuantificación. El uso de diferentes fluorocromos permite analizar la expresión de varias moléculas de manera simultánea. Las combinaciones de diversos anticuerpos monoclonales contra antígenos celulares pueden utilizarse para identificar poblaciones celulares específicas (299).

Los objetivos principales de la citometría de flujo al utilizar marcajes simultáneos de diferentes antígenos celulares son los siguientes:

- Identificar y enumerar subpoblaciones celulares únicas y definidas.
- Seleccionar y separar físicamente subpoblaciones de células deseadas (por deflexión electrostática; esta tecnología de separación se llama *electronic cell sorting*).
- Medir capacidad funcional de subpoblaciones celulares definidas.

La citometría de flujo se realiza en 3 etapas independientes:

- **Fase pre-citometría:** Preparación de los reactivos, preparación de las células, diseño del protocolo y marcaje de las células con los reactivos fluorescentes.
- **Fase de citometría de flujo:** Procesamiento de las células marcadas y la recolección de los datos para cada una de las medidas (parámetros) realizados en cada célula individual a través del citómetro de flujo (figura 30).

Figura 30. Citómetro de flujo FACS Canto II Cytometer. Si el análisis incluye la detección de fluorescencia hablamos estrictamente de citofluorímetros de flujo, que son los conocidos como "citómetros" o FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter). Los citómetros de flujo pueden analizar partículas en función de su fluorescencia y tamaño.



- **Fase de análisis:** Análisis de los datos recolectados. La información obtenida se representa en forma de distribuciones de frecuencia o histogramas de una o dos dimensiones. La señal, producida como consecuencia de la excitación del fluorocromo, permite conocer el porcentaje de células reconocidas por el anticuerpo empleado. Como consecuencia, se observan imágenes en dos dimensiones (*Dot-Plot*) o en una dimensión (Histograma) en las que se distinguen las diferentes poblaciones celulares marcadas (figura 31).

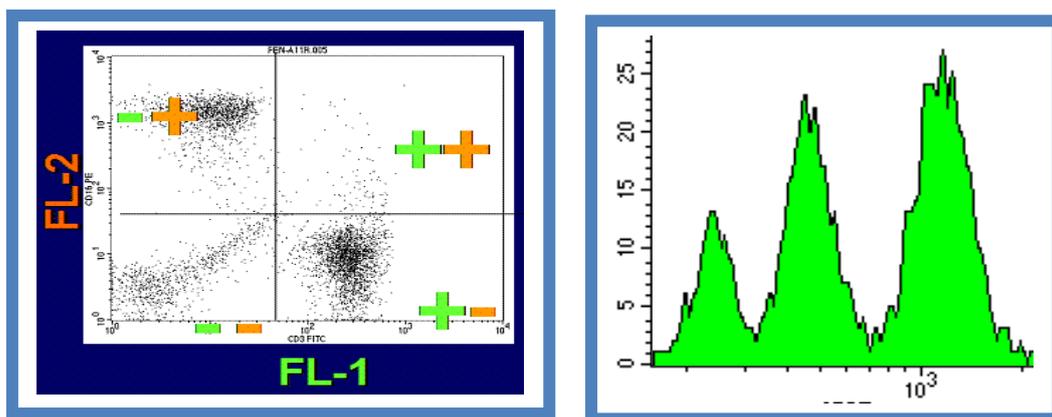


Figura 31. Diagrama de puntos o *Dot-Plot* (figura de la izquierda). Representación simultánea de dos parámetros **X** e **Y** para un conjunto de células. **X** representa el valor de la señal de un parámetro e **Y** representa el valor de la señal de otro parámetro. **Histograma** (figura de la derecha)

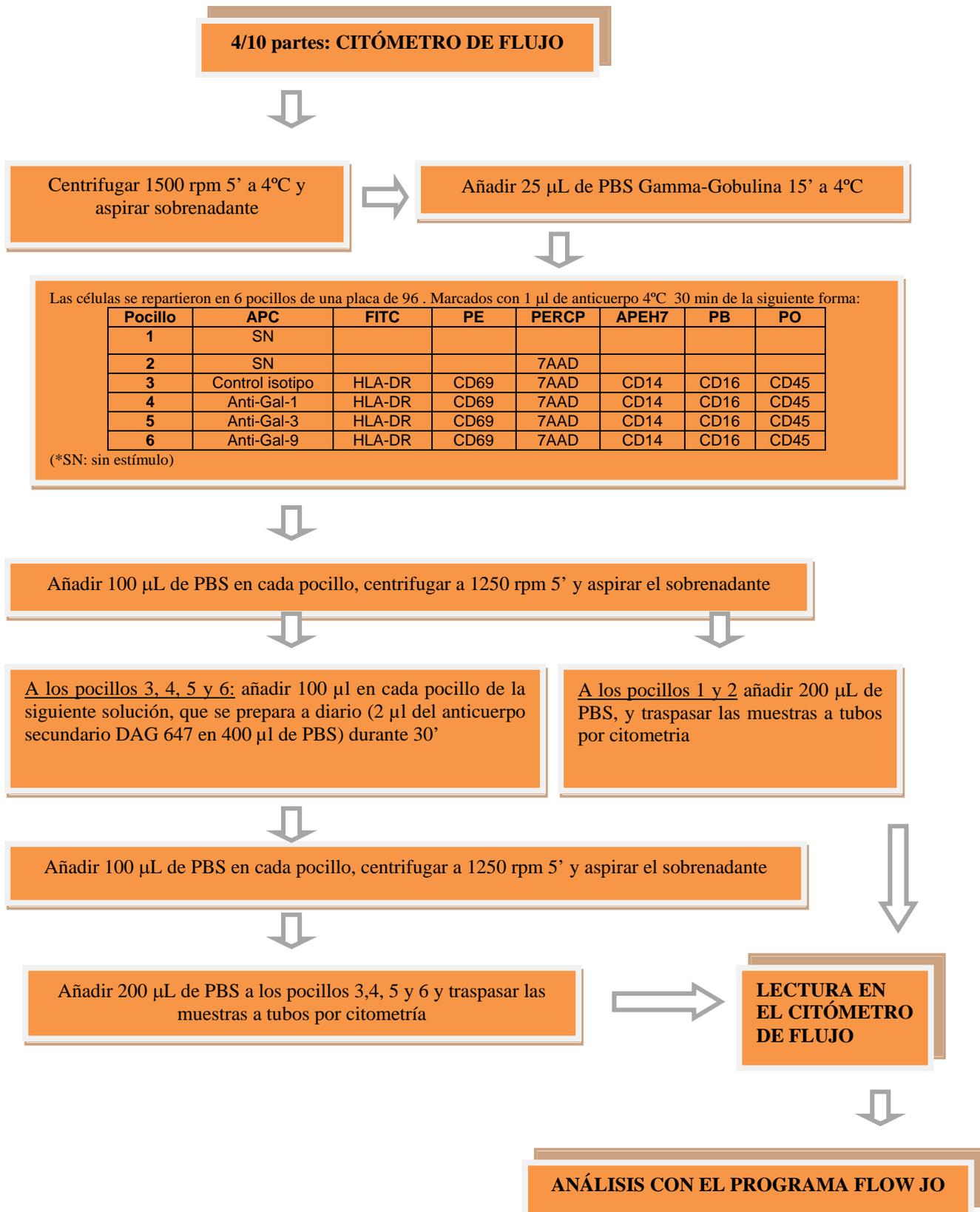
En este estudio, el *pellet* de las células de esputo se resuspendió, una vez centrifugadas, para estudiar las subpoblaciones linfocitarias y marcadores de activación mediante citometría de flujo.

Las células se resuspendieron en PBS-gammaglobulina (100 µg/mL) durante 15 min en hielo. Posteriormente, las células se incubaron durante 30 min en hielo con los siguientes anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos, todos ellos de BD Biosciences (San José California, USA): anti-CD14 conjugado a Isocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD69 conjugado a Ficoeritrina (PE), anti-CD3 conjugado a Aloficocianina (APC), anti-CD45 conjugado a FITC, anti-CD-16 conjugado a Pacific blue (PB), anti-CD-45 conjugado a Pacific orange (PO), anti-HLA-DR conjugado a FITC, anti-CD14 conjugado a APC-H7 y 7 amino-actinomicina D (7-AAD) conjugado a APC. Los anticuerpos que se utilizaron frente a gal humanas fueron policlonales contra gal-1, gal-3 y gal-9 de R&D Systems (MN, USA).

Todos los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron de Molecular Probes (Leiden, The Netherlands) y fueron los siguientes: Alexa fluor 647 conjugado con DAG (en inglés *Donkey Anti-Goat*), Alexa fluor 568 conjugado con GAM (en inglés *Goat Anti-Mouse*) y Alexa fluor 488 conjugado con DAG.

Finalmente las células se lavaron con PBS y se analizaron con un citómetro de flujo FACS Canto II Cytometer (Becton Dickinson). El análisis se realizó usando el programa informático Flow Jo. En el siguiente esquema se muestra el protocolo utilizado en este trabajo para el procesamiento de las muestras de esputo por citometría de flujo.

ESQUEMA DE PROTOCOLO UTILIZADO PARA CITOMETRÍA DE FLUJO



G.3 Inmunofluorescencia indirecta en el citospin del esputo

La Inmunofluorescencia es una técnica de biología molecular que utiliza esencialmente anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula. En el caso de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se utilizan dos anticuerpos: el anticuerpo primario que reconoce y se une a la molécula diana y el anticuerpo secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo y reconoce al primario y se une a él (figura 32).

Los fluorocromos se unen, químicamente, a los anticuerpos con una elevada eficiencia, sin interferir en la especificidad inmunológica del anticuerpo y sin perder la intensidad de su fluorescencia. Las moléculas fluorescentes tienen la particularidad de que emiten luz de una determinada longitud de onda, al ser excitadas con luz de otra determinada longitud de onda, permitiendo así su cuantificación.

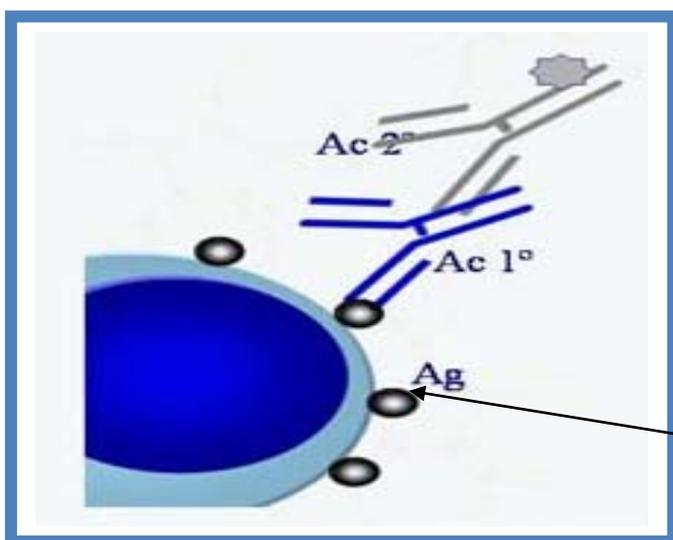


Figura 32. Técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se preparan anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente contra un anticuerpo que reacciona con un antígeno particular. Cuando se ve con el microscopio de fluorescencia, la región fluorescente representa la localización del anticuerpo.

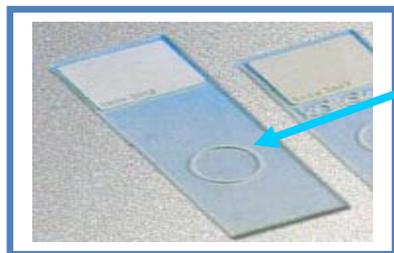
Anticuerpo fluorescente

Las muestras de citospin se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón y se bloquearon con TNB-gammaglobulina antes de la incubación con anticuerpos primarios (anti-gal1, anti-gal-3 y anti-gal-9). Posteriormente, se añadió un anticuerpo secundario DAG marcado con Alexa Flúor 488. Las preparaciones se bloquearon con suero de cabra y se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-CD45. Finalmente, se añadió un anticuerpo secundario GAM marcado con Alexa Flúor 568 junto con anticuerpo de ratón anti MHC-II marcado directamente con Alexa Flúor 647.

Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia Leica DMIRE2 con campo amplio acoplado a una cámara monocromador (Polycrome IV from Till Photonics) y CCD (CoolSnap HQ, Photometrics). En el siguiente esquema se muestra el protocolo utilizado para el procesamiento de las muestras de esputo por IFI.

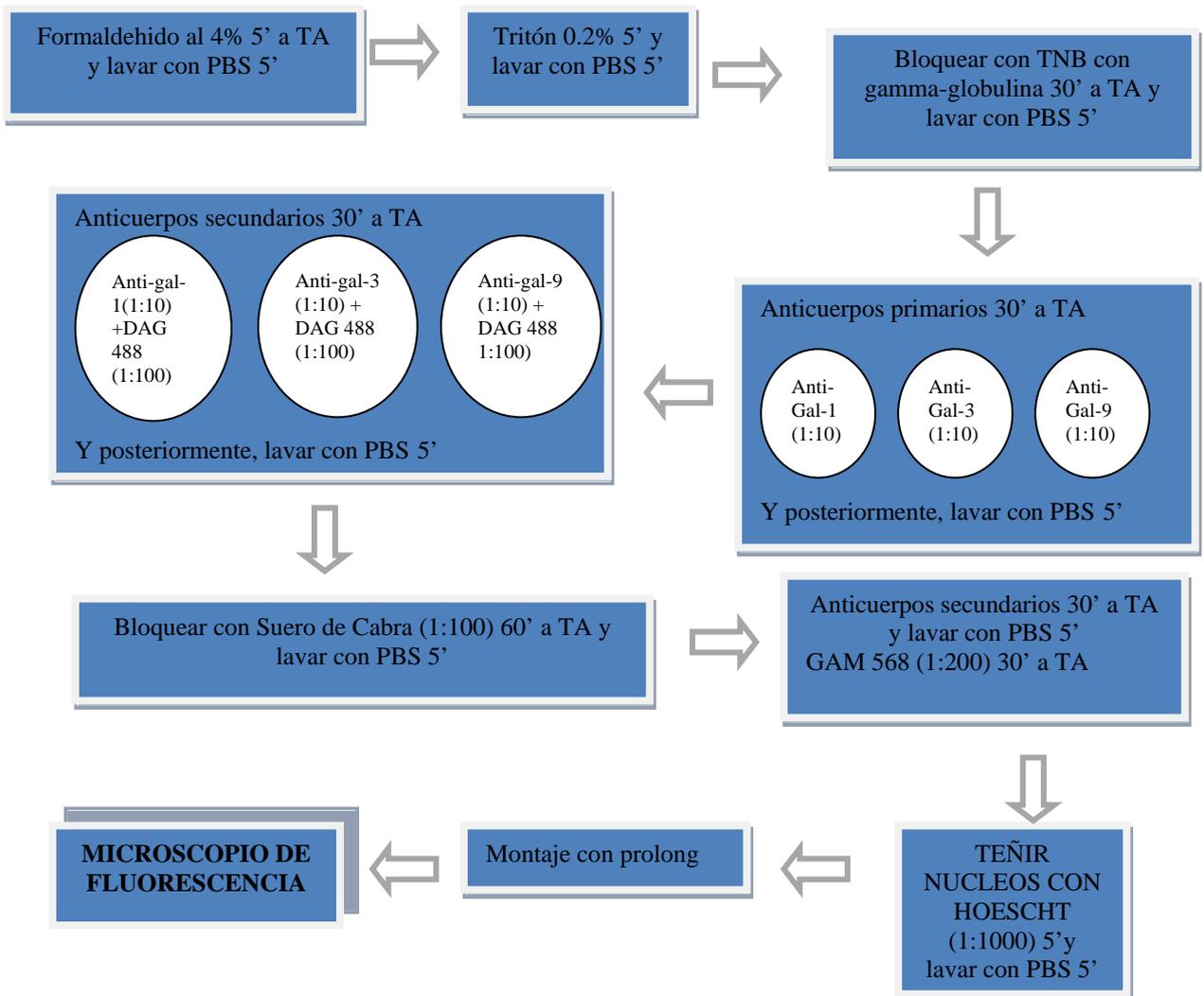
ESQUEMA DE PROTOCOLO UTILIZADO PARA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

LOS CRISTALES DE CITOSPIN SE GUARDAN EN EL CONGELADOR A -80°C HASTA SU PROCESAMIENTO



Citospin de las células de esputo

- TODOS LOS ANTICUERPOS SE DILUYEN EN TNB.
-TODAS LAS INCUBACIONES SE REALIZAN EN UNA CÁMARA HÚMEDA PROTEGIDA DE LA LUZ



H. Efecto de las galectinas sobre la producción de citoquinas por células mononucleares derivadas de sangre periférica

Las células mononucleares derivadas de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) se aislaron de 15 mL de sangre venosa heparinizada obtenida de cinco donantes sanos. Las células mononucleares se aislaron mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll (Lonza, Walkersville, USA). La sangre se diluyó 1:3 en suero salino fisiológico y esta mezcla se depositó sobre Ficoll en una proporción mezcla de sangre:Ficoll 3:1 en tubos estériles de 50 mL. Los tubos se centrifugaron durante 30 min a 1800 rpm a 25°C y se recogieron los anillos de las células que se crearon con la separación por gradiente (figura 33). Estas células que son las PBMC se lavaron tres veces con suero salino para eliminar los restos de otras células (plaquetas, hematíes,...) y de Ficoll que hayan podido quedar al recoger los anillos de las células mononucleares. Posteriormente, las células se contaron en un contador de células manual y 2×10^5 células mononucleares se resuspendieron en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino

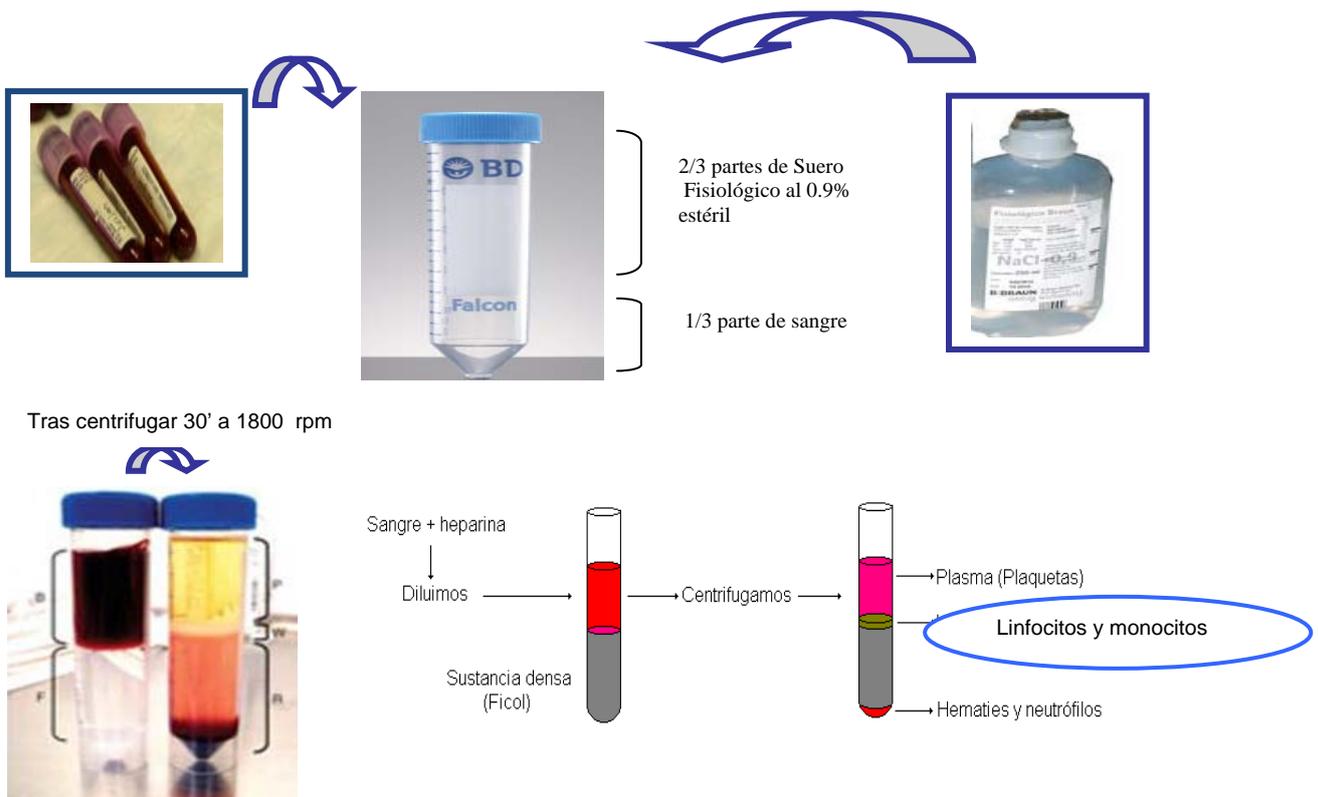


Figura 33. Protocolo de separación por gradiente de densidad con Ficoll

Las células mononucleares se sembraron en una placa de 24 pocillos (5 x10⁵ cel/pocillo) y se estimularon con 100 ng/mL de LPS, 10 µg/mL de gal-1 humana recombinante (Preprotech, London UK), 10 µg/ml de gal-3 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) o 10 µg/ml de gal-9 (R&D Systems Minneapolis, MN USA). Después de 24 horas, tanto las células como el sobrenadante se recolectaron para estudiar la expresión de las citoquinas IL-10, IL-12A, IL-12B, IL-1β, y TNF-α. Las células se utilizaron para analizar la expresión mediante RT-PCR. Al igual que con las muestras de esputo, hasta que no se reclutaron todas las muestras de sangre no se realizó el análisis por PCR. Las muestras se guardaron a -80°C con TRIzol^R hasta realizar el análisis.

Se utilizó el mismo protocolo de la PCR semicuantitativa a tiempo real para extraer el ARN de las células mononucleares, que se describe en la página 72 de este trabajo. El resultado de cada citoquina se normalizó a los niveles de expresión de GADPH. Las secuencias de los oligos utilizados para cuantificar la expresión de los genes se muestra en la tabla 7.

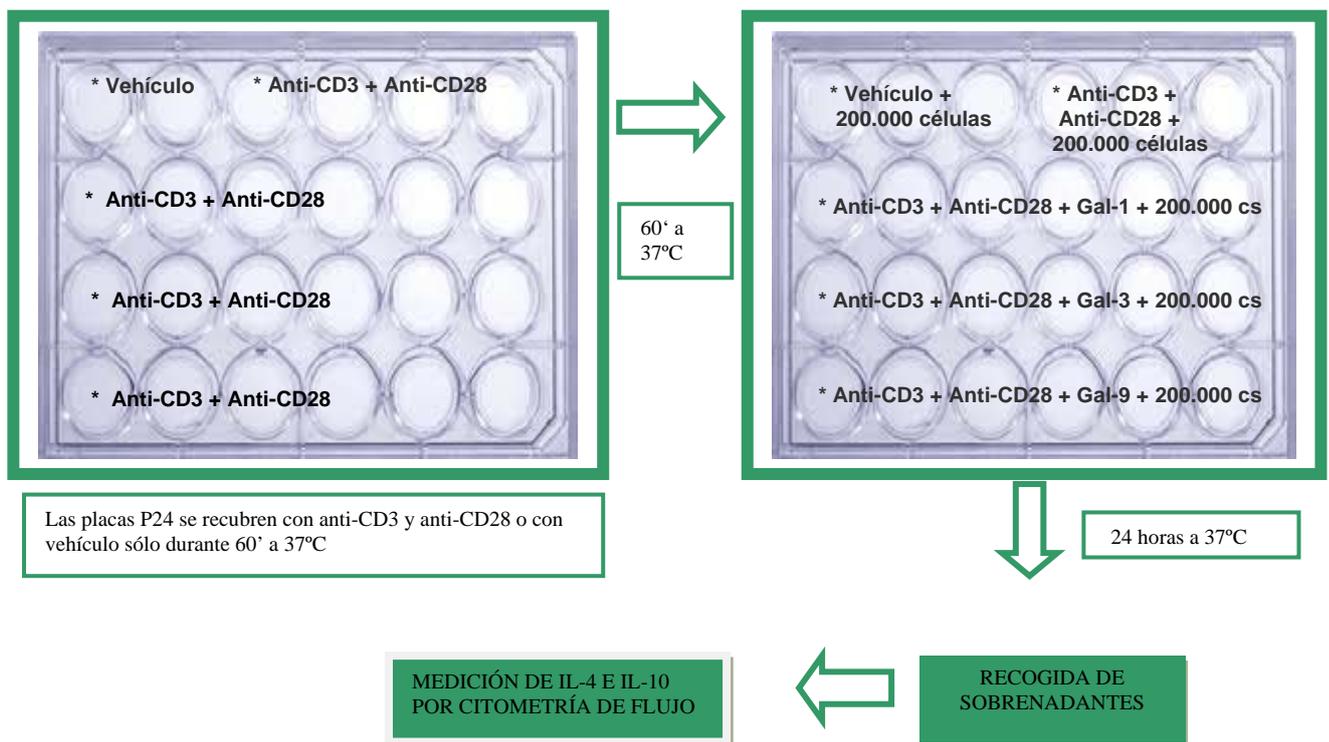
| Oligos | Secuencia 5'-3' Forward | Secuencia 3'-5' Reverse |
|--------|-------------------------|-------------------------|
| GADPH | AGCCACATCGCTCAGACAC | GCCCAATACGACCAAATCC 3' |
| IL1-β | CTGTCCTGCGTGTGAAAGA | TTGGGTAATTTTTGGGATCTACA |
| IL-10 | TGGGGGAGAACCTGAAGAC | CCTTGCTCTTGTTCACAGG |
| IL-12B | CCCTGACATTCTGCGTTCA | AGGTCTTGTCCGTGAAGACTCTA |
| IL-12A | CACTCCAAAACCTGCTGAG | TCTCTTCAGAAGTGCAAGGGTA |
| TNF-α | CAGCCTTCTCCTCCTGAT | GCCAGAGGGCTGATTAGAGA |

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR

Por otro lado, los sobrenadantes se utilizaron para medir la expresión a nivel de proteína usando un sistema basado en inmunoensayo con microesferas, que es analizado por citometría de flujo (BD Biosciences, San José, CA). Los datos se adquirieron utilizando el citómetro FACSCanto II y se analizaron con el programa Flow Cytomix Pro 2.2 como se muestra en el siguiente esquema.



Además, el efecto de las gal sobre la producción de IL-10 y de IL-4, inducida a través del receptor de antígeno, se analizó en los linfocitos de sangre periférica (PBL, del inglés *Peripheral Blood Lymphocytes*) de cuatro donantes sanos. Los PBLs (2×10^5 cel/pocillo) se incubaron en placas pre-cubiertas con anti-CD3 ($0.5 \mu\text{g/mL}$) y anti-CD28 ($1 \mu\text{g/mL}$). Las gal-1, 3 y 9 se añadieron de forma soluble a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$. Después de 24 h de incubación, los sobrenadantes se colectaron y se cuantificaron por el sistema de inmunoensayo con microesferas, como se muestra en el siguiente esquema. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Los datos se adquirieron utilizando el citómetro FACSCanto II y se analizaron finalmente con software Flow Cytomix Pro 2.2.



I. Análisis Estadístico

Las diferencias entre los grupos se analizaron por los siguientes test estadísticos: El Test Kruskal-Wallis se utilizó para analizar los datos no paramétricos; el Test U- Mann Whitney para los datos no apareados y el test Wilcoxon para datos apareados. Para determinar la diferencia entre los grupos se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas ya que nuestros resultados no cumplían los requisitos para la aplicación de pruebas paramétricas. Se utilizó el Test U de Mann Whitney para comparar la diferencia entre dos grupos independientes. La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn se emplearon para la comparación entre más de dos grupos independientes. La diferencia entre dos grupos de datos relacionados o dependientes se obtuvo mediante la prueba de Wilcoxon. Finalmente, se realizaron estudios de correlación utilizando la prueba de Spearman. En todos los casos se obtuvo el valor de p para dos extremos. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas cuando la p fue ≤ 0.05 . Los datos se analizaron con Graph Prism (GraphSoftware Inc, San Diego, USA).

IV. RESULTADOS



A. Características clínicas de los pacientes y sujetos sanos

El estudio se realizó en un grupo de 24 pacientes asmáticos de los cuales 19 eran mujeres y 5 fueron hombres. De los 18 donantes sanos como controles había 9 varones y 9 sanos (Figura 34).

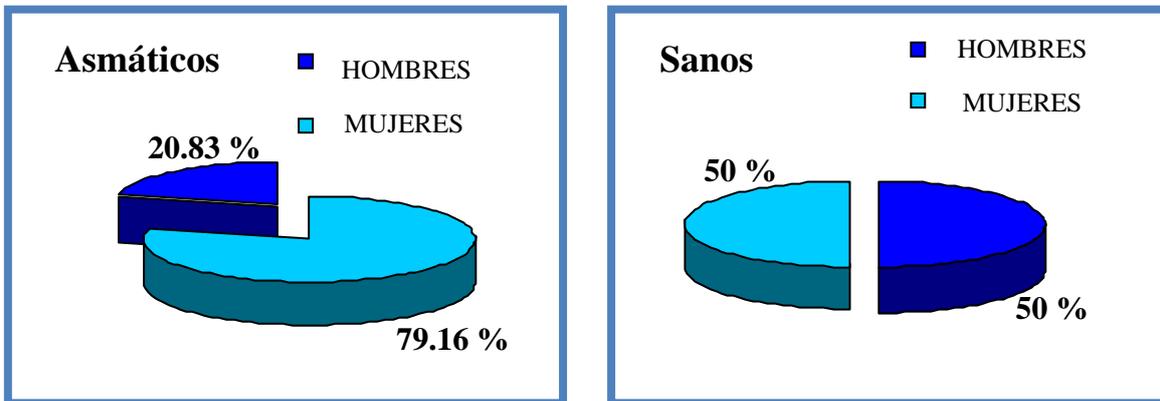


Figura 34. Distribución de los pacientes asmáticos y donantes sanos en porcentajes según el sexo

La edad media de los enfermos fue de 50 años con un rango entre 24 y 75 años, una puntuación media del cuestionario de control ACT de 22 y un FeNO medio de 34 partes por billón (ppb) con un rango comprendido entre 11 y 82 ppb. Sin embargo, en los donantes sanos la edad media fue de 33 años con un rango que oscilaba entre 26 y 53 años, con un FeNO medio de 20 ppb y un rango entre 14 y 34 ppb. (Figura 35).

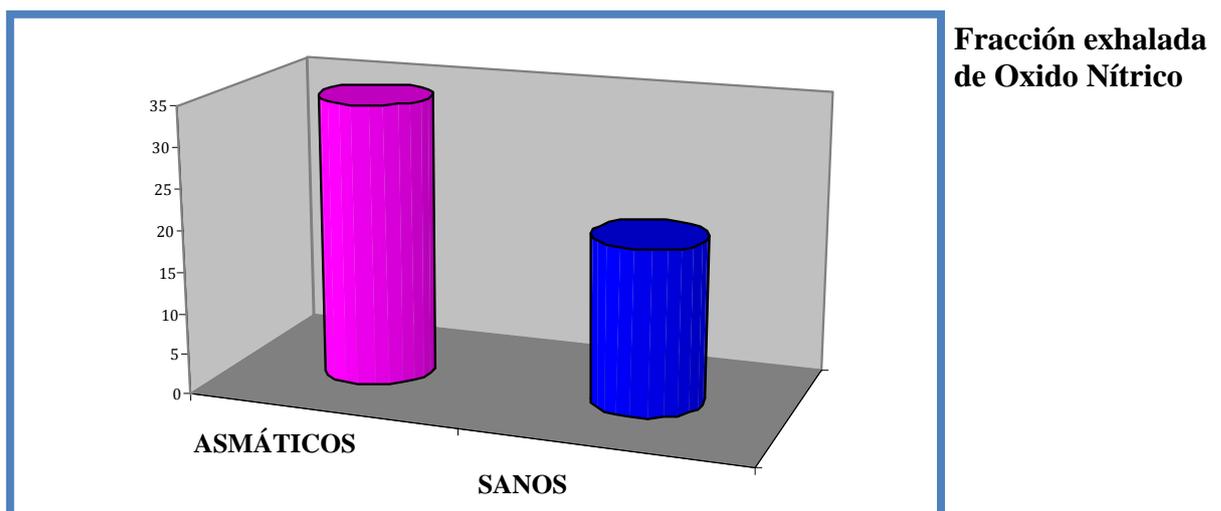


Figura 35. Media de la fracción exhalada de Oxido Nítrico (FeNO) de los pacientes asmáticos y donantes sanos

En lo que respecta al hábito tabáquico, sólo existían 2 pacientes que eran fumadores activos (8.3%) con un IPA de 10. De los sujetos sanos había 8 pacientes fumadores (44%) con un IPA de 7 (figura 36).

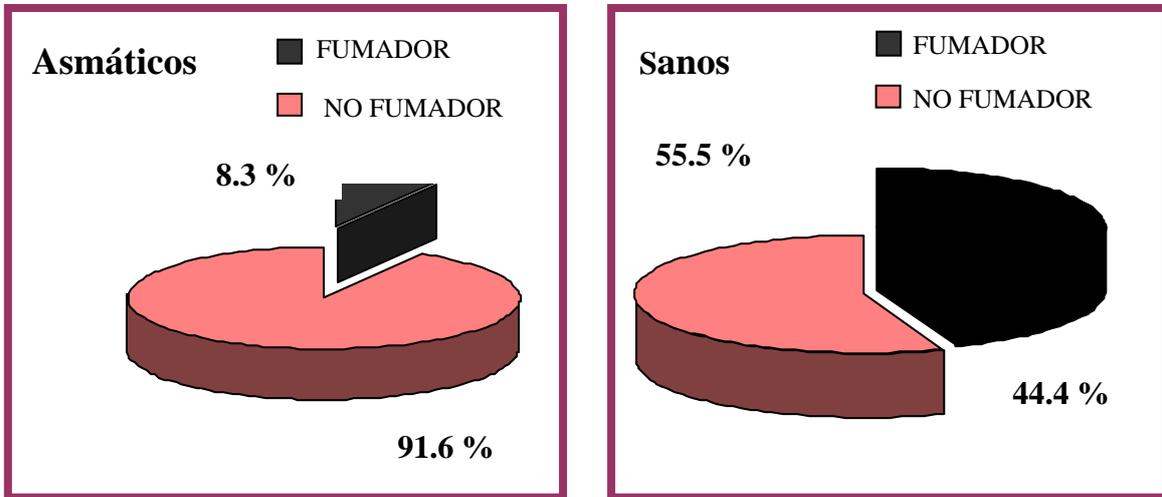


Figura 36. Prevalencia en porcentajes del hábito tabáquico de los pacientes y donantes sanos

La mitad de los pacientes asmáticos presentaban atopía (12 pacientes) diagnosticada por la IgE específica en sangre y/o "prick test" positivo a los aeroalergenos más frecuentes (pólenes, epitelio de animales, hongos y ácaros). Ninguno de los donantes sanos presentaba síntomas alérgicos (Figura 37).

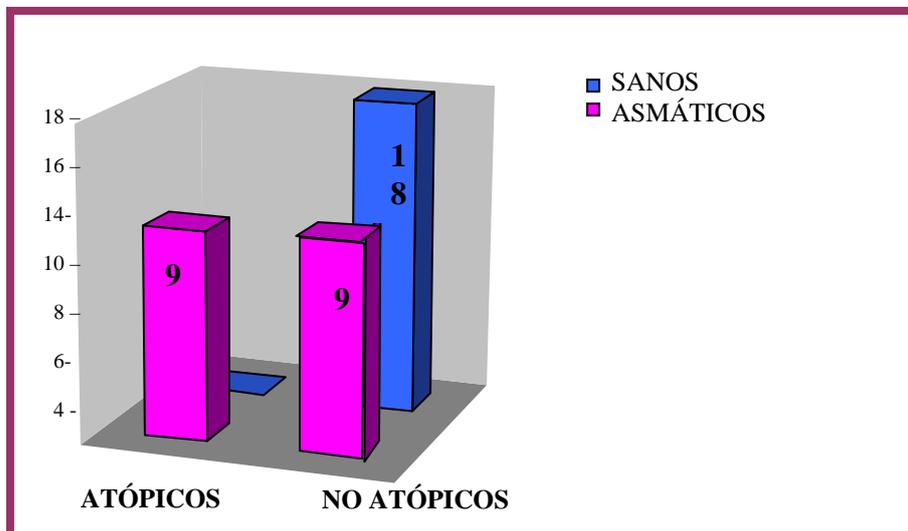


Figura 37. Número de pacientes asmáticos y donantes sanos con atopía

En relación a las enfermedades relacionadas con el asma: 18 pacientes asmáticos presentaban rinitis y 8 poliposis nasal. Sin embargo, ninguno de los sujetos sanos presentaba estas patologías (figura 38).

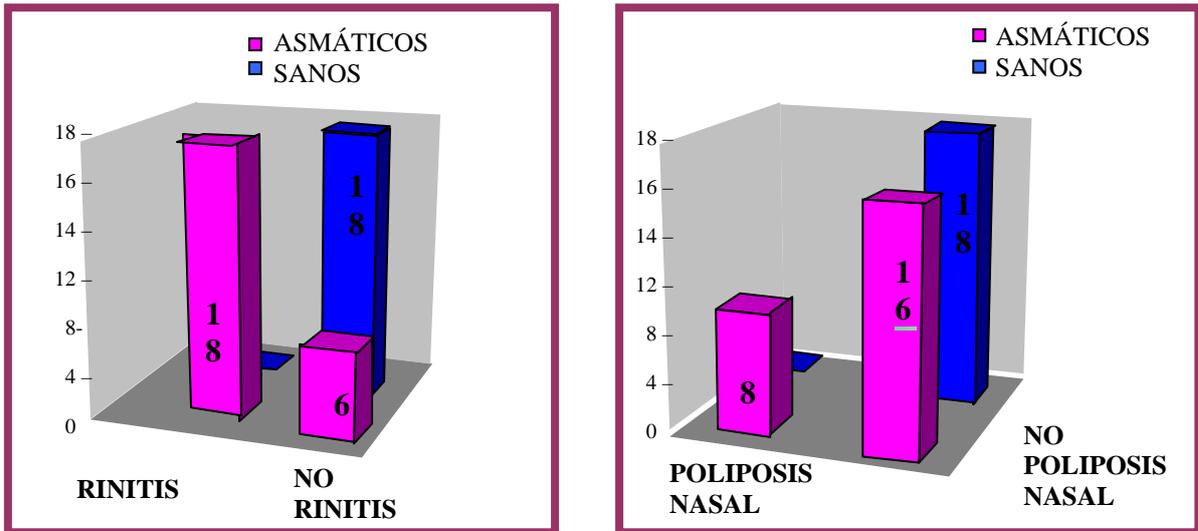


Figura 38. Número de pacientes y sujetos sanos que presentan rinitis y poliposis nasal

La gravedad del asma de los pacientes de acuerdo a la GINA (294) fue la siguiente: asma intermitente leve (n=0), asma persistente leve (n=1), asma persistente moderado (n=15) y asma persistente grave (n=8) como se muestra en la siguiente figura 39.

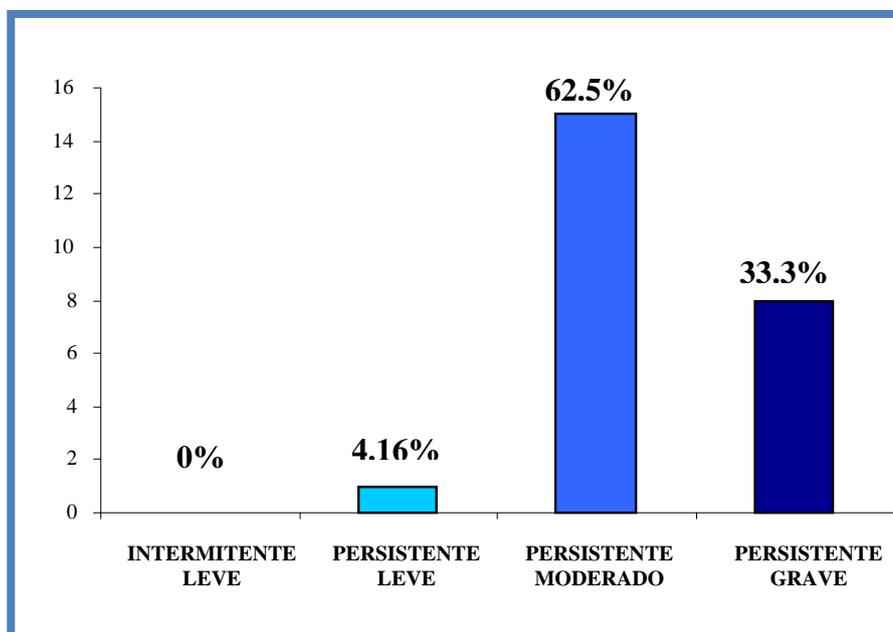


Figura 39. Distribución de los pacientes en porcentaje según la gravedad del asma

Los resultados obtenidos en la espirometría basal realizada a nuestros pacientes, mostraron a una población con volúmenes pulmonares dinámicos, en reposo, dentro de la normalidad, a pesar de que más del 90% de los pacientes presentaban un asma persistente

moderado-grave. El FEV1 medio de los pacientes asmáticos fue de 2623 ml, la media del FVC fue de 3320 ml (100.4%), mientras que el cociente FEV1/FVC fue de 76.73. Todos los donantes o controles sanos tenían una espirometría con valores de función pulmonar normal. Los porcentajes medios de los valores de la espirometría de los pacientes asmáticos y sujetos sanos se muestran en la figura 40.

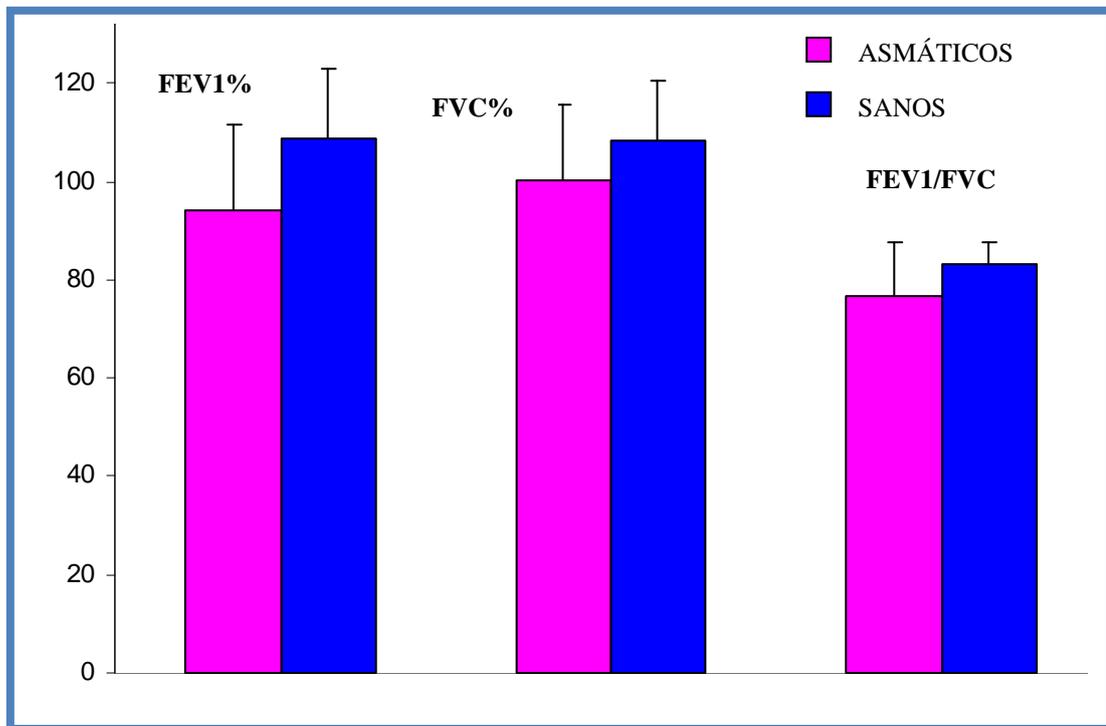


Figura 40. Distribución de los pacientes asmáticos y sujetos sanos según la espirometría basal

A todos los pacientes asmáticos se les permitió continuar con su medicación antiasmática, incluyendo los GCI, clasificando a los pacientes según la dosis que tomarán de los mismos de la siguiente forma: un 33.3% (8 pacientes) tomaban menos de 500 μg de dipropionato de beclometasona o su equivalente al día; 37.55% (9 pacientes) tomaban de 501 a 1000 μg de dipropionato de beclometasona o su equivalente al día y 29.16% (7 pacientes) tomaban más de 1000 μg de dipropionato de beclometasona o su equivalente al día. Ninguno de los pacientes estudiados utilizaba corticoides sistémicos en el momento del estudio ni las 4 semanas previas al estudio. Los donantes sanos no estaban tomando medicación antiasmática en el momento del estudio ni tampoco en las 4 semanas previas a la inclusión del estudio. La gráfica con las proporciones de la medicación con GCI que tomaban los pacientes, se muestra en la figura 41.

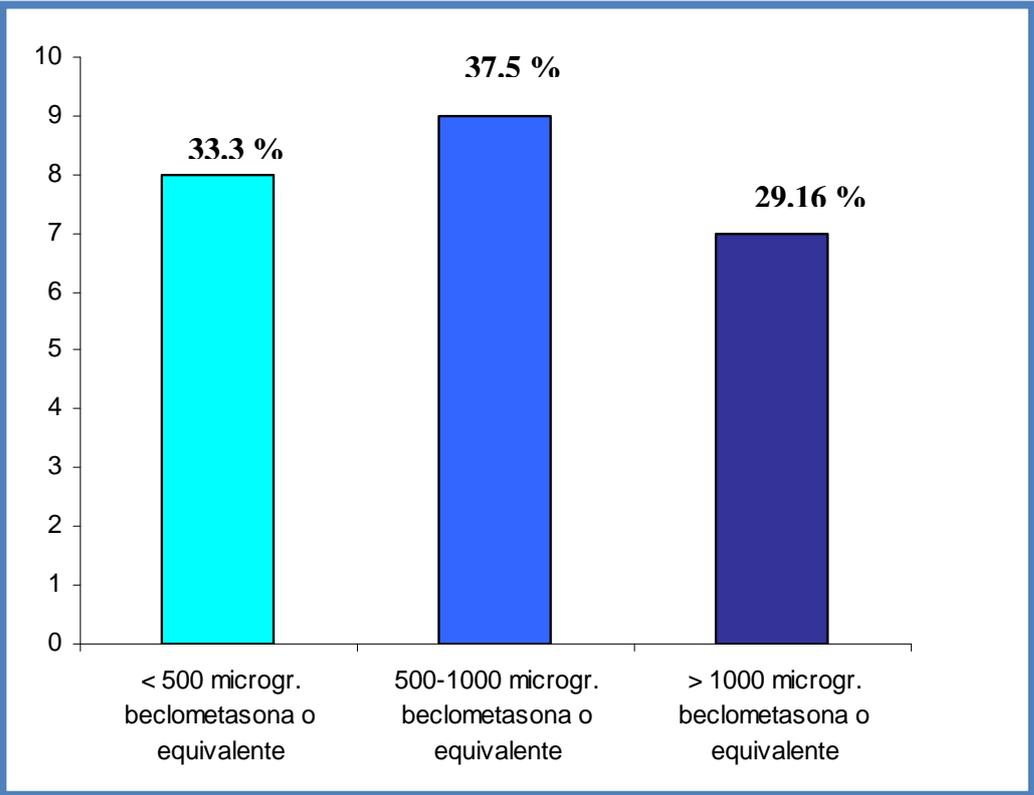


Figura 41. Distribución de los pacientes asmáticos en porcentajes en función de la dosis de glucocorticoides inhalados que tomaban

Las características clínicas de los pacientes y controles se muestran en la tabla 8.

| CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS | | |
|---|--|--|
| | Asmáticos (n=24) | Sanos (n=18) |
| Edad (años) | 50.34 (24-75) | 33.88 (26-53) |
| Sexo (M/F) | 5/19 | 9/9 |
| Atópico/No atópico | 12/12 | 0/18 |
| Función Pulmonar: <ul style="list-style-type: none"> • FVC • FVC% • FEV1 • FEV1% • FEV1/FVC | 2623 (1470-5100)* 94.5 (65-119)* 3220 (1220-5960)* 100.4 (79-132) 76 (57-105)* | 3937 (3350-4550)* 108.5 (65-136)* 4789 (3850-5730)* 108.2 (96-128) 83.2 (72-88)* |
| Tratamiento habitual con GCI con beclometasona o equivalente al día: < 500 µg / 501-1000 µg / > 1001µg | 8 / 9 / 7 | 0 / 0 / 0 |
| FeNO (ppb) | 34 (11-82)* | 20 (14-34)* |
| ACT | 22 (16-25) | |
| Historia de Tabaquismo % (S/N) | 8.3% (2/22) | 44% (8/10) |
| Índice de paquetes-año (IPA) | 10 | 7 |
| Rinitis (S/N) | 18/6 | 0/18 |
| Poliposis nasal (S/N) | 8/16 | 0/18 |
| Tiempo de evolución de la enfermedad | 12.7 (1-55) | |

Tabla 8. Resultados expresados como media (rango). **M:** Masculino; **F:** Femenino; **Dosis GCI:** Dosis de glucocorticoide inhalado en µg/día de beclometasona; **FEV₁:** Volumen espiratorio forzado en un segundo; **FVC:** Capacidad vital forzada; **FeNO (ppb):** Fracción exhalada de Oxido nítrico expresado en partes por billón; **ACT:** Asma Control Test Test (*p < 0.05, Prueba U Mann-Whitney).

B. Citospin de las muestras de Esputo Inducido

A todos los participantes de este estudio se les recogió una muestra de esputo, a través del método de inducción de esputo, previo consentimiento informado firmado por todos los pacientes y controles. La muestra de esputo se procesó según el protocolo que se expone en material y métodos.

Se realizó un citospin a todas las muestras de esputo para el RCD sobre un total de 400 células, tras realizar la tinción de Diff Quick, como se muestra en la Figura.42.

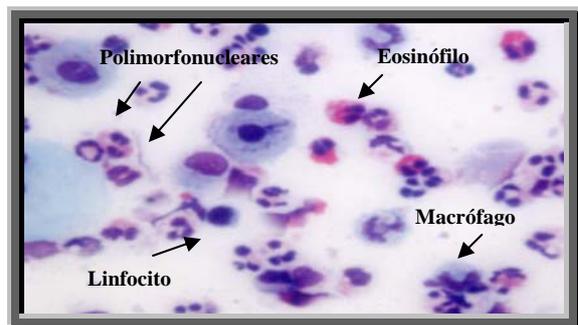


Figura 42. Citospin de un sujeto asmático donde se muestran con flechas las células más representativas de las muestras: Macrófagos, polimorfonucleares y eosinófilos.

La calidad de las muestras de esputo se determinó de la siguiente forma:

- ✓ porcentaje menor del 20% de los monocitos y
- ✓ viabilidad por encima del 50% (en la página 65 se muestra la fórmula de la viabilidad)

Las muestras que no presentaron estos criterios de calidad no fueron procesadas. En la siguiente tabla se muestran el RCD de las muestras (citospin) de esputo tanto de los asmáticos como de los sujetos sanos.

| RECUESTO CELULAR DIFERENCIAL (%) | | |
|---|-------------------|--------------------|
| | Sanos | Asmáticos |
| Recuento celular total (10 ⁵) | 7.20 (1-20) | 7.10 (1-20) |
| Polimorfonucleares (%) | 43.84 (25-65) | 48.60 (40-57) |
| Macrófagos/Monocitos (%) | 53.3 (33.3-69.4)* | 38.66 (32.6-44.4)* |
| Linfocitos (%) | 0.48 (0.2-0.8) | 0.72 (0.4-1.3) |
| Eosinófilos (%) | 0.97 (0-2) | 1.43 (0.13-2.73) |
| Células epiteliales bronquiales (%) | 1.57 (0.5-3.2)* | 9.57 (5.5-12.5)* |

Tabla 9. Resultados expresados como media (rango) (*p < 0.05, Prueba U Mann-Whitney)

C. Análisis de las Células de Esputo por Citometría de Flujo

El análisis de las células de esputo por citometría de flujo demostró una predominancia de los leucocitos marcados con CD45 (60-90%), la mayoría de los cuales fueron CD16+. La proporción de linfocitos, marcados con CD3+ fue menor del 5%. El 7-AAD se utilizó como marcador para excluir a las células muertas. En la figura 43 se muestra un histograma representativo con los marcajes para citometría de flujo.

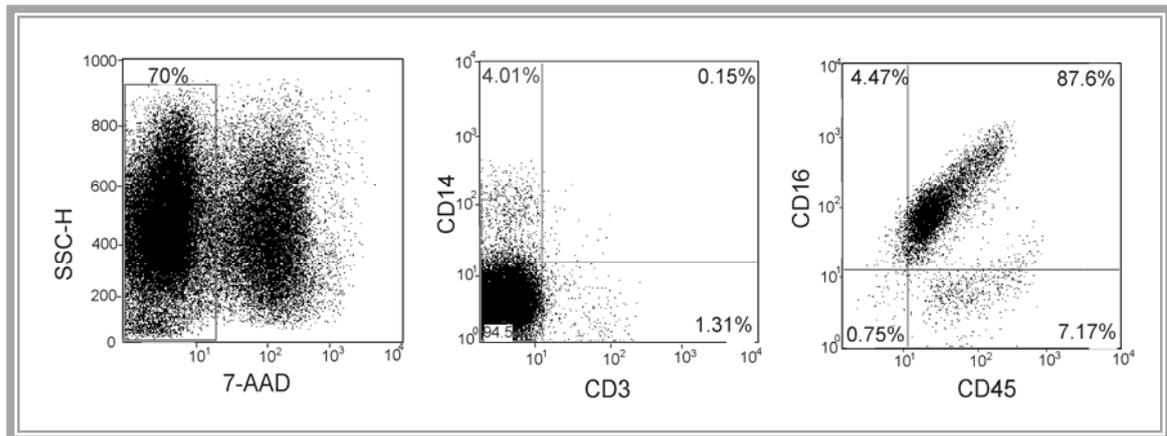


Figura 43. Inmunofenotipo de las células de esputo inducido. Las células resuspendidas del esputo se tiñeron con anti-CD45, anti-CD16, anti-CD3 y anti-CD14. El 7-AAD se utilizó para excluir a las células muertas. La figura muestra histogramas representativos de un paciente asmático. Los números en los diagramas representan el porcentaje de células por cada cuadrante.

D. Expresión de las galectinas y citoquinas Th2 en las células de esputo por RT-PCR

Los niveles de ARN de la gal-1, gal-3 y gal-9 se determinaron en las células del esputo de pacientes asmáticos y controles sanos, en paralelo a la IL-5 e IL-13, citoquinas asociadas a la respuesta Th2 observada en el asma.

Los niveles de expresión de la gal-1 y gal-3 en las muestras de esputo de pacientes asmáticos fueron mas bajas (media \pm SEM fueron de 2.6 ± 0.4 , y 4.4 ± 1.4 , respectivamente) que en las muestras de los sujetos sanos (4.7 ± 1.2 , y 20.0 ± 8.7). En oposición, no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión del ARN de la gal-9 entre ambos grupos (3.2 ± 1.3 vs 3.3 ± 1.1). Como era de esperar, las muestras de esputo de pacientes asmáticos contenían niveles altos de ARN de las citoquinas Th2, es decir, la IL-5 y la IL-13 (figura 44).

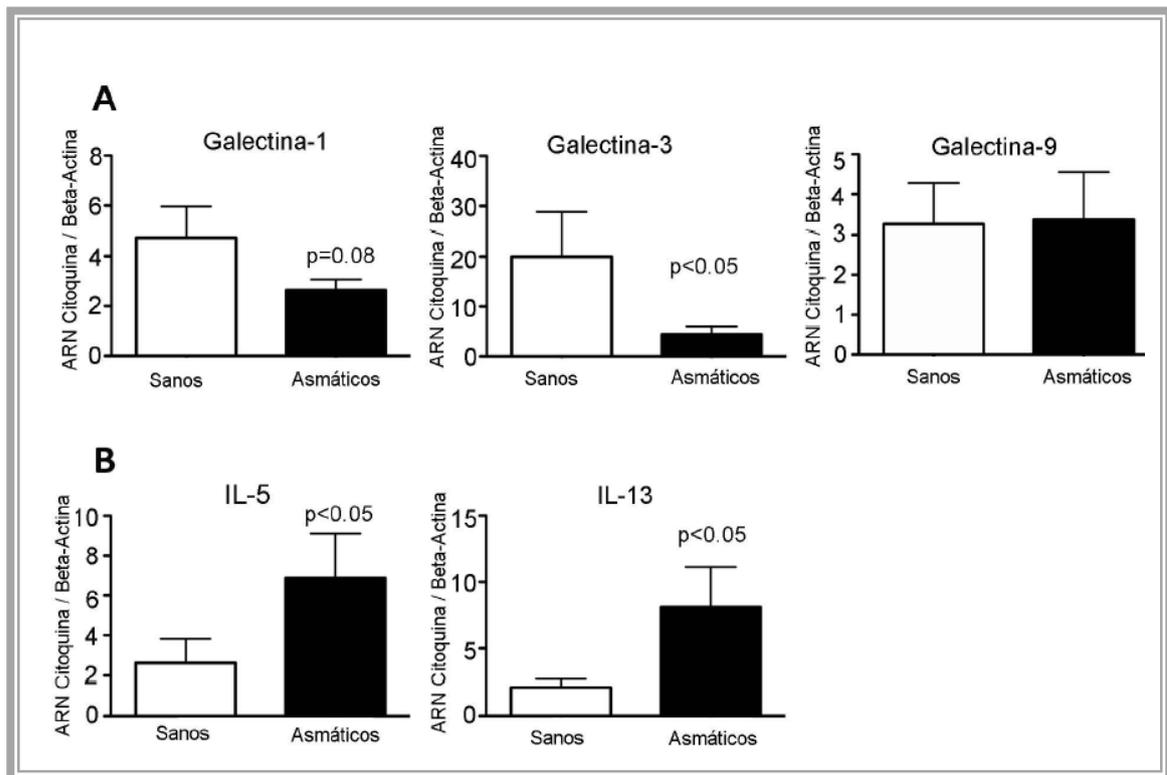


Figura 44. La expresión de las galectinas y de las citoquinas Th2 en las células de esputo inducido de pacientes asmáticos (n=16) y de sujetos sanos (n=11) se analizó por PCR semicuantitativa a tiempo real a partir del ARNm. **A.** Expresión del ARN de la gal-1, gal-3 y gal-9. **B.** Expresión del ARN de la IL-5 e IL-13. Los resultados de las galectinas y citoquinas se normalizaron mediante la expresión de la beta-actina medida en paralelo en cada muestra. Los niveles del ARN se expresaron como unidades arbitrarias respecto a la expresión de la beta-actina. Cada barra representa la media aritmética \pm error estándar (* $p < 0.05$, Prueba U Mann-Whitney).

La respuesta Th17 ha sido recientemente propuesta con un papel importante en la patología del asma alérgico (300). Sin embargo, la IL-17 y la IL-23, citoquinas asociadas a una respuesta Th17, no se detectaron en las muestras de esputo bajo nuestras condiciones (dato no mostrado).

E. Expresión de las galectinas en los leucocitos del esputo medido por citometría de flujo e inmunofluorescencia

La expresión de la proteína no puede predecir de forma fiable los cambios a nivel del ARNm. La expresión de las gal se regula de forma muy compleja, ya que estas proteínas se expresan tanto a nivel intracelular como extracelular (172). Las gal son secretadas por vías no clásicas y, una vez fuera de las células, pueden ser retenidas en la superficie o en la matriz extracelular, a través de su unión a los glicocojugados de superficie. Por lo tanto, la expresión de la proteína en la superficie de las células del esputo se determinó por citometría de flujo.

Las células CD16+ son los leucocitos más predominantes en las muestras de esputo. El HLA-DR se utilizó para diferenciar entre macrófagos (CD16+ DR+) y neutrófilos (CD16+ DR-) y la expresión de las gal se estudió en ambas poblaciones. Como se muestra en la figura 45, la gal-1 y las gal-9 se expresan únicamente en los macrófagos, mientras que la gal-3 se detecta en ambos tipos celulares, tanto en los macrófagos como en los neutrófilos.

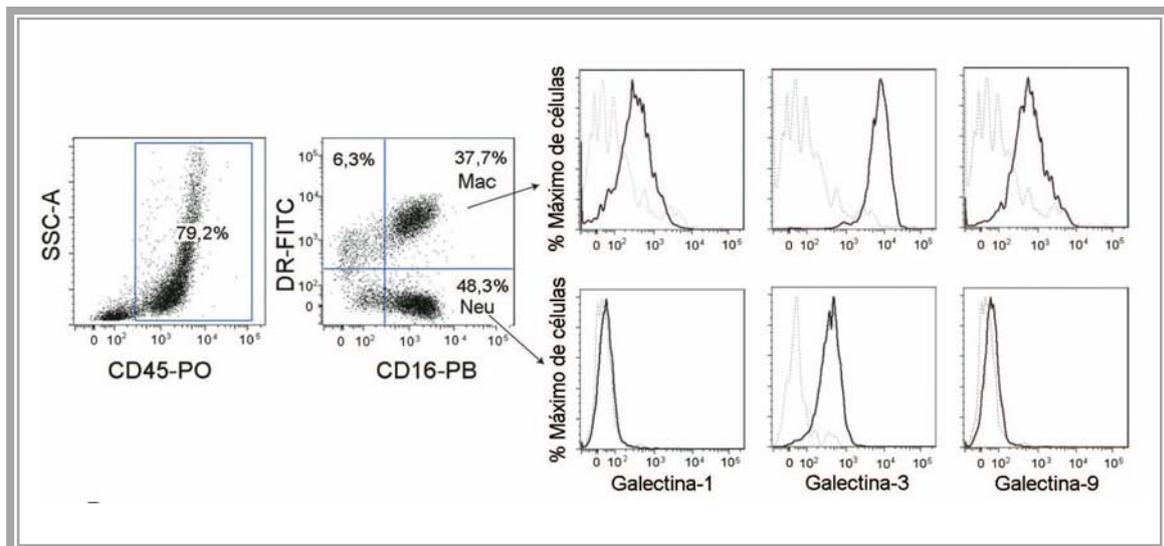


Figura 45. Los macrófagos son las células principales que expresan galectina 1 y galectina 9. Las células resuspendidas del esputo se tiñeron con anti-CD45, anti-CD16, anti-HLA y anti-gal-1, gal-3 y gal-9 analizándose por citometría de flujo. La expresión de la gal-1, gal-3 y gal-9 en los macrófagos (CD16+, DR+) y en los neutrófilos (CD16-, DR-) se muestra en la figura. Control de isotipo (línea de puntos) y expresión de galectinas (línea continua).

La diferente expresión de las gal entre los macrófagos y los neutrófilos se confirmó por IFI en el citospin de las muestras de esputo (figura 46). Así los núcleos de las células se tiñeron con Hoescht, los neutrófilos se marcaron con anti-CD45, los macrófagos con clase II (HLA-DR) y finalmente las tres gal con anticuerpos anti-galectinas.

Como podemos observar en la figura 46, las células del esputo por IFI que predominaban en todos los campos eran los macrófagos y los neutrófilos. A través del microscopio de fluorescencia se eligieron campos donde se podían seleccionar ambos tipos de células observándose que ambas se teñían con anti-CD45, mientras que, además, los macrófagos solo se teñían con MHC-II. Al sobreponer las 2 imágenes en el microscopio se

observó que la gal-1 y la gal-9 sólo se observaba en los macrófagos, mientras que la gal-3 se observaba tanto en los macrófagos como en los neutrófilos.

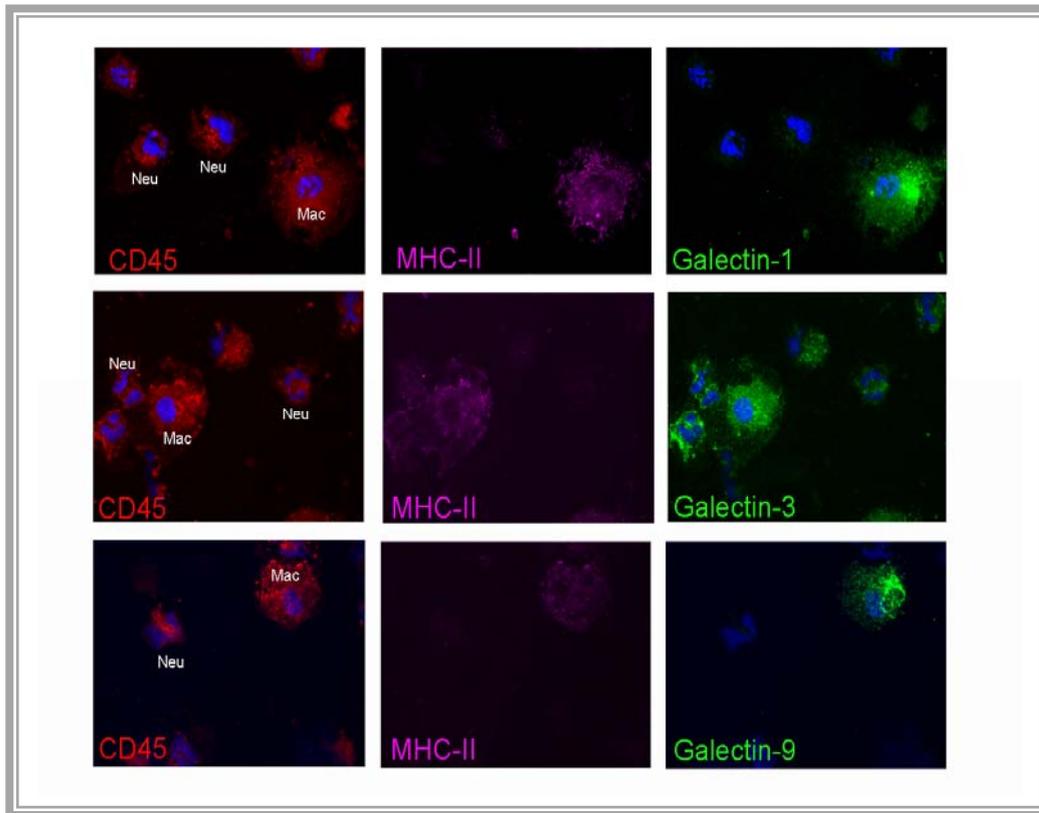


Figura 46. La expresión de la galectina 1, galectina 3 y galectina 9 se observa en los macrófagos detectados por inmunofluorescencia en las preparaciones de citospin de las muestras de esputo. La expresión de gal-1, gal-3 y gal-9 se marcó con verde, MHC-clase II en violeta y anti-CD45 en rojo. Los núcleos se tiñeron con Hoescht (azul).

Posteriormente, comparamos la expresión de las gal entre los sujetos sanos y los pacientes asmáticos por citometría de flujo. La expresión en superficie de la gal-1 y la gal-9 está claramente disminuida en los asmáticos comparado con el grupo control ($p < 0.05$), como se muestra en la figura 47A y 47B, lo que concuerda con lo publicado sobre estas proteínas como reguladores negativos de la respuesta inmune (191, 228). La expresión en superficie de la gal-3 fue muy variable, aunque con tendencia a ser más baja en asmáticos, siendo la diferencia no estadísticamente significativa (figura 47B).

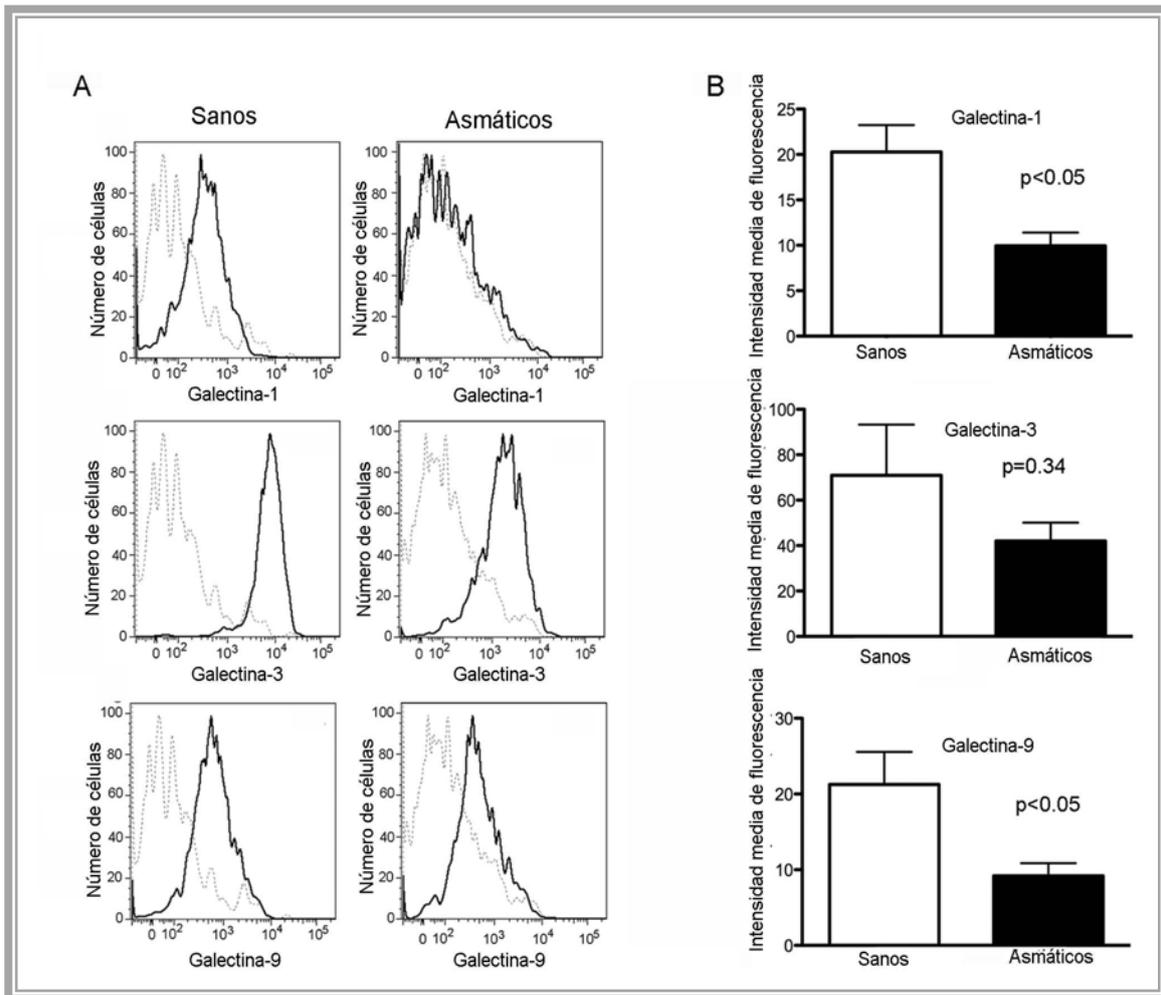


Figura 47. La expresión de la galectina 1, galectina 3 y galectina 9 está reducida en los leucocitos del esputo de pacientes con asma. A. Histogramas representativos de la expresión de las galectinas en los macrófagos (CD16+, DR+) analizado por citometría de flujo de un donante sano y un paciente asmático. Control de isotipo (línea de puntos), expresión de las galectinas (línea continua). **B.** La expresión de la gal-1, gal-3 y gal-9, expresada como la media aritmética \pm error estándar, en los leucocitos de las asmáticos (n=15) y donantes sanos (n=10) (U-Mann-Whitney).

F. Relación de las galectinas con el estado atópico

La gal-1, la gal-9, y especialmente la gal-3 se han asociado a procesos alérgicos. Subdividimos a los pacientes asmáticos en función de estado alérgico, ya que dentro del grupo de los donantes sanos no existían sujetos con esta característica. Estudiamos los niveles de las gal por citometría de flujo en los donantes sanos, comparándolos con los sujetos asmáticos no atópicos y pacientes atópicos. Como mostramos previamente en la tabla 8 de resultados, la mitad de los sujetos asmáticos eran atópicos y la otra mitad no atópicos. En nuestro trabajo no encontramos diferencias en la expresión de las gal entre pacientes asmáticos atópicos y no atópicos. Continuamos observando diferencias estadísticamente significativas entre la gal-1 y gal-9 de los sujetos sanos con respecto a los pacientes no atópicos como a los atópicos (figura 48).

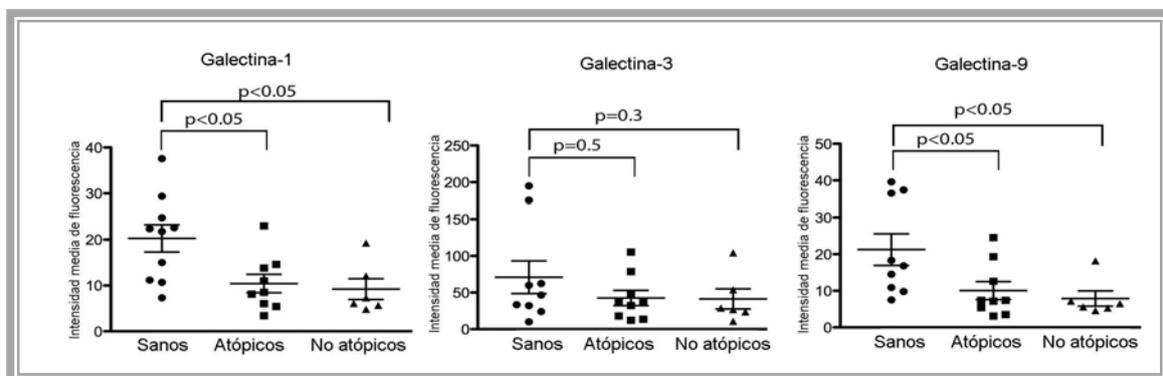


Figura 48. Expresión de la galectina 1, galectina 3 y galectina 9 en las células de esputo analizado por citometría de flujo acorde al estado atópico de los pacientes asmáticos con donantes sanos. (U-Mann Whitney)

G. Relación de las galectinas con el hábito tabáquico

Para determinar si los efectos del tabaco podrían afectar a los resultados observados entre los pacientes asmáticos y los sujetos sanos, dividimos a los controles entre fumadores y no fumadores y analizamos la expresión de la gal-1, gal-3 y gal-9 por citometría de flujo. El grupo de no fumadores presentó niveles altos de expresión de la gal-1 y de la gal-9 comparado con los fumadores, mientras que no observamos diferencias en cuanto a la expresión de la gal-3 entre ambos grupos. Continuamos observando diferencias significativas en cuanto a la expresión de la gal-1 y la gal-9 entre los pacientes asmáticos y sujetos sanos no fumadores (figura 49).

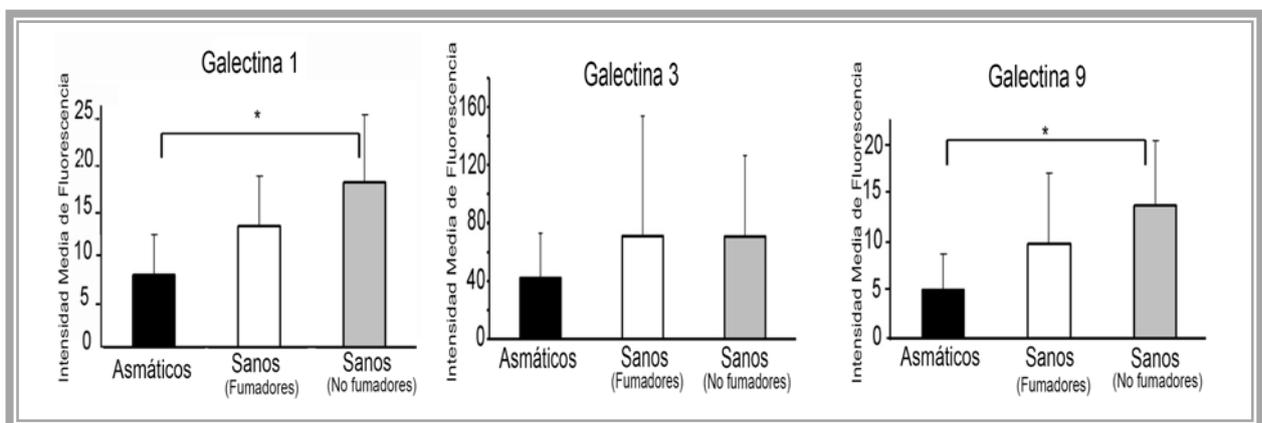


Figura 49. Expresión de la galectina 1, galectina 3 y galectina 9 en los leucocitos del EI de sujetos sanos acorde a la historia de tabaquismo. Sanos no fumadores (n=6), sanos fumadores (n=4) y pacientes asmáticos (n=15). Cada barra representa la media aritmética \pm error estándar de la intensidad media de fluorescencia (IMF) (Prueba U Mann-Whitney)

H. Asociación de las galectinas con la dosis de esteroides inhalados

Para determinar si los efectos de los GCI podrían afectar a la expresión de las gal, dividimos a los pacientes en función de la dosis de GCI que tomaban en el momento de la inclusión del estudio y analizamos la expresión de las gal con la dosis de GCI. Con este análisis, observamos que los pacientes con mayores dosis de GCI presentaban menores niveles de gal-1 pero mayores de gal-3 y gal-9, con respecto a los asmáticos que tomaban menores dosis de GCI (tabla 10).

| Dosis de CI con beclometasona o equivalente | Galectina-1 | Galectina-3 | Galectina-9 |
|---|-------------|--------------|-------------|
| < 500 µg/día | 11.53 ± 2.6 | 40.2 ± 11.2 | 9.7 ± 2.3 |
| > 1000 µg/día | 7.95 ± 1.1 | 52.13 ± 19.7 | 10.4 ± 4.7 |
| Sanos | 20.2 ± 2.9 | 70.9 ± 22.3 | 21.2 ± 4.3 |

Tabla 10. Relación entre la dosis de GCI y los niveles de expresión de las galectinas medido por citometría de flujo (media ± DS)

1. Asociación de la galectina 9 con la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNo)

El FeNO es un marcador que mide la inflamación eosinofílica que existe en el bronquio, y la principal función de la gal-9 es la de ser quimioatrayente de los eosinófilos, por lo que es posible que exista una relación entre ambas variables. Al analizar la expresión de los niveles del ARN de la gal-9 y la del FeNO encontramos que existe una correlación ya que observamos que a mayores niveles de gal-9 existen menores niveles de FeNO, y viceversa (Figura 50).

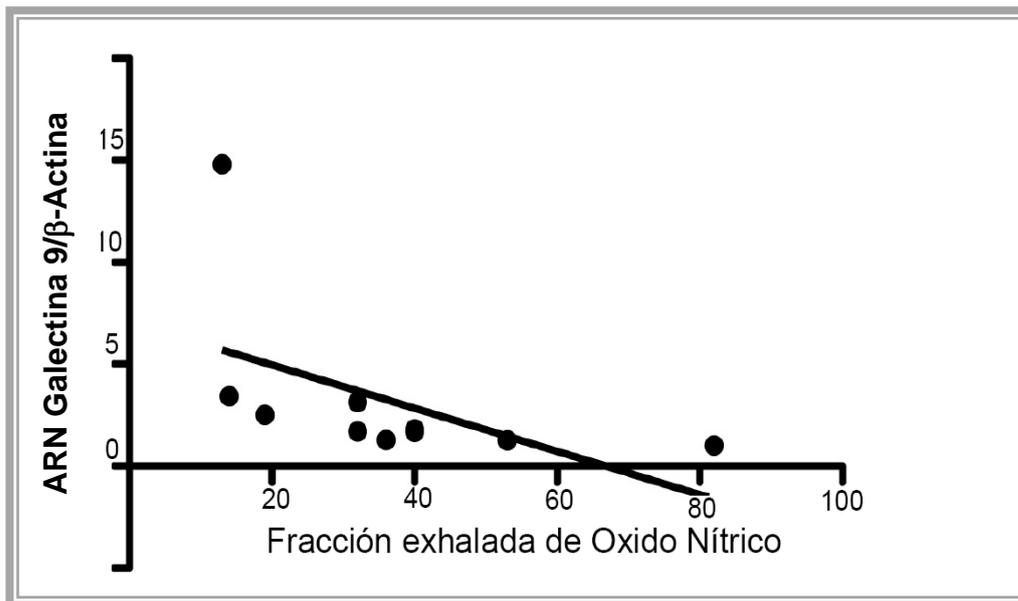


Figura 50. . Relación entre la fracción exhalada de óxido nítrico y la expresión del ARN de la galectina 9. (p= 0.0008 Prueba de Spearman)

J. Producción de citoquinas por las galectinas

Finalmente, estudiamos el papel de la gal-1, gal-3 y gal-9 en la producción de citoquinas inducidas por liposacáridos (LPS) en sangre periférica de donantes sanos. Las células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos se estimularon con LPS en ausencia o en presencia de gal-1, gal-3 y gal-9 durante 24 horas.

J.1. Expresión de la IL-12A e IL-12B

Los experimentos de RT-PCR mostraron que la gal-3 reduce la expresión de la IL-12A inducida por LPS y que la gal-9 disminuye la expresión de la IL-12B (figura 51).

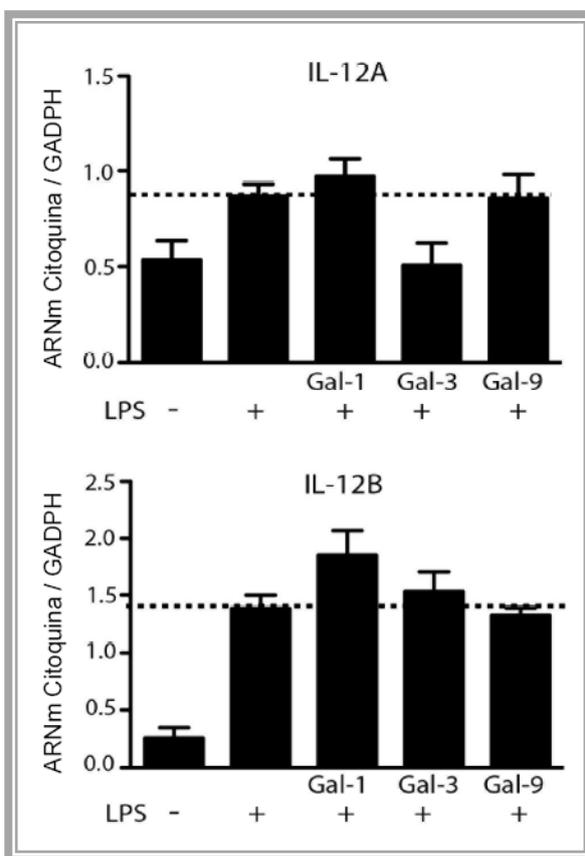


Figura 51. Galectina 3 y galectina 9 inhiben la expresión de IL-12A e IL-12B respectivamente en las células mononucleares de sangre periférica.

5x10⁵ células mononucleares se incubaron en una placa de 24 pocillos en presencia o ausencia de 100 ng/ul de LPS junto con 10 ug/ml de gal-1, gal-3 o gal-9. Después de 24 horas de incubación, la expresión de la IL-12A, IL-12B se analizó por RT-PCR. Las barras corresponden a la media ± el error estándar de 5 experimentos diferentes. La línea discontinua indica la expresión de la IL-12A e IL-12B inducida por LPS. Los niveles de expresión del ARN se expresan en unidades arbitrarias respecto a la expresión de GADPH. Las diferencias entre los grupos se analizaron por el test ANOVA.

Cuando se analizaron los datos de forma pareada, se observó que la reducción de los niveles de IL-12A ocurre en cuatro de los cinco donantes estudiados; sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (figura 52A). La gal-9 también causó una leve inhibición de la IL-12B en cuatro de los cinco pacientes incluidos en el estudio sin ser tampoco esa diferencia estadísticamente significativa (figura 52B).

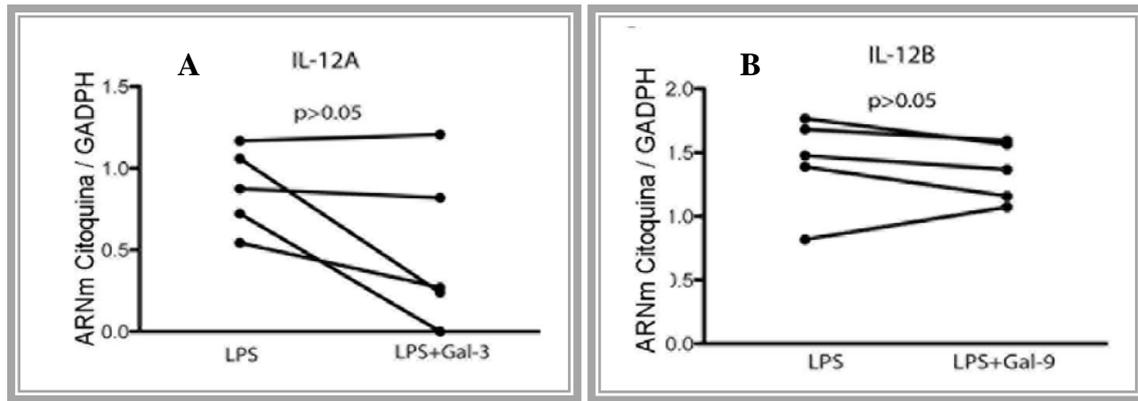


Figura 52. Galectina 3 y galectina 9 inhiben la expresión de IL-12A e IL-12B respectivamente en las células mononucleares de sangre periférica

A. Análisis por parejas de la expresión del IL-12A en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS y al administrar sobre esas mismas células estimuladas gal-3. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes. Las diferencias entre los 2 grupos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon para datos relacionados.

B. Análisis por parejas de la expresión del IL-12B en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS y al administrar sobre esas mismas células estimuladas gal-9. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes. Las diferencias entre los 2 grupos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon para datos relacionados

J.2. Expresión del TNF- α

Al estudiar la expresión del TNF- α en las células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS, observamos un leve incremento en presencia de gal-9 (figura 53A). Sin embargo, el análisis de las muestras pareadas mostró que los efectos solo ocurren en 3 de las 5 donantes (figura 53B).

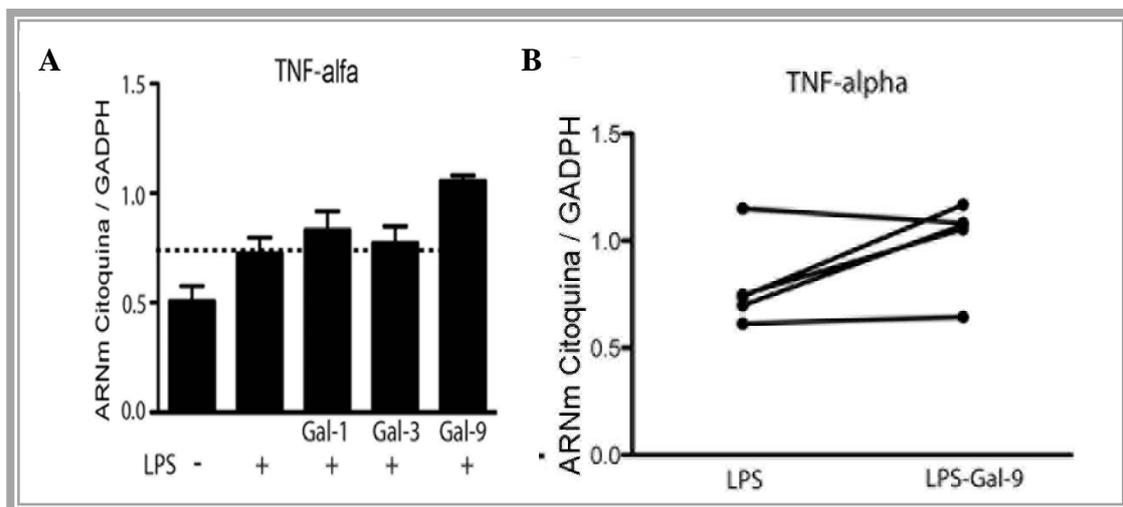


Figura 53. La galectina 9 induce la expresión de TNF- α en las células mononucleares de sangre periférica.

A. 5×10^5 células mononucleares se incubaron en una placa de 24 pocillos en presencia o ausencia de 100 ng/ul de LPS junto con 10 ug/ml de gal-1, gal-3 o gal-9. Después de 24 horas de incubación, la expresión de TNF- α se analizó por RT-PCR. Las barras corresponden a la media \pm el error estándar de 5 experimentos diferentes. La línea discontinua indica la expresión de las citocinas inducido por LPS. Los niveles de expresión del ARN se expresan en unidades arbitrarias respecto a la expresión de GADPH. Las diferencias entre los grupos se analizaron por el test ANOVA

B. Análisis por parejas de la expresión del TNF- α en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS y al administrar sobre esas mismas células estimuladas gal-9. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes. Las diferencias entre los 2 grupos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon para datos relacionados

J.3. Expresión de la IL-1 β

Con respecto a la IL-1 β , no detectamos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos de las células (figura 54).

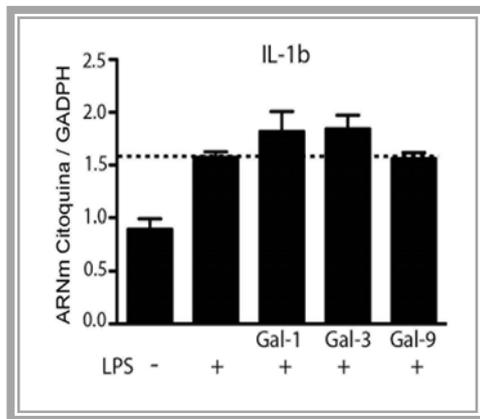


Figura 54. Las galectina 1, la galectina 3 y la galectina 9 no afectan a la expresión de la IL-1 β en las células mononucleares de sangre periférica. 5×10^5 células mononucleares se incubaron en una placa de 24 pocillos en presencia o ausencia de 100 ng/ul de LPS junto con 10 ug/ml de gal-1, gal-3 o gal-9. Después de 24 horas de incubación, la expresión de la IL-1 β se analizó por RT-PCR. Las barras corresponden a la media \pm el error estándar de 5 experimentos diferentes. La línea discontinua indica la expresión de la IL-1 β inducida por LPS. Los niveles de expresión del ARN se expresan en unidades arbitrarias respecto a la expresión de GADPH. Las diferencias entre los grupos se analizaron por el test ANOVA

J.4. Expresión de la IL-10

Por otra parte, ambos la gal-1 y la gal-9 fueron capaces de incrementar la expresión del ARN de la IL-10 inducida por LPS; en ambos casos la inducción de la expresión de la IL-10 se observó en todas las muestras estudiadas (figura 55A y 55B).

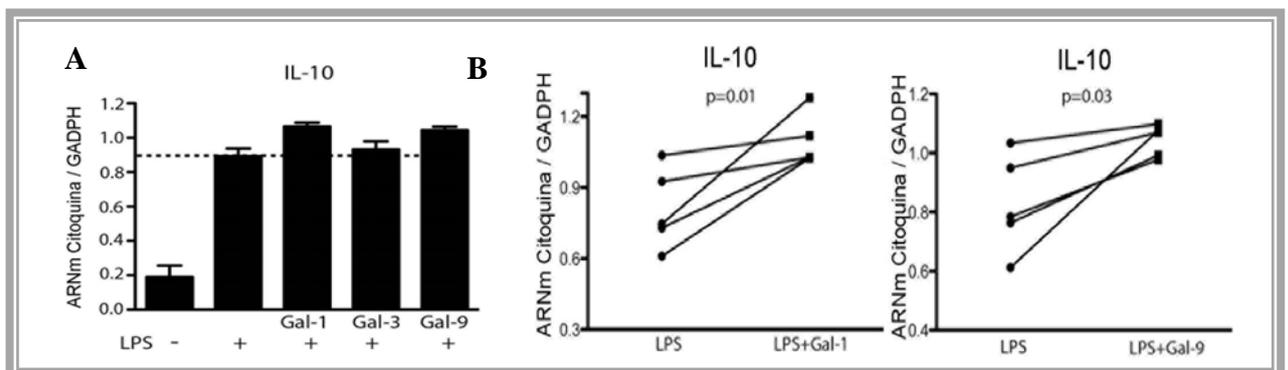


Figura 55. Galectina 1 y galectina 9 induce IL-10 en células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos.

A. 5×10^5 células mononucleares se incubaron en una placa de 24 pocillos en presencia o ausencia de 100 ng/ul de LPS junto con 10 ug/ml de gal-1, gal-3 o gal-9. Después de 24 horas de incubación, la expresión de la IL-10 se analizó por RT-PCR. Las barras corresponden a la media \pm error estándar de 5 experimentos independientes. La línea discontinua indica la expresión de la IL-10 inducida por LPS. Las diferencias entre los grupos se analizaron por el test ANOVA.

B. Análisis por parejas de la expresión de la IL-10 en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS y al administrar sobre esas mismas células estimuladas gal-1 y gal-9. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes. Las diferencias entre los 2 grupos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon para datos relacionados.

Por otra parte, la gal-1 y la gal-9 en ausencia de estímulos adicionales inducen una alta expresión de IL-10 (figura 56).

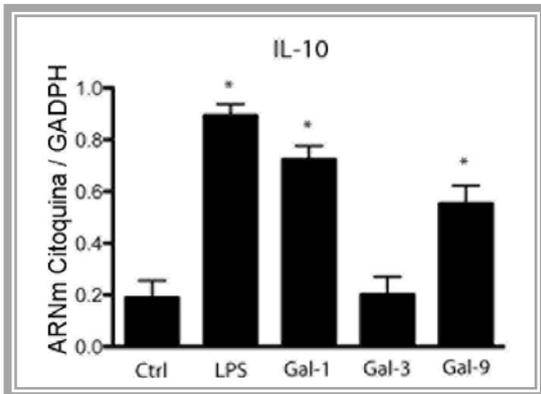


Figura 56. Galectina 1 y galectina 9 inducen la expresión de la IL-10
 Las células mononucleares (5×10^5) se incubaron en una placa de 24 pocillos en presencia de $10 \mu\text{g/ml}$ de gal-1, gal-3 and gal-9 durante 24 horas, y la expresión de la IL-10 se determinó por RT-PCR durante 24 h. El LPS (100 ng/ml) se utilizó como control positivo. Los datos corresponden a la media \pm error estándar de cinco experimentos independientes. (* $p < 0.05$, ANOVA)

J.5. Expresión de la IL-10 e IL-4 en los linfocitos T periféricos

El efector regulador de gal-1, gal-3 y gal-9 se estudió también en los linfocitos T periféricos inducidos con anti-CD3 y anti-CD28. Los linfocitos se estimularon durante 24 horas con anti-CD3 y anti-CD28 en la presencia o ausencia de gal-1, gal-3 y gal-9 como se indica en material y métodos. La producción de citoquinas se determinó usando el sistema de inmunoensayo de microesferas analizado por citometría de flujo. Nuestros resultados demuestran que la presencia de gal-1 durante la estimulación del los LT induce una producción alta de IL-10 ($p=0.02$), como se observa en la figura 57. También observamos un aumento de la producción de IL-4 en los linfocitos co-incubados con gal-3 y anti-CD3 con anti-CD28, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 58)

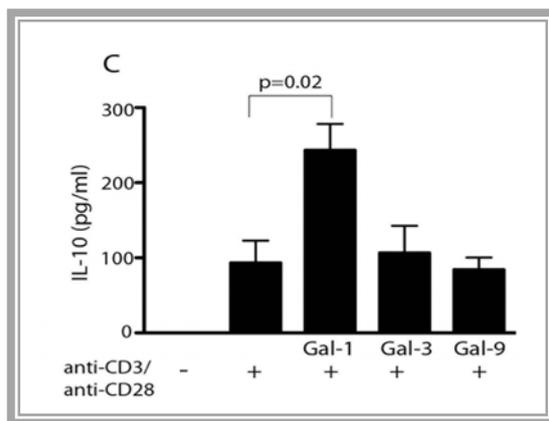


Figura 57. La galectina 1 induce IL-10 en linfocitos de sangre periférica de donantes sanos.

La secreción de la IL-10 por los linfocitos de sangre periférica (PBLs) estimulados con anti-CD3/anti-C28 en presencia o ausencia de gal-1, gal-3 o gal-9. Los PBLs ($2 \times 10^5/\text{ml}$) se incubaron en placas de 24 pocillos estimulados previamente con anti-CD3/anti-CD28. La producción de IL-10 se analizó utilizando un sistema de inmunoensayo con microesferas analizado por citometría de flujo. Las barras corresponden a la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Las diferencias entre los grupos se analizaron por el test ANOVA.

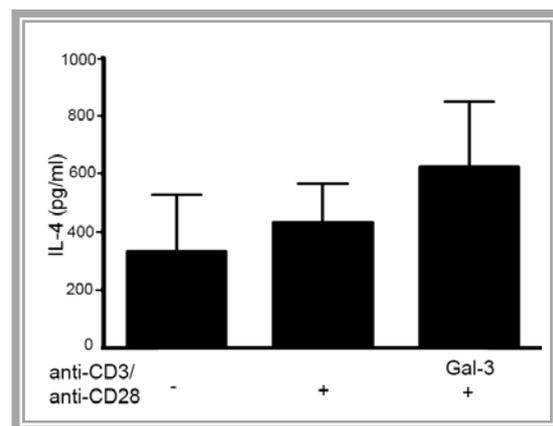


Figura 58. La galectina 3 induce IL-4 en linfocitos de sangre periférica de donantes sanos.

La secreción de la IL-4 por los linfocitos de sangre periférica (PBLs) estimulados con anti-CD3/anti-C28 en presencia o ausencia de gal-1, gal-3 o gal-9. Los PBLs ($2 \times 10^5/\text{ml}$) se incubaron en placas de 24 pocillos estimulados previamente con anti-CD3/anti-CD28. La producción de IL-4 se analizó utilizando un sistema de inmunoensayo con microesferas analizado por citometría de flujo. Las barras corresponden a la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Las diferencias entre los grupos se analizaron por el test ANOVA.

V. DISCUSIÓN



1. DISCUSIÓN DEL MÉTODO

A. Características de los pacientes

Los pacientes que se incluyeron en el presente proyecto de investigación habían sido remitidos al laboratorio de función pulmonar desde la consulta monográfica de asma del Hospital Universitario de La Princesa en Madrid, para la obtención de un esputo, a través de la técnica de El para medir la expresión de las gal, en pacientes que presentaban diagnóstico de asma bronquial establecido al menos 6 meses antes. Para el diagnóstico de asma se exigió una historia clínica de sibilancias, tos, tirantez torácica o disnea intermitente, con limitación al flujo aéreo documentada, reversible espontáneamente o mediante tratamiento (301).

La indicación de la prueba se realizó desde el ámbito clínico, por el neumólogo que atendía a cada paciente y, en ningún caso, se modificó el tratamiento de mantenimiento que venían realizando para el control de su enfermedad.

En el momento de la citación de la prueba, a los pacientes no se les indicó que debían suspender su medicación habitual en las horas previas a la realización de la misma, según establecen las normativas nacionales e internacionales vigentes en la actualidad.

La inclusión de los pacientes y donantes sanos se llevó a cabo de forma consecutiva, sin una selección a priori de los mismos. Únicamente, aquellos sujetos que no accedieron a firmar el consentimiento, los que no fueron capaces de realizar las maniobras de capacidad vital forzada o los que referían haber padecido exacerbación de su enfermedad en las 4 semanas previas, son los que fueron retirados del estudio. Asimismo, no se realizó la inducción de esputo a aquellos pacientes que presentaban alguna contraindicación relativa para realizar la prueba.

- **Gravedad de los pacientes asmáticos**

Los pacientes asmáticos fueron clasificados por gravedad, siguiendo la normativa GINA 2003 (294) para asmáticos con un régimen de medicación diaria, dado que se trataba de enfermos con diagnóstico previo, en fase estable y, en su mayoría, recibían tratamiento con GCI. Por este motivo, la muestra estudiada presentaba algunos pacientes con asma persistente leve (4.16%), aunque predominaban los sujetos con asma moderado (62.5%) y grave (33.8%).

Por tanto, se trata de una muestra representativa de la población de enfermos asmáticos que se pueden ver en la práctica clínica habitual, en las consultas externas de neumología de un hospital o en los centros de especialidades.

La muestra de sanos se considera representativa de la población sana ya que son donantes sin enfermedades respiratorias ni otras enfermedades crónicas que pudieran alterar el resultado del estudio.

Sin embargo, el número de pacientes incluidos en el estudio podría ser escaso, pero al tratarse de un estudio piloto y novedoso que trata de mostrar por primera vez la expresión de la

gal-1, gal-3 y gal-9 en sujetos asmáticos, es posible que estos datos puedan extrapolarse a una cohorte de pacientes más grande con resultados similares. Durante la realización de este estudio hubo muestras que se desecharon por falta de criterios de calidad de la muestra, en concreto 3 pacientes asmáticos y 3 sanos.

Al revisar en la bibliografía estudios similares encontramos un trabajo publicado en 2008 por Santiago Quirce y colaboradores, donde estudiaron la expresión de diferentes mediadores inflamatorios en el esputo de 13 pacientes con bronquitis eosinofílica no asmáticos, 13 sujetos asmáticos y 11 controles sanos a través de PCR y técnicas de inmunoensayo encontrando, diferencias significativas en la expresión de la prostaglandina E en los tres grupos estudiados, a pesar del escaso número de pacientes incluidos en el estudio (302).

- **Edad de los pacientes y donantes sanos**

Al comparar los sujetos incluidos en este estudio, observamos que la media de edad de nuestros pacientes y donantes sanos es diferente. Los pacientes asmáticos son enfermos con edades superiores en relación a los controles estudiados. Estas diferencias pueden ser debidas a que la población que se ve en la antigua Área 2 Sanitaria de Madrid corresponde en general a una población más envejecida. Mientras que la selección de sujetos sanos se realizó entre el personal sanitario y no sanitario del hospital que, en general, presenta edades más jóvenes que los pacientes.

Sin embargo, al analizar el rango de la edad de los pacientes asmáticos, observamos que solo existen 2 pacientes con edades muy extremas de 75 y 73 años, y por eso existe una diferencia importante entre las medias de las edades. Al re-analizar los datos, excluyendo los pacientes asmáticos mayores de 60 años, encontramos que la media \pm desviación estándar de los asmáticos fue de 38.7 ± 14.07 , mientras que para el grupo control fue de 36 ± 10.9 , observando igualmente diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

- **Sexo de los pacientes y donantes sanos**

Si comparamos el sexo de los pacientes y sujetos sanos de nuestro trabajo observamos que existe una mayor proporción de mujeres que varones (19 mujeres y 5 varones) en el grupo de asmáticos. Estos datos coinciden con lo descrito en la bibliografía donde el asma del adulto es una enfermedad con un prevalencia superior en mujeres que en hombres (7), por lo que la selección de pacientes de este estudio refleja la realidad de la población asmática en lo que respecta al sexo. En lo relativo a los donantes sanos, es una muestra representativa, ya que existe un 50% de mujeres y otro 50% de hombres.

Revisando la bibliografía existe un estudio donde analizan la posible asociación de la gal-3 con factores de riesgo cardiovascular, así como otros factores incluyendo los demográficos. En este trabajo observan una asociación estadísticamente significativa entre la gal-3 y la edad, además de encontrar mayores niveles de gal-3 en las mujeres en una cohorte de 7900 sujetos (303).

- **Historia de tabaquismo en los pacientes y donantes sanos**

Nuestro grupo control incluye a un 44% de sujetos fumadores con un IPA de 7, mientras que el hábito tabáquico de los pacientes sólo se presenta en un 8.3% con un IPA de 10. Nos preguntamos, si la historia de tabaquismo podría estar afectando a la expresión de las gal que observamos en los sujetos sanos, ya que en ellos, existe una proporción mayor de sujetos fumadores, en comparación con los asmáticos.

Cuando analizamos la expresión de las gal entre fumadores y no fumadores, observamos niveles altos de expresión de la gal-1 y de la gal-9 en el grupo de sanos no fumadores. Estos datos sugieren que las diferencias de expresión de la gal-1 y gal-9 entre nuestra cohorte de pacientes asmáticos y controles sanos es independiente del hábito tabáquico que presenta el paciente.

Al revisar en la bibliografía el posible papel del tabaco en la expresión de las gal sólo existe un trabajo realizado en el 2007 por Pilette y colaboradores donde analizaron la expresión de las gal en el epitelio bronquial de la vía aérea pequeña o periférica y de la vía aérea grande por inmunohistoquímica en pacientes EPOC, comparándola con pacientes fumadores y donantes sanos no fumadores. En este estudio observaron por la técnica de inmunohistoquímica que únicamente el epitelio bronquial de vía aérea pequeña presenta un incremento de la expresión de la gal-1 en los pacientes fumadores y aumento de la expresión de la gal-3 en los pacientes con EPOC (304). Este trabajo muestra que la expresión de la gal-1 y gal-3 aumenta en pacientes fumadores y pacientes con EPOC, analizada por inmunohistoquímica en las células epiteliales de la vía aérea más distal. Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos datos contrarios, donde la expresión de las gal en pacientes fumadores es más baja que en pacientes no fumadores analizada por citometría de flujo. Es posible que las diferencias encontradas entre ambos trabajos sean porque en nuestro estudio analizamos la expresión de las gal en las células de esputo, mientras que en el trabajo mencionado previamente se analizaron en las células epiteliales de la vía aérea pequeña de las biopsias de pacientes.

No existen más trabajos que analicen la expresión de las gal entre sujetos asmáticos fumadores y no fumadores, por lo que es necesario realizar más estudios para comprender la influencia del tabaco en la expresión de las gal en las enfermedades respiratorias.

- **Estado atópico de los pacientes asmáticos**

Las tres gal estudiadas y, fundamentalmente, la gal-3 se han asociado a procesos alérgicos o atópicos en múltiples enfermedades (305, 306). Por ello nos preguntamos si la presencia de atopia podría influir en la expresión de las gal en nuestros sujetos de estudio.

Subdividimos a los pacientes asmáticos en función de estado alérgico, ya que dentro del grupo de los donantes sanos no existían sujetos con esta característica. En nuestro trabajo no encontramos diferencias en la expresión de las gal entre ambos grupos, sospechando que la baja expresión de la gal-1 y gal-9 es independiente del estado alérgico que presentaba la cohorte de pacientes asmáticos estudiados. Al analizar la expresión de la gal-1 y la gal-9 entre

los donantes sanos y los sujetos atópicos y entre los sujetos sanos y los pacientes no atópicos continuamos encontrando diferencias estadísticamente significativas.

- **Función pulmonar en los asmáticos y sujetos sanos**

Los resultados obtenidos en la espirometría basal realizada a nuestros pacientes, mostraron una población con volúmenes pulmonares dinámicos en reposo dentro de la normalidad, a pesar de que más del 90% de los pacientes presentaban un asma persistente moderado-grave, clasificados según la GINA de acuerdo a la dosis de medicación diaria (294).

Los donantes sanos mostraron igualmente unos volúmenes pulmonares dinámicos en reposo dentro de la normalidad, como cabría esperar, ya que se trataba de una población sana sin enfermedades respiratorias conocidas en el momento de la inclusión en el estudio.

- **Dosis de glucocorticoides inhalados**

En nuestro trabajo, a todos los pacientes se les permitió continuar con su medicación habitual incluyendo el tratamiento con GCI, mostrando una proporción homogénea en los 3 grupos al dividir a los pacientes según la dosis del esteroide inhalado que tomaba en: < 500 µg de beclometasona inhalada o equivalente (8 pacientes que equivalen a un 33.3%), entre 500-1000 µg de beclometasona inhalada o equivalente (9 pacientes que equivalen a un 37.5%) y > 1000 µg de beclometasona inhalada o equivalente (7 pacientes que equivalen a un 29.16%).

Se ha descrito que la expresión de las gal puede ser modificada por los corticosteroides, ya sea induciendo o inhibiendo su expresión (307, 308). En la bibliografía no existe ningún estudio que relacione la expresión de la gal con la dosis de GCI, pero si hay estudios que observan la modificación de las gal con los esteroides sistémicos en modelos de ratón o modelos *in vitro*.

Un estudio realizado en los cultivos de pólipos nasales humanos demostró que la incubación con dosis altas de budesonida (250 ng/mL) induce un aumento en la expresión de la gal-1. El incremento de la expresión de la gal-1 se relacionó con una disminución en la migración de los eosinófilos, la principal célula inflamatoria en esta patología (201). La expresión de la gal-3 se ha estudiado en las células Clara y en los macrófagos del pulmón de ratas adultas tratadas con dexametasona, donde se observó un aumento de la expresión de la gal-3 en el núcleo y citoplasma de ambas células (308), en comparación con las muestras de pulmón de ratas no tratadas. En el caso de la gal-9 existe un estudio realizado en DCs humanas en el que se describe que el tratamiento *in vitro* con dexametasona no influye en la expresión de esta gal (307).

Para clarificar este aspecto, comparamos a los pacientes acorde a la dosis de GCI, como previamente se ha descrito, con los pacientes sanos, sin observar diferencias significativas entre los grupos de pacientes asmáticos. En la gal-1, se ve una ligera disminución no significativa en los pacientes tratados con mayor dosis de esteroide. Por el contrario, al estudiar la gal-3 y la gal-9, la relación es inversa, observando un ligero aumento no significativo en los pacientes con mayor dosis de esteroide inhalado. Estos datos indican que la disminución

en los niveles de gal que detectamos en nuestro estudio no parece estar influidos por las dosis de GCI que recibían los pacientes.

La dosis de GCI puede ser un sesgo a la hora de analizar la expresión de las gal en los pacientes asmáticos a pesar de que, en este trabajo, no encontramos diferencias significativas en función de la dosis de GCI que toma el paciente. Un estudio donde a los pacientes se le hubiera suspendido la medicación hubiera sido más preciso y más real a la hora de analizar la expresión de estas proteínas en los pacientes asmáticos. Sin embargo, la ética profesional impide hacer este tipo de estudios, ya que se necesitaría suspender la medicación más efectiva en estos enfermos, como son los GCI, con los posibles efectos adversos que provocarían al paciente derivados de esta acción.

- **Fracción exhalada de Óxido Nítrico**

Los pacientes asmáticos presentaron un grado de inflamación leve medido por el FeNO, que fue un valor medio de 34 ppb, mientras que los sujetos sanos no presentaban inflamación medida por el FeNO, ya que su valor medio fue por debajo de 30 ppb. Esto nos indica que a pesar de la escasa inflamación existente en los pacientes asmáticos existe una diferencia significativa entre los niveles de expresión de estas gal con respecto a los sujetos sanos, independiente del escaso grado de inflamación.

Al revisar la bibliografía, no existen datos que relacionan el nivel de expresión de las gal con el grado de inflamación, medido por el FeNO. Sin embargo, al ser la gal-9 un quimiotrayente de los eosinófilos es posible que pudiera existir una relación entre los niveles de esta gal con el FeNO que mide específicamente la inflamación eosinofílica del bronquio. Por lo que al analizar estas dos variables existe una correlación inversa significativa encontrando que los pacientes con mayores niveles de FeNO, y por lo tanto mayor inflamación eosinofílica, presentan menores niveles de expresión del ARN de la gal-9.

Por lo tanto, la relación existente entre estas dos variables concuerda con nuestra hipótesis sobre el papel de la gal-9 como molécula inmunosupresora en el asma al observar que los bajos niveles de expresión de la gal-9 presentes en nuestra cohorte de pacientes asmáticos existen en los enfermos que presentan mayor inflamación bronquial medida por el FeNO.

B. Técnica de Inducción de Espujo

La técnica de inducción de espujo es una prueba no invasiva apta para medir la inflamación existente en el bronquio. La estandarización del protocolo de la técnica, así como de la interpretación de los resultados, se encuentra aceptada por diversas sociedades médicas, y está estandarizada a nivel internacional,

El éxito de la inducción del espujo depende de muchos factores, como se ha descrito previamente. El procedimiento que hemos utilizado en nuestro trabajo tiene éxito, aproximadamente, en el 80% de los asmáticos estables o pacientes sanos, que no son

capaces de producir esputo espontáneamente, y puede llegar a ser del 100% cuando se aplica en asmáticos no controlados, en pacientes asmáticos con infección respiratoria y en fumadores o exfumadores (309).

Cuando se utiliza el RCD del esputo, es decir el recuento de las diferentes subpoblaciones celulares observadas a través de la tinción del citospin para el estudio y seguimiento de las enfermedades, como es el caso de los eosinófilos como marcador diagnóstico de la bronquitis eosinofílica, únicamente se precisa una muestra con un índice bueno de calidad, sin necesitar el RCT.

Realizamos un RCD de la muestra de esputo de los pacientes asmáticos y sujetos sanos no hallando diferencias significativas en cuanto a la proporción de los polimorfonucleares, linfocitos y eosinófilos. Aunque la eosinofilia es una de las características principales del asma, no detectamos diferencias en el porcentaje de estas células, pero es importante recordar que el grupo de pacientes incluidos en este trabajo eran pacientes controlados en el momento de la toma de la muestra de esputo y esto podría explicar el bajo porcentaje de eosinófilos detectados en estos pacientes (<3%). En lo que respecta a los macrófagos/monocitos y a las células epiteliales se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los porcentajes. Encontramos una mayor proporción de macrófagos/monocitos con menor porcentaje de células epiteliales bronquiales en los sujetos sanos con respecto a los pacientes asmáticos.

Además de realizar el RCD en las muestras de esputo, necesitamos el RCT, es decir el número aproximado de células resuspendidas en 1 mL de PBS para posteriormente, realizar las técnicas inmunológicas. En ocasiones, en nuestro estudio, hubo muestras con escasa celularidad.

El estudio de las muestras de esputo por citometría de flujo y por PCR posee una dificultad añadida a la hora de estudiar la expresión, en nuestro caso de las gal, o de cualquier otra proteína en el *pellet* del esputo. Para realizar la técnica de la RT-PCR se precisa de personal entrenado para evitar la posible degradación del ARN de las células durante el procesado de la muestra. El análisis de las células de esputo por citometría de flujo tampoco está exento de inconvenientes. Se precisa disponer de una cantidad suficiente de células, y por tanto de un volumen suficiente de esputo para poder comparar las diferentes condiciones que se analizan. Se ha observado, también, la posible interferencia del DTT, que es la sustancia que utilizamos para procesar la muestra de esputo, en los marcadores celulares analizados, sobre todo con el HLA-DR, ya que presenta puentes disulfuro en su estructura, al igual que el esputo. También, la autofluorescencia de los macrófagos, especialmente en los fumadores, puede producir alteraciones a la hora de seleccionar las poblaciones celulares en el citómetro de flujo para su posterior análisis.

En nuestro caso, debido a que en algunas ocasiones el RCT era muy bajo, hubo que decidir entre analizar el esputo por citometría de flujo o por RT-PCR. Se decidió de forma arbitraria que cuando el número de células fuese inferior a 5×10^5 , se analizaría únicamente por unas de las dos técnicas.

En lo que respecta al estudio de las gal en muestras de El sólo existe un trabajo recientemente publicado, donde analizan el papel de la gal-10. Esta gal sigue siendo en parte una desconocida pero existen algunos estudios que la asocian con enfermedades inflamatorias eosinofílicas, tales como el asma o la rinitis (310-312). En este estudio analizan la expresión de la gal-10 en el sobrenadante del esputo de pacientes asmáticos, sujetos sanos, pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), pacientes sin ABPA y pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, pero no miden la expresión de la gal-10 en el *pellet* del esputo por citometría de flujo ni por RT-PCR como se realizó en nuestro trabajo (313).

- **Técnica de Citometría de flujo**

La citometría de flujo ha sido empleada previamente en el análisis de las células inflamatorias del LBA (314, 315), sin embargo, los estudios que utilizan esta técnica para analizar las células del esputo son escasos.

El primer antecedente de la utilización de la citometría de flujo en el esputo se realizó en el año 1999, donde se aplicó al estudio de eosinófilos en 11 pacientes asmáticos (267). Posteriormente, la escuela de Canadá investigó la validez y reproducibilidad de las determinaciones de subpoblaciones linfocitarias en el esputo de 11 pacientes con asma en fase estable y en 10 fumadores no asmáticos (316). En este estudio encontraron que los pacientes con asma presentaban más eosinófilos y una mayor proporción de linfocitos B que los sujetos control. Así, concluyen que el esputo de los pacientes asmáticos presenta perfiles diferentes de linfocitos medidos por citometría de flujo.

Para identificar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares del esputo, la microscopía ha sido útil, pero tiene sus limitaciones. La citometría de flujo puede ser una alternativa, pero hay dificultades metodológicas importantes ya que los leucocitos sufren cambios morfológicos al pasar por la vía aérea alterando su fenotipo convencional.

Hasta muy recientemente, no existía ningún trabajo que demostrase un patrón de anticuerpos monoclonales exacto que defina bien la mayoría de las subpoblaciones celulares que posee el esputo (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, polimorfonucleares, células epiteliales,..). Sin embargo, recientemente, se ha publicado un estudio donde se analizan los leucocitos del esputo de pacientes asmáticos por citometría de flujo. En este trabajo detectaron a los neutrófilos como CD45+, CD66+, los eosinófilos por su parte se identificaron como CD45+ CD125+, mientras que los macrófagos fueron identificados como CD45+ CD14+ CD66-. Estos marcadores celulares parecen aceptables ya que la microscopía demostró una fuerte correlación entre el porcentaje de estas células medidas por citometría de flujo y por microscopía (317).

En nuestro estudio, utilizamos otros marcajes para identificar y diferenciar las posibles subpoblaciones celulares del esputo que expresaban las gal. Los macrófagos y los neutrófilos son las células del esputo que predominan, por lo que pensamos que las gal se expresarían en algunas de ellas o en ambas. Para detectar los macrófagos y los neutrófilos, las células del esputo se tiñeron con anti-CD45 junto con anti-CD16 y anti-HLA-DR, además de utilizar el 7-

AAD para excluir a las células muertas del estudio. La población de macrófagos fue identificada como CD45+ HLA-DR+ CDC16+ y los neutrófilos como CD45+ HLA-DR- CD16+, Sin embargo, los neutrófilos se marcaron con anti-CD16 pero no expresan anti-HLA-DR. Como se trataba de pacientes con asma controlado, y el porcentaje de eosinófilos en el esputo fue siempre inferior al 3% tanto en los asmáticos, como en los sujetos sanos, no se utilizó ningún anticuerpo para diferenciar estas células por citometría de flujo.

- ***Técnica de RT-PCR***

La expresión de la IL-5 en el ARNm de las muestras de EI en sujetos sanos, en pacientes atópicos y asmáticos mediante la PCR fue estudiada por primera vez por Gelder y colaboradores (318), observando que la IL-5 se detectaba en mayor proporción en los pacientes asmáticos seguido de los atópicos y sujetos sanos. Posteriormente, se han descrito numerosos estudios que analizan la expresión de múltiples proteínas en el ARN de las células de esputo, comparándolas con parámetros clínicos para poder determinar futuros biomarcadores de inflamación en enfermedades respiratorias tan prevalentes como la EPOC o el asma (319).

La obtención de EI en combinación con la técnica de PCR permite identificar la expresión de citoquinas, que pueden intervenir en el proceso inflamatorio crónico de las vías respiratorias, en pacientes asmáticos. Sin embargo, la demostración de la implicación de una determinada citoquina debe basarse en la identificación de la proteína real y no, únicamente, en el ARNm que lo codifica.

- ***Técnica de Inmunofluorescencia indirecta***

En lo que respecta a la técnica de IFI, como técnica de tinción, se utiliza en las células del esputo para detectar la presencia y distribución de proteínas, glúcidos y moléculas pequeñas tanto de origen biológico como no.

En un estudio reciente, se analizaron las proteínas eosinófilicas (proteína eosinofílica de los eosinófilos y la peroxidasa de los eosinófilos) en las muestras de esputo por inmunofluorescencia, observando ambas proteínas en los macrófagos de la vía aérea de estos enfermos, postulándose como posibles biomarcadores de la inflamación eosinofílica de la vía aérea de los pacientes asmáticos gracias a la técnica realizada (272).

En nuestro caso, la IFI nos ayudó a diferenciar la expresión de las gal en las subpoblaciones celulares del esputo corroborando los resultados observados con la citometría de flujo. Así, confirmamos que la gal-1 y la gal-9 sólo se expresaban en los macrófagos, mientras que la gal-3 se observaba tanto en los macrófagos como en los neutrófilos del esputo.

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La mayoría de los estudios publicados en la inmunopatogénesis del asma y otras enfermedades inflamatorias se centran en mediadores proinflamatorios. Sin embargo, en los últimos años, el estudio de las células y moléculas con actividad inmunorreguladora ha comenzado a ganar importancia.

Los datos presentes en este estudio muestran que las células de la vía aérea, obtenidas de muestras de EI de pacientes con asma, expresan bajos niveles de gal-1 y gal-9 y altos niveles de IL-5 e IL-13, comparado con células de sujetos sanos. Además, hemos identificado a los macrófagos como las células del esputo que expresan gal-1 y gal-9.

Posteriormente, observamos que tanto la gal-1 como la gal-9 actúan como moléculas antiinflamatorias, probablemente al aumentar los niveles de expresión de la IL-10, citoquina antiinflamatoria, en las células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos. Además, la gal-9 inhibe la producción de la IL-12, citoquina proinflamatoria, en las mismas células, lo que apoya la actividad antiinflamatoria de esta gal.

A. Galectina-1 actúa como molécula inmunosupresora

En nuestro trabajo, observamos niveles bajos de expresión de la gal-1 en los macrófagos de los pacientes asmáticos de forma significativa, en comparación con los donantes sanos. La importancia de los resultados de este trabajo es debido a que es el primer estudio que demuestra que la gal-1 posee un posible papel como molécula inmunorreguladora en el asma.

Las funciones antiinflamatorias de la gal-1 se han evaluado en diferentes modelos animales de inflamación crónica (192, 199, 200). Sin embargo, el papel de la gal-1 en el asma no ha sido todavía explorado. Datos publicados han destacado la capacidad de la gal-1 para inhibir la respuesta Th1 como Th17, a través de una serie de mecanismos antiinflamatorios, pero sin afectar a los linfocitos Th2 (191, 320).

Los numerosos efectos antiinflamatorios de la gal-1 incluyen la inducción de la IL-10 (321), la regulación negativa de la secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y el IFN- γ (196), la inhibición de la migración transendotelial así como la quimiotaxis de los neutrófilos (182). La interrupción de todos estos procesos podría contribuir a la respuesta inflamatoria exacerbada en un ambiente con defectos de expresión de esta lectina.

Al intentar descubrir el mecanismo por el cual la gal-1 actúa como molécula antiinflamatoria, analizamos la expresión de la gal-1 en células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos, observando un aumento de producción de la IL-10, sin encontrar ningún efecto inhibitorio sobre el TNF- α .

En nuestro trabajo demostramos que la gal-1 y la gal-9 inducen de forma significativa la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en las células mononucleares de sangre periférica de los 5 donantes estudiados. La gal-1 y la gal-9 son capaces de incrementar la

expresión de la IL-10 en las células mononucleares de sangre periférica inducida por LPS. Además en estas mismas células, las dos gal inducen la IL-10 en ausencia de estímulos adicionales, como el LPS. Por otro lado, se observó que la gal-1 es también capaz de producir IL-10 en LT periféricos inducidos con anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas.

Acorde con nuestros resultados, existen numerosos estudios en modelos animales, donde al administrar gal-1r disminuye la severidad de la enfermedad al disminuir las citoquinas proinflamatorias como es el IFN- γ y aumentar la síntesis de la IL-10 (200, 322). Asimismo, el grupo del Dr. Sánchez-Madrid ha publicado, recientemente, un trabajo donde demuestran que al bloquear la gal-1 se incrementa la producción del IFN- γ y se inhibe la secreción de la IL-10 en DCs derivadas de monocitos en cultivos celulares (323).

B. Galectina-3 actúa como molécula proinflamatoria

La gal-3 es la gal más estudiada en los procesos relacionados con el asma. Numerosos estudios la han descrito como una molécula que podría contribuir a la inflamación de la vía aérea y a la HRB (208, 209) *In vitro*, la gal-3 inhibe la expresión de la IL-5 en diferentes tipos celulares como los eosinófilos o las células T (206), a través de su unión al receptor de IgG de baja afinidad (CD32) (207).

En nuestro trabajo encontramos niveles bajos en la expresión del gen de la gal-3 en las muestras de esputo de pacientes asmáticos comparado con controles sanos; sin embargo, las diferencias en la expresión de la proteína de superficie no fueron estadísticamente significativas, posiblemente debido a la variabilidad de las muestras. Un único estudio, muy reciente, analiza la presencia de los ligandos de la gal-3 y de la gal-8 en el LBA de pacientes con asma leve y donantes sanos, observando diferencias significativas en el patrón de los ligandos entre los dos grupos. En el trabajo observan mayores niveles de expresión del ligando de la gal-8 y menores del ligando de la gal-3 en los pacientes asmáticos correlacionándose con la presencia de fibroblastos y eosinófilos (324). Los estudios que existen en la bibliografía para corroborar nuestros datos son contradictorios y, además, se presentan únicamente en modelos animales de asma inducido experimentalmente. Existen dos estudios que observan que, al administrar OVA para inducir asma, en un modelo de ratón deficiente para gal-3 (gal-3^{-/-}) desarrollaron una enfermedad menos severa, con una mejoría de las características asociadas a la remodelación, una disminución del número de células y de citoquinas Th2 y un aumento de las células Th1 en el LBA, así como menos inflamación en las biopsias de los ratones en comparación con el modelo WT (Gal-3^{+/+}) (208, 209). Por el contrario, dos trabajos consecutivos de un mismo grupo español estudiaron el papel de la gal-3 en un modelo animal de asma con inflamación aguda y crónica, observando que la administración de la gal-3 producía una inhibición de la inflamación de las vías aéreas, con disminución del número de células en el LBA, así como una mejoría de muchos parámetros asociados a la remodelación (210, 211).

La gal-3 actúa en la degranulación de los mastocitos produciendo una respuesta inflamatoria mantenida (325). Estos datos definen a la gal-3 como una proteína que puede contribuir a la respuesta inflamatoria exacerbada.

Extrapolar los resultados de estos estudios a nuestros datos es complicado, ya que en nuestro trabajo medimos la expresión de la gal-3 en esputo, mientras que estos estudios la analizan en el LBA, en la sangre y en las biopsias pulmonares de los ratones con asma inducido por OVA. La variabilidad de los pacientes, además de la que existe en este tipo de muestras, junto con el posterior procesamiento de las muestras para el análisis por las distintas técnicas inmunológicas, puede, en ocasiones, hacer que obtengamos resultados diferentes o no exactamente similares.

Nuestros resultados revelan que la gal-3 es capaz de reducir la expresión de la IL-12A en las células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos, inducidas por LPS, en cuatro de los cinco donantes estudiados. Acorde con nuestros resultados, los esplenocitos de ratones deficientes para gal-3 (gal-3^{-/-}) secretan más IL-12 comparado con los ratones WT con dermatitis atópica (326). Apoyando estos datos, también encontramos un estudio donde la deficiencia de gal-3 previene la hepatitis inducida por Concanavalina A en un modelo experimental, al observar una disminución de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4) e incrementos de la IL-10 en el hígado de los ratones gal-3^{-/-} comparados con los ratones WT (327) Los ratones gal-3^{-/-} con EAE presentan una enfermedad menos severa al secretar más IL-10, más IL-5, más IL-12 y menos IL-17 e IFN- γ que el modelo WT (221).

Por lo tanto, a la vista de los resultados en estos modelos, por su parte todos ellos experimentales, se puede definir a la gal-3 como una molécula proinflamatoria, a través de diferentes vías inmunológicas, según el modelo estudiado.

C. Galectina-9 actúa como molécula antiinflamatoria

Nuestros datos demuestran que los macrófagos de las muestras de EI de pacientes con asma presentan niveles bajos de expresión de la gal-9 en la membrana celular, sin embargo, los datos obtenidos por la técnica de la PCR semicuantitativa a tiempo real no muestran diferencias en la expresión del ARN. Las diferencias encontradas en nuestro estudio al analizar la expresión de esta gal en los pacientes asmáticos por las distintas técnicas inmunológicas pueden ser debidas a que la expresión de la gal-9 en la superficie celular corresponde principalmente a la producida por la propia célula, sin embargo, no se puede descartar que en cierta medida, la gal-9 detectada en macrófagos puede derivar de otras células vecinas. Además, la regulación postranscriptional de la gal-9 podría también afectar a tales diferencias.

Nuestros datos van a favor de que la gal-9 tiene funciones inmunosupresoras en nuestros pacientes asmáticos pero los estudios realizados en modelos experimentales de asma presentan datos contrapuestos en lo que respecta a la función de la gal-9. Estas discrepancias observadas pueden ser debidas al modo de inducir la inflamación en el animal. En un primer estudio, es un modelo de asma alérgico inducido por OVA, observan que el número de

linfocitos, eosinófilos y granulocitos gal-9 positivos, así como los niveles de citoquinas Th2 están aumentados en el LBA de ratones tratados con OVA comparados con el grupo control (233). Sin embargo en este otro estudio, la administración de gal-9 intranasal disminuyó la HRB y la inflamación de vías aéreas, así como la infiltración de células Th2 en un modelo de ratón de asma inducido por alérgeno inyectado peritonealmente (*Dermatophagoides farinae*) (238).

La gal-9 tiene una variedad de funciones biológicas pero la más conocida es la ser quimiotáctico de los eosinófilos (225). También, se ha descrito que la gal-9 tiene un papel como inductor de la apoptosis de las células Th1 (229, 235), por lo que es posible que la gal-9 juegue un papel importante en el desarrollo de la inflamación de la vía aérea alérgica al actuar como un atrayente de los eosinófilos y promover predominantemente la respuesta Th2. Esto se confirma en un trabajo realizado en un modelo de ratón de asma inducido por OVA, donde el bloqueo de TIM-3 (ligando de gal-9) tiene efectos beneficiosos hacia una respuesta Th1, sugiriendo un importante papel en la regulación de las enfermedades alérgicas (236).

En relación a los datos sobre la regulación de la gal-9, encontramos que esta gal reduce la expresión de la IL-12B en las células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos, inducidas por LPS, en cuatro de los cinco donantes estudiados. Sin embargo, la regulación de la IL-12 a través de la gal-9 se sustenta en datos controvertidos. Existen varios estudios que observan que la gal-9 actúa como molécula antiinflamatoria en varios modelos experimentales de enfermedades (AIC, daño pulmonar agudo y en una reacción inflamatoria inducida por LPS intraperitonealmente), ya que la administración de la gal-9 reduce las citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, como el TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-1 β , e incrementan las citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10 e IL-4 (227, 239, 328). En contraposición, un estudio previo *in vitro* demuestra que las DCs tratadas con gal-9 secretan más IL-12, pero no más IL-10, provocando una diferenciación hacia Th1 y no hacia Th2 por las células T CD4⁺ alogénicas (329), así como la producción de TNF- α (330). Este trabajo sugiere que la gal-9 juega un papel tanto en la respuesta innata, como en la adquirida por la maduración de las DCs, promocionando la respuesta Th1, a través de la IL-12 (329). La diferencia entre ambos estudios en lo que respecta a la metodología es importante, ya que en el primer caso se estudia el efecto de la gal-9 sobre citoquinas proinflamatorias en las células de sangre periférica, sin ser diferenciadas a DCs, en un modelo animal experimental, mientras que en el segundo caso, se trata de un modelo *in vitro* con DCs. Por otra parte, nuestros datos demuestran que la gal-9, al igual que la gal-1, es capaz de inducir la producción de IL-10 por células mononucleares de sangre periférica en los 5 donantes estudiados de forma significativa. Este fenómeno se observa de forma estadísticamente significativa, tanto en las células estimuladas con LPS, como en las células sin estímulos adicionales. Este efecto antiinflamatorio sobre la IL-10 apoya los datos previos obtenidos al inhibir la IL-12 por la gal-9. Existen estudios realizados en modelos animales que concuerdan con nuestros resultados como en el modelo de daño pulmonar agudo (239), en la miocarditis (331) o en la AIC (332).

Y finalmente, en nuestro trabajo, no existen diferencias significativas con la gal-1 y la gal-9 entre los distintos tratamientos de las células, observando un ligero aumento no

significativo de la expresión de la IL-1 β en las células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos estimuladas con LPS. Es conocido que la expresión de la gal-9 se regula positivamente a través del IFN- γ e IL-1 β (333-335). La IL-1 β , que es una citoquina esencialmente proinflamatoria (156, 157) y existen múltiples estudios en modelos animales que demuestran que la gal-1 y la gal-9 actúan modulando su expresión y de esta forma atenúan varias enfermedades (239, 332, 336). A diferencia de la gal-1 y de la gal-9, la gal-3 posee efectos proinflamatorios al observar que la ausencia de la gal-3 en los macrófagos de un modelo de ratón protege frente a la infección por *Rhodococcus equi* al observar niveles altos de IL-1 β e IL-6 en la sangre de los ratones (337). Estos trabajos anteriormente descritos, confirman el papel de la gal-1 y gal-9 como proteínas con acción antiinflamatoria, mientras que la gal-3 actúa como proteína proinflamatoria a través de la regulación de la IL-1 β , a pesar que nuestro trabajo en las células mononucleares de sangre periférica no confirman estos datos.

Mientras que los modelos animales son muy útiles para investigar el papel de las moléculas en las inmunopatogénesis de enfermedades inflamatorias, en muchas situaciones lo observado en los animales no se puede extrapolar a los humanos.

Hasta hace relativamente pocos años, el único método para investigar la inflamación de las vías aéreas era la historia clínica y la fibrobroncoscopia, con sus distintas técnicas como el LB, el LBA, las biopsias, los cepillados bronquiales y el broncoaspirado de secreciones. Estudios de parámetros inmunes en pacientes con asma podían verse obstaculizados por la importante restricción de obtener muestras de tejido pulmonar o LBA debido al riesgo y las contraindicaciones de obtener estas muestras. Sin embargo, desde hace unos años, diferentes autores han demostrado que los hallazgos obtenidos del EI pueden aportar información relevante en el estudio de las enfermedades respiratorias inflamatorias, correlacionándose adecuadamente con las muestras clásicas de los LBA (338, 339). Por lo tanto, el examen del EI puede ser de gran utilidad como método no invasivo, directo, válido y reproducible de obtener células de las vías aéreas respiratorias bajas (340) para medir la inflamación de los pacientes asmáticos, donde, concretamente, en nuestro trabajo hemos detectado niveles bajos de expresión de la gal-1 y de la gal-9, comparado con los sujetos sanos.

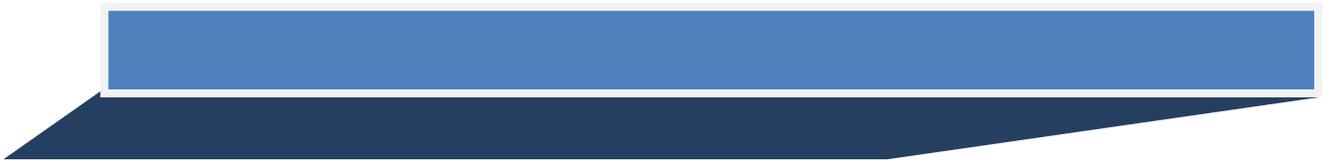
El balance de señales proinflamatorias y antiinflamatorias determina el resultado final de la respuesta inmune y los bajos niveles de expresión de la gal-1 y de la gal-9 en los pacientes asmáticos pueden contribuir a la respuesta inflamatoria presente en esta enfermedad.

VI. CONCLUSIONES



1. La inducción del esputo es un método no invasivo válido para obtener células viables del tracto respiratorio inferior en la evaluación de la inflamación que existe en enfermedades respiratorias inflamatorias.
2. Las células del esputo de pacientes asmáticos estables y controlados presentan niveles más bajos de expresión de la galectina 1 y galectina 9 junto con niveles altos de interleuquina 5 e interleuquina 13 comparado con las células del esputo de donantes sanos.
3. La baja expresión de galectina 1 y galectina 9 en las células de esputo de los pacientes asmáticos es independiente de la dosis de glucocorticoide inhalado, del hábito tabáquico y del estado atópico que presenta el paciente.
4. Existe una correlación inversa entre la inflamación eosinofílica medida por la fracción exhalada de óxido nítrico y los niveles de expresión de la galectina 9.
5. La galectina 1 y la galectina 9, pero no la galectina 3, son capaces de inducir la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 por las células mononucleares derivadas de sangre periférica de donantes sanos.
6. Los niveles bajos de expresión de las galectinas de los pacientes asmáticos pueden contribuir a la respuesta inflamatoria presente en esta enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFÍA



1. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469-78.
2. European Community Respiratory Health Survey. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J*. 1996;9(4):687-95.
3. Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 2):S466-72.
4. Yan DC, Ou LS, Tsai TL, Wu WF, Huang JL. Prevalence and severity of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema in 13- to 14-year-old children in Taipei, Taiwan. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005 Dec;95(6):579-85.
5. Ko FW, Wang HY, Wong GW, Leung TF, Hui DS, Chan DP, et al. Wheezing in Chinese schoolchildren: disease severity distribution and management practices, a community-based study in Hong Kong and Guangzhou. *Clin Exp Allergy*. 2005 Nov;35(11):1449-56.
6. Carvajal-Uruena I, Garcia-Marcos L, Busquets-Monge R, Morales Suarez-Varela M, Garcia de Andoin N, Batlles-Garrido J, et al. [Geographic variation in the prevalence of asthma symptoms in Spanish children and adolescents. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase 3, Spain]. *Arch Bronconeumol*. 2005 Dec;41(12):659-66.
7. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2012. Available at: <http://www.ginasthma.org>
8. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet*. 2002 Oct 26;360(9342):1313-22.
9. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):451-62; quiz 63-4.
10. Color Atlas of Immunology. Burmejer and Pezzuto Editors. Thieme editors. 2003.
11. Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry*. 1993 Aug 3;32(30):7644-9.
12. Frigeri LG, Liu FT. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *J Immunol*. 1992 Feb 1;148(3):861-7.
13. Platzter B, Ruitter F, van der Mee J, Fiebiger E. Soluble IgE receptors--elements of the IgE network. *Immunol Lett*. 2011 Dec 30;141(1):36-44.
14. Rosenwasser LJ. Mechanisms of IgE Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011 Apr;11(2):178-83.
15. Blink SE, Fu YX. IgE regulates T helper cell differentiation through Fc gamma RIII mediated dendritic cell cytokine modulation. *Cell Immunol*. 2010;264(1):54-60.
16. Balzar S, Strand M, Rhodes D, Wenzel SE. IgE expression pattern in lung: relation to systemic IgE and asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):855-62.
17. Crestani B. Endothelin could participate in the epithelial-mesenchymal transition of alveolar type II cells (AEC) in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Nov;37(5):624.

18. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 2002 May;19(5):879-85.
19. Moiseeva EP, Bradding P. Mast cells in lung inflammation. *Adv Exp Med Biol*. 2011;716:235-69.
20. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 May;105(5):847-59.
21. Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003 May;33(5):550-6.
22. Huber H, Koessler KK. The pathology of bronchial asthma. *Arch Intern Med Exp*. 1922;30:689-760.
23. Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):425-37.
24. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1720-45.
25. Petsky HL, Kynaston JA, Turner C, Li AM, Cates CJ, Lasserson TJ, et al. Tailored interventions based on sputum eosinophils versus clinical symptoms for asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(2):CD005603.
26. Dahl R, Venge P. Role of the eosinophil in bronchial asthma. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1982;122:23-8.
27. Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol*. 2004 Sep;25(9):477-82.
28. Williams TJ, Jose PJ. Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma. *Chem Immunol*. 2000;78:166-77.
29. Sehmi R, Dorman S, Baatjes A, Watson R, Foley R, Ying S, et al. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology*. 2003 Aug;109(4):536-46.
30. Robinson DS, Damia R, Zeibecoglou K, Molet S, North J, Yamada T, et al. CD34(+)/interleukin-5Ralpha messenger RNA+ cells in the bronchial mucosa in asthma: potential airway eosinophil progenitors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Jan;20(1):9-13.
31. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2009 Mar 5;360(10):973-84.
32. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med*. 2009 Mar 5;360(10):985-93.
33. Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 15;167(2):199-204.

34. Flood-Page P, Swenson C, Faiferman I, Matthews J, Williams M, Brannick L, et al. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Dec 1;176(11):1062-71.
35. Monteseirin J. Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(5):340-54.
36. Choi JS, Jang AS, Park JS, Park SW, Paik SH, Uh ST, et al. Role of neutrophils in persistent airway obstruction due to refractory asthma. *Respirology*. 2012 Feb;17(2):322-9.
37. Just J, Fournier L, Momas I, Zambetti C, Sahraoui F, Grimfeld A. Clinical significance of bronchoalveolar eosinophils in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jul;110(1):42-4.
38. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, et al. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis*. 1993 Sep;148(3):713-9.
39. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003 Dec;33(12):1622-8.
40. Maneechotesuwan K, Essilfie-Quaye S, Kharitonov SA, Adcock IM, Barnes PJ. Loss of control of asthma following inhaled corticosteroid withdrawal is associated with increased sputum interleukin-8 and neutrophils. *Chest*. 2007 Jul;132(1):98-105.
41. Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Jul;31(1):3-7.
42. Muller U, Piehler D, Stenzel W, Kohler G, Frey O, Held J, et al. Lack of IL-4 receptor expression on T helper cells reduces T helper 2 cell polyfunctionality and confers resistance in allergic bronchopulmonary mycosis. *Mucosal Immunol*. 2012 May;5(3):299-310.
43. Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, et al. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):913-20.
44. Oh K, Shen T, Le Gros G, Min B. Induction of Th2 type immunity in a mouse system reveals a novel immunoregulatory role of basophils. *Blood*. 2007 Apr 1;109(7):2921-7.
45. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*. 2008 Mar;9(3):310-8.
46. Dua B, Watson RM, Gauvreau GM, O'Byrne PM. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells in induced sputum after allergen inhalation in subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jul;126(1):133-9.
47. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. 2012 May;18(5):673-83.
48. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
49. Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):33-6.
50. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 2000 Jul 15;14(14):1693-711.
51. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89(4):587-96.

52. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992 Jan 30;326(5):298-304.
53. Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Nov;154(5):1497-504.
54. Afshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin Exp Allergy*. 2008 Dec;38(12):1847-57.
55. Mamessier E, Nieves A, Lorec AM, Dupuy P, Pinot D, Pinet C, et al. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy*. 2008 Sep;63(9):1202-10.
56. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):225-35.
57. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 2002 Jan 11;295(5553):336-8.
58. Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, Gibson U, Celniker A, Williams M, et al. The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*. 1995 Jan;95(1 Pt 1):133-5.
59. Kumar RK, Yang M, Herbert C, Foster PS. Interferon-gamma, pulmonary macrophages and airway responsiveness in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012 Aug 1;11(4):292-7.
60. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Mar;111(3):450-63; quiz 64.
61. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 May;119(5):1043-52; quiz 53-4.
62. Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:607-56.
63. Johnson JR, Swirski FK, Gajewska BU, Wiley RE, Fattouh R, Pacitto SR, et al. Divergent immune responses to house dust mite lead to distinct structural-functional phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Sep;293(3):L730-9.
64. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol*. 2008 Jun;20(3):288-94.
65. Dente FL, Carnevali S, Bartoli ML, Cianchetti S, Bacci E, Di Franco A, et al. Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006 Sep;97(3):312-20.
66. Riechelmann H, Deutsche T, Rozsasi A, Keck T, Polzehl D, Burner H. Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy*. 2005 Sep;35(9):1186-91.

67. Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Jul;31(1):62-8.
68. Steenwinckel V, Louahed J, Orabona C, Huaux F, Warnier G, McKenzie A, et al. IL-13 mediates in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):3244-51.
69. Shimbara A, Christodoulopoulos P, Soussi-Gounni A, Olivenstein R, Nakamura Y, Levitt RC, et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jan;105(1 Pt 1):108-15.
70. Humbert M, Durham SR, Kimmitt P, Powell N, Assoufi B, Pfister R, et al. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 May;99(5):657-65.
71. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004 Mar;4(2):123-31.
72. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998 Dec 18;282(5397):2258-61.
73. Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*. 2010 Feb 15;184(4):1663-74.
74. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):329-33.
75. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):337-48.
76. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006 Jun;24(6):677-88.
77. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, 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 Nov;6(11):1123-32.
78. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):345-50.
79. Stumhofer JS, Silver J, Hunter CA. Negative regulation of Th17 responses. *Semin Immunol*. 2007 Dec;19(6):394-9.
80. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89.
81. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*. 2002 Sep;17(3):375-87.

82. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006 Jul 1;177(1):566-73.
83. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med*. 2006 Aug 7;203(8):2009-19.
84. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):6852-8.
85. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009 Mar;10(3):314-24.
86. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):6117-24.
87. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Jan;28(1):42-50.
88. Laan M, Linden. IL-17 as a potential target for modulating airway neutrophilia. *Curr Pharm Des*. 2002;8(20):1855-61.
89. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Sep;108(3):430-8.
90. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1185-7.
91. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med*. 2003 Jun;97(6):726-33.
92. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009 Aug 27;361(9):888-98.
93. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2715-25.
94. Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):1105-16.
95. Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, et al. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J Exp Med*. 2008 Nov 24;205(12):2727-33.

96. Stock P, Lombardi V, Kohlrautz V, Akbari O. Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB. *J Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):5116-22.
97. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Nov 15;178(10):1023-32.
98. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):4089-97.
99. O'Byrne PM. Introduction: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest.* 2010 Aug;138(2 Suppl):1S-3S.
100. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005 Apr;6(4):345-52.
101. Maazi H, Shirinbak S, Willart M, Hammad HM, Cabanski M, Boon L, et al. Contribution of regulatory T cells to alleviation of experimental allergic asthma after specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2012 Oct;42(10):1519-28.
102. Xu W, Lan Q, Chen M, Chen H, Zhu N, Zhou X, et al. Adoptive transfer of induced-Treg cells effectively attenuates murine airway allergic inflammation. *PLoS One.* 2012;7(7):e40314.
103. Smyth LJ, Eustace A, Kolsum U, Blaikely J, Singh D. Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. *Chest.* 2010 Oct;138(4):905-12.
104. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med.* 2005 Dec 5;202(11):1539-47.
105. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):1024-32.
106. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):445-54.
107. Holgate ST, Wilson JR, Howarth PH. New insights into airway inflammation by endobronchial biopsy. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Feb;145(2 Pt 2):S2-6.
108. Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, Holgate ST, et al. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Aug;156(2 Pt 1):642-7.
109. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, et al. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Sep;17(3):326-33.
110. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int.* 2008 Mar;57(1):1-10.
111. Holgate ST. A look at the pathogenesis of asthma: the need for a change in direction. *Discov Med.* 2010 May;9(48):439-47.

112. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;120(6):1233-44; quiz 45-6.
113. Hamilton LM, Puddicombe SM, Dearman RJ, Kimber I, Sandstrom T, Wallin A, et al. Altered protein tyrosine phosphorylation in asthmatic bronchial epithelium. *Eur Respir J*. 2005 Jun;25(6):978-85.
114. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Feb;44(2):127-33.
115. McGee HS, Agrawal DK. TH2 cells in the pathogenesis of airway remodeling: regulatory T cells a plausible panacea for asthma. *Immunol Res*. 2006;35(3):219-32.
116. Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, Davies DE. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clin Sci (Lond)*. 2010 Apr;118(7):439-50.
117. Johnson JR, Roos A, Berg T, Nord M, Fuxe J. Chronic respiratory aeroallergen exposure in mice induces epithelial-mesenchymal transition in the large airways. *PLoS One*. 2011;6(1):e16175.
118. Holgate ST. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*. 2011 Jul;242(1):205-19.
119. Turner J, Jones CE. Regulation of mucin expression in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans*. 2009 Aug;37(Pt 4):877-81.
120. Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2007 Dec;19(6):676-80.
121. Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jul;3(5):434-9.
122. Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol*. 2007 Jul;85(5):348-56.
123. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5774-80.
124. Minshall E, Chakir J, Laviolette M, Molet S, Zhu Z, Olivenstein R, et al. IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):232-8.
125. Tang W, Geba GP, Zheng T, Ray P, Homer RJ, Kuhn C, 3rd, et al. Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. *J Clin Invest*. 1996 Dec 15;98(12):2845-53.
126. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):425-8.
127. Tanaka Y, Otsuka T, Hotokebuchi T, Miyahara H, Nakashima H, Kuga S, et al. Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm Res*. 1996 Jun;45(6):283-8.
128. Asadullah K, Docke WD, Sabat RV, Volk HD, Sterry W. The treatment of psoriasis with IL-10: rationale and review of the first clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 Jan;9(1):95-102.

129. Clark DN, Markham JL, Sloan CS, Poole BD. Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2012 Nov 12.
130. Bermudez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM, Burguete A, Madrid-Marina V. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest*. 2008 Dec;26(10):1037-43.
131. 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 May 18;101(20):7669-74.
132. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jun;278(6):G829-33.
133. Romagnani S. Atopic allergy and other hypersensitivities editorial overview: technological advances and new insights into pathogenesis prelude novel therapeutic strategies. *Curr Opin Immunol*. 1995 Dec;7(6):745-50.
134. Jung M, Sabat R, Kratzschmar J, Seidel H, Wolk K, Schonbein C, et al. Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur J Immunol*. 2004 Feb;34(2):481-93.
135. Faith A, Singh N, Farooque S, Dimeloe S, Richards DF, Lu H, et al. T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways. *Allergy*. 2012 Aug;67(8):1007-13.
136. Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, et al. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol*. 2008 Jun;20(6):791-800.
137. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):146-55.
138. Bellinghausen I, Knop J, Saloga J. The role of interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Oct;126(2):97-101.
139. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm*. 2001 Apr;10(2):51-9.
140. Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. Impaired IL-10-dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} natural regulatory T cells in human allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Nov 1;180(9):823-33.
141. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1767-73.
142. Barnes PJ. Cytokine modulators as novel therapies for asthma. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:81-98.
143. Hardaker EL, Bacon AM, Carlson K, Roshak AK, Foley JJ, Schmidt DB, et al. Regulation of TNF-alpha- and IFN-gamma-induced CXCL10 expression: participation of the

airway smooth muscle in the pulmonary inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):191-3.

144. Cataldo D, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM, et al. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 Nov;123(3):259-67.

145. Cundall M, Sun Y, Miranda C, Trudeau JB, Barnes S, Wenzel SE. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec;112(6):1064-71.

146. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989 Mar 11;1(8637):520-4.

147. Huang J, Olivenstein R, Taha R, Hamid Q, Ludwig M. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):725-9.

148. Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy*. 1997 Apr;27(4):363-71.

149. Karjalainen EM, Lindqvist A, Laitinen LA, Kava T, Altraja A, Halme M, et al. Airway inflammation and basement membrane tenascin in newly diagnosed atopic and nonatopic asthma. *Respir Med*. 2003 Sep;97(9):1045-51.

150. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J*. 2008 Jul;32(1):61-9.

151. McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S39-45.

152. Lal BK, Varma S, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, Duran WN. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res*. 2001 Nov;62(3):252-62.

153. Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev*. 2004 Dec;202:139-56.

154. Nguyen T, Wang R, Russell JH. IL-12 enhances IL-2 function by inducing CD25 expression through a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Immunol*. 2000 May;30(5):1445-52.

155. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996 Jun 27;334(26):1717-25.

156. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.

157. Dinarello CA. Blocking interleukin-1beta in acute and chronic autoinflammatory diseases. *J Intern Med*. 2011 Jan;269(1):16-28.

158. Feldmeyer L, Werner S, French LE, Beer HD. Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur J Cell Biol*. 2010 Sep;89(9):638-44.

159. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):679-91.
160. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy*. 2011 May;66(5):579-87.
161. Kearley J, Buckland KF, Mathie SA, Lloyd CM. Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 1;179(9):772-81.
162. Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol*. 2009 Oct 15;183(8):5094-103.
163. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*. 2001 Dec;15(6):985-95.
164. Wang YH, Angkasekwina P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1837-47.
165. Angkasekwina P, Park H, Wang YH, Chang SH, Corry DB, Liu YJ, et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med*. 2007 Jul 9;204(7):1509-17.
166. Letuve S, Lajoie-Kadoch S, Audusseau S, Rothenberg ME, Fiset PO, Ludwig MS, et al. IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Mar;117(3):590-6.
167. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol*. 2002 Jul 1;169(1):443-53.
168. Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, et al. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2330-40.
169. Ballantyne SJ, Barlow JL, Jolin HE, Nath P, Williams AS, Chung KF, et al. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;120(6):1324-31.
170. de la Fuente H, Cibrian D, Sanchez-Madrid F. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. *FEBS Lett*. 2012 Aug 31;586(18):2897-905.
171. Cooper D, Ilarregui JM, Pessoa SA, Croci DO, Perretti M, Rabinovich GA. Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. *Methods Enzymol*. 2010;480:199-244.
172. Vasta GR. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv Exp Med Biol*. 2012;946:21-36.
173. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol*. 2007 Oct;17(5):513-20.

174. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):338-52.
175. Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 Apr;136(4):385-400.
176. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):583-91.
177. Cho BK, Schodin BA, Kranz DM. Characterization of a single-chain antibody to the beta-chain of the T cell receptor. *J Biol Chem*. 1995 Oct 27;270(43):25819-26.
178. Auvynet C, Moreno S, Melchy E, Coronado-Martinez I, Montiel JL, Aguilar-Delfin I, et al. Galectin-1 promotes human neutrophil migration. *Glycobiology*. 2013 Jan;23(1):32-42.
179. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Jun;7(6):424-38.
180. Stowell SR, Karmakar S, Stowell CJ, Dias-Baruffi M, McEver RP, Cummings RD. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):219-27.
181. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2000 May;30(5):1331-9.
182. La M, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai K, et al. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol*. 2003 Oct;163(4):1505-15.
183. Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology*. 2003 Feb;13(2):119-28.
184. Rabinovich GA, Gruppi A. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol*. 2005 Apr;27(4):103-14.
185. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):3722-9.
186. Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol*. 1998 Aug;28(8):2311-9.
187. Rabinovich GA, Modesti NM, Castagna LF, Landa CA, Riera CM, Sotomayor CE. Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a beta-galactoside-binding lectin. *J Biochem*. 1997 Aug;122(2):365-73.
188. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 1995 Dec 14;378(6558):736-9.
189. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol*. 1998 May 15;160(10):4831-40.

190. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002 Jun;23(6):313-20.
191. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol.* 2007 Aug;8(8):825-34.
192. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol.* 2009 Sep;10(9):981-91.
193. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):2058-65.
194. Rabinovich G, Castagna L, Landa C, Riera CM, Sotomayor C. Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages. *J Leukoc Biol.* 1996 Mar;59(3):363-70.
195. Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenbark AA. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1990 Jul;28(2):177-84.
196. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med.* 1999 Aug 2;190(3):385-98.
197. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2000 Feb;31(2):399-406.
198. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003 May;124(5):1381-94.
199. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol.* 2006 May 15;176(10):6323-32.
200. Perone MJ, Bertera S, Shufesky WJ, Divito SJ, Montecalvo A, Mathers AR, et al. Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):2641-53.
201. Delbrouck C, Doyen I, Belot N, Decaestecker C, Ghanooni R, de Lavareille A, et al. Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Lab Invest.* 2002 Feb;82(2):147-58.
202. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR, Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol.* 1995 Oct;147(4):1016-28.

203. Chung AW, Sieling PA, Schenk M, Teles RM, Krutzik SR, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *J Infect Dis.* 2012 Dec 18.
204. van Stijn CM, van den Broek M, van de Weerd R, Visser M, Tasdelen I, Tefsens B, et al. Regulation of expression and secretion of galectin-3 in human monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol.* 2009 Oct;46(16):3292-9.
205. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev.* 2009 Jul;230(1):160-71.
206. Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, et al. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol.* 1998 Jul 1;161(1):385-9.
207. Cortegano I, Pozo V, Cardaba B, Arrieta I, Gallardo S, Rojo M, et al. Interaction between galectin-3 and FcγRII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII. *Glycobiology.* 2000 Mar;10(3):237-42.
208. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, et al. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol.* 2004 Dec;165(6):2045-53.
209. Ge XN, Bahaie NS, Kang BN, Hosseinkhani MR, Ha SG, Frenzel EM, et al. Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):1205-14.
210. del Pozo V, Rojo M, Rubio ML, Cortegano I, Cardaba B, Gallardo S, et al. Gene therapy with galectin-3 inhibits bronchial obstruction and inflammation in antigen-challenged rats through interleukin-5 gene downregulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Sep 1;166(5):732-7.
211. Lopez E, del Pozo V, Miguel T, Sastre B, Seoane C, Civantos E, et al. Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1943-50.
212. Lopez E, Zafra MP, Sastre B, Gamez C, Lahoz C, del Pozo V. Gene expression profiling in lungs of chronic asthmatic mice treated with galectin-3: downregulation of inflammatory and regulatory genes. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:823279.
213. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):778-89.
214. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, et al. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol.* 2008 Mar 1;180(5):3091-102.
215. Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wang RF. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res.* 2008 Sep 1;68(17):7228-36.
216. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 25;93(13):6737-42.

217. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 1997 Dec 1;57(23):5272-6.
218. Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett.* 2000 May 19;473(3):311-5.
219. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):1073-83.
220. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol.* 2000 Aug 15;165(4):2156-64.
221. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009 Jan 15;182(2):1167-73.
222. La Porta CA, Comolli R. Different levels of TGFbeta, IL-10, IFNgamma and gelatinase A occur in experimental white and black metastases induced by bryostatin 1 or by phorbol ester-treated BL6T murine melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(5):361-9.
223. Matsumoto R, Hirashima M, Kita H, Gleich GJ. Biological activities of ecalectin: a novel eosinophil-activating factor. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):1961-7.
224. Saita N, Goto E, Yamamoto T, Cho I, Tsumori K, Kohrogi H, et al. Association of galectin-9 with eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 May;128(1):42-50.
225. Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1998 Jul 3;273(27):16976-84.
226. Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem.* 1997 Feb 28;272(9):6078-86.
227. Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol.* 2008 Apr;127(1):78-88.
228. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, et al. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. *Clin Immunol.* 2012 Apr;143(1):51-8.
229. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1245-52.
230. Chou FC, Shieh SJ, Sytwu HK. Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol.* 2009 Sep;39(9):2403-11.

231. Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2006 Jun 12;203(6):1413-8.
232. Niwa H, Satoh T, Matsushima Y, Hosoya K, Saeki K, Niki T, et al. Stable form of galectin-9, a Tim-3 ligand, inhibits contact hypersensitivity and psoriatic reactions: a potent therapeutic tool for Th1- and/or Th17-mediated skin inflammation. *Clin Immunol*. 2009 Aug;132(2):184-94.
233. Sziksz E, Kozma GT, Pallinger E, Komlosi ZI, Adori C, Kovacs L, et al. Galectin-9 in allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(4):308-17.
234. Wang F, He W, Yuan J, Wu K, Zhou H, Zhang W, et al. Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts. *Transpl Immunol*. 2008 Apr;19(1):12-9.
235. Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, et al. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol*. 2003 Apr 1;170(7):3631-6.
236. Kearley J, McMillan SJ, Lloyd CM. Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody in vivo. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1289-94.
237. Yamamoto H, Kashio Y, Shoji H, Shinonaga R, Yoshimura T, Nishi N, et al. Involvement of galectin-9 in guinea pig allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143 Suppl 1:95-105.
238. Katoh S, Ishii N, Nobumoto A, Takeshita K, Dai SY, Shinonaga R, et al. Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jul 1;176(1):27-35.
239. Kojima K, Arikawa T, Saita N, Goto E, Tsumura S, Tanaka R, et al. Galectin-9 attenuates acute lung injury by expanding CD14- plasmacytoid dendritic cell-like macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Aug 1;184(3):328-39.
240. Katoh S, Nobumoto A, Matsumoto N, Matsumoto K, Ehara N, Niki T, et al. Involvement of galectin-9 in lung eosinophilia in patients with eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(3):294-302.
241. Katoh S, Oomizu S, Niki T, Shimizu H, Obase Y, Korenaga M, et al. Possible regulatory role of galectin-9 on *Ascaris suum*-induced eosinophilic lung inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158 Suppl 1:58-65.
242. Ohbayashi H. [The small airway inflammation of asthmatic patients who have used dry powder type inhaled steroid for moderate-long term evaluated by induced sputum and the efficacy of HFA-BDP (QVAR) inhalation]. *Arerugi*. 2005 Jan;54(1):24-35.
243. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Dec;140(6):1745-53.
244. Jeffery PK. Bronchial biopsies and airway inflammation. *Eur Respir J*. 1996 Aug;9(8):1583-7.

245. Van Vyve T, Chanez P, Bousquet J, Lacoste JY, Michel FB, Godard P. Safety of bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in patients with asthma of variable severity. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jul;146(1):116-21.
246. Djukanovic R, Wilson JW, Lai CK, Holgate ST, Howarth PH. The safety aspects of fiberoptic bronchoscopy, bronchoalveolar lavage, and endobronchial biopsy in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Apr;143(4 Pt 1):772-7.
247. Galdiz Iturri J. Methods for evaluating airway inflammation. *Arch Bronconeumol*. 2004;40(supl 6):23-6.
248. Yue WY, Cohen SS. Sputum induction by newer inhalation methods in patients with pulmonary tuberculosis. *Dis Chest*. 1967 Jun;51(6):614-20.
249. Luce JM. Sputum induction in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Apr;133(4):513-4.
250. Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM, Mattoli S, Kay JM, Dolovich J, et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax*. 1989 Sep;44(9):693-9.
251. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992 Jan;47(1):25-9.
252. Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, Dolovich J, Powers P, Hargreave FE. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy*. 1994 Aug;24(8):778-83.
253. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993 May;147(5):1126-31.
254. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:1s-2s.
255. Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J*. 2000 Aug;16(2):355-9.
256. Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*. 2000 Jul;16(1):150-8.
257. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.
258. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):1172-4.
259. Fabbri LM, Durham S, Holgate ST, O'Byrne PM, Postma DS. Assessment of airway inflammation: an overview. *Eur Respir J Suppl*. 1998 Mar;26:6S-8S.
260. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J*. 1995 Apr;8(4):559-65.

261. Belda J, Hussack P, Dolovich M, Efthimiadis A, Hargreave FE. Sputum induction: effect of nebulizer output and inhalation time on cell counts and fluid-phase measures. *Clin Exp Allergy*. 2001 Nov;31(11):1740-4.
262. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:19s-23s.
263. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*. 1996 Jun;9(6):1174-80.
264. Louis R, Shute J, Goldring K, Perks B, Lau LC, Radermecker M, et al. The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum. *Eur Respir J*. 1999 Mar;13(3):660-7.
265. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May;155(5):1501-8.
266. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Feb;155(2):449-53.
267. Hansel TT. The cardinal importance of sputum microscopy. *Clin Exp Allergy*. 1994 Aug;24(8):695-7.
268. Chodosh S, Zaccheo CW, Segal MS. The cytology and histochemistry of sputum cells. I. Preliminary differential counts in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis*. 1962 May;85:635-48.
269. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 Nov 30;360(9347):1715-21.
270. Chlumsky J, Striz I, Terl M, Vondracek J. Strategy aimed at reduction of sputum eosinophils decreases exacerbation rate in patients with asthma. *J Int Med Res*. 2006 Mar-Apr;34(2):129-39.
271. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002 Oct;57(10):875-9.
272. Kulkarni NS, Hollins F, Sutcliffe A, Saunders R, Shah S, Siddiqui S, et al. Eosinophil protein in airway macrophages: a novel biomarker of eosinophilic inflammation in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jul;126(1):61-9 e3.
273. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):64-72.
274. Hadjicharalambous C, Dent G, May RD, Handy RL, Anderson IK, Davies DE, et al. Measurement of eotaxin (CCL11) in induced sputum supernatants: validation and detection in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Apr;113(4):657-62.
275. Kelly MM, Keatings V, Leigh R, Peterson C, Shute J, Venge P, et al. Analysis of fluid-phase mediators. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:24s-39s.

276. Erin EM, Jenkins GR, Kon OM, Zacharasiewicz AS, Nicholson GC, Neighbour H, et al. Optimized dialysis and protease inhibition of sputum dithiothreitol supernatants. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Jan 15;177(2):132-41.
277. Economidou F, Samara KD, Antoniou KM, Siafakas NM. Induced sputum in interstitial lung diseases: novel insights in the diagnosis, evaluation and research. *Respiration.* 2009;77(3):351-8.
278. Bellido-Casado J, Plaza V, Diaz C, Geli C, Dominguez J, Margarit G, et al. Bronchial inflammation, respiratory symptoms and lung function in Primary Sjogren's syndrome. *Arch Bronconeumol.* 2011 Jul;47(7):330-4.
279. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Neutrophilic inflammation in induced sputum of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2003 Jun;20(2):138-43.
280. Prieto L. [Induced sputum as a method for the study of bronchial inflammation]. *Arch Bronconeumol.* 2011 Jul;47(7):323-4.
281. Parameswaran K, Hargreave FE. The use of sputum cell counts to evaluate asthma medications. *Br J Clin Pharmacol.* 2001 Aug;52(2):121-8.
282. Parameswaran K. Treatment strategy for asthma: one for all and all for one? *Chest.* 2006 Feb;129(2):221-3.
283. Gronke L, Kanniess F, Holz O, Jorres RA, Magnussen H. The relationship between airway hyper-responsiveness, markers of inflammation and lung function depends on the duration of the asthmatic disease. *Clin Exp Allergy.* 2002 Jan;32(1):57-63.
284. in't Veen JC, Smits HH, Hiemstra PS, Zwinderman AE, Sterk PJ, Bel EH. Lung function and sputum characteristics of patients with severe asthma during an induced exacerbation by double-blind steroid withdrawal. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jul;160(1):93-9.
285. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J Suppl.* 2002 Sep;37:40s-3s.
286. Sampson AP, Pizzichini E, Bisgaard H. Effects of cysteinyl leukotrienes and leukotriene receptor antagonists on markers of inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jan;111(1 Suppl):S49-59; discussion S-61.
287. Anees W, Huggins V, Pavord ID, Robertson AS, Burge PS. Occupational asthma due to low molecular weight agents: eosinophilic and non-eosinophilic variants. *Thorax.* 2002 Mar;57(3):231-6.
288. Parameswaran K, Anvari M, Efthimiadis A, Kamada D, Hargreave FE, Allen CJ. Lipid-laden macrophages in induced sputum are a marker of oropharyngeal reflux and possible gastric aspiration. *Eur Respir J.* 2000 Dec;16(6):1119-22.
289. Leigh R, Sharon RF, Efthimiadis A, Hargreave FE, Kitching AD. Diagnosis of left-ventricular dysfunction from induced sputum examination. *Lancet.* 1999 Sep 4;354(9181):833-4.
290. Wong AG, Pavord ID, Sears MR, Hargreave FE. A case for serial examination of sputum inflammatory cells. *Eur Respir J.* 1996 Oct;9(10):2174-5.

291. Hargreave FE, Leigh R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S53-7.
292. Brightling CE. Chronic cough due to nonasthmatic eosinophilic bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2006 Jan;129(1 Suppl):116S-21S.
293. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:3s-8s.
294. GINA Guidelines: Global Initiative for Asthma. A Pocket guide for Physicians and Nurses. NHLBI/WHO workshop. <http://www.ginaasthma.com.2003>.
295. Sanchís J. Normativa para la espirometría forzada. *Arch Bronconeumol* 1989;25:132-42.
296. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;152(1107-1136).
297. Quanjer PH TG, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 6 (Suppl 16): 5s-40s. .
298. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, et al. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jan;113(1):59-65.
299. Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Lopez A, del Mar Abad M, Paz Bouza JI, et al. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1995;221:145-52.
300. Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:495-516.
301. American Thoracic Society Committee on Diagnostic Standards for Non-tuberculosis Disease. Definitions and clarification of chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1962;85(762-769).
302. Sastre B, Fernandez-Nieto M, Molla R, Lopez E, Lahoz C, Sastre J, et al. Increased prostaglandin E2 levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy*. 2008 Jan;63(1):58-66.
303. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Hillege HL, et al. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med*. 2012 Jul;272(1):55-64.
304. Pilette C, Colinet B, Kiss R, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, et al. Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *Eur Respir J*. 2007 May;29(5):914-22.
305. de Kivit S, Saeland E, Kraneveld AD, van de Kant HJ, Schouten B, van Esch BC, et al. Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans. *Allergy*. 2012 Mar;67(3):343-52.

306. Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Okumura K, et al. Roles of galectin-9 in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(1):36-43.
307. Gong YB, Huang YF, Li Y, Han GC, Li YR, Wang DJ, et al. Experimental study of the mechanism of tolerance induction in dexamethasone-treated dendritic cells. *Med Sci Monit*. 2011 May;17(5):BR125-31.
308. Maldonado CA, Sundblad V, Salatino M, Elia J, Garcia LN, Leimgruber C, et al. Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages. *Histol Histopathol*. 2011 Jun;26(6):747-59.
309. Vlachos-Mayer H, Leigh R, Sharon RF, Hussack P, Hargreave FE. Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *Eur Respir J*. 2000 Nov;16(5):997-1000.
310. Bryborn M, Hallden C, Sall T, Cardell LO. CLC- a novel susceptibility gene for allergic rhinitis? *Allergy*. 2010 Feb;65(2):220-8.
311. Devouassoux G, Pachot A, Laforest L, Diasparra J, Freymond N, Van Ganse E, et al. Galectin-10 mRNA is overexpressed in peripheral blood of aspirin-induced asthma. *Allergy*. 2008 Jan;63(1):125-31.
312. De Re V, Simula MP, Cannizzaro R, Pavan A, De Zorzi MA, Toffoli G, et al. Galectin-10, eosinophils, and celiac disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1173:357-64.
313. Chua JC, Douglass JA, Gillman A, O'Hehir RE, Meeusen EN. Galectin-10, a potential biomarker of eosinophilic airway inflammation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42549.
314. Gratziau C, Carroll M, Walls A, Howarth PH, Holgate ST. Early changes in T lymphocytes recovered by bronchoalveolar lavage after local allergen challenge of asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jun;145(6):1259-64.
315. Mengelers HJ, Maikoe T, Brinkman L, Hooibrink B, Lammers JW, Koenderman L. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Feb;149(2 Pt 1):345-51.
316. Kidney JC, Wong AG, Efthimiadis A, Morris MM, Sears MR, Dolovich J, et al. Elevated B cells in sputum of asthmatics. Close correlation with eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Feb;153(2):540-4.
317. Vidal S, Bellido-Casado J, Granel C, Crespo A, Plaza V, Juarez C. Flow cytometry analysis of leukocytes in induced sputum from asthmatic patients. *Immunobiology*. 2012 Jul;217(7):692-7.
318. Gelder CM, Thomas PS, Yates DH, Adcock IM, Morrison JF, Barnes PJ. Cytokine expression in normal, atopic, and asthmatic subjects using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction. *Thorax*. 1995 Oct;50(10):1033-7.
319. Sohn SW, Lee HS, Park HW, Chang YS, Kim YK, Cho SH, et al. Evaluation of cytokine mRNA in induced sputum from patients with allergic rhinitis: relationship to airway hyperresponsiveness. *Allergy*. 2008 Mar;63(3):268-73.
320. Gomez-Tourino I, Sanchez-Espinel C, Hernandez-Fernandez A, Gonzalez-Fernandez A, Pena-Gonzalez E, Rodriguez J, et al. Galectin-1 synthesis in type 1 diabetes by different

- immune cell types: reduced synthesis by monocytes and Th1 cells. *Cell Immunol.* 2011;271(2):319-28.
321. van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T, Harms G, van Goor H, Zwiers P, et al. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J Pathol.* 2004 Dec;204(5):511-8.
322. Rajasagi NK, Suryawanshi A, Sehrawat S, Reddy PB, Mulik S, Hirashima M, et al. Galectin-1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunopathological lesions. *J Immunol.* 2012 May 1;188(9):4631-43.
323. de la Fuente H, Perez-Gala S, Bonay P, Cruz-Adalia A, Cibrian D, Sanchez-Cuellar S, et al. Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *J Pathol.* 2012 Oct;228(2):193-203.
324. Cederfur C, Malmstrom J, Nihlberg K, Block M, Breimer ME, Bjermer L, et al. Glycoproteomic identification of galectin-3 and -8 ligands in bronchoalveolar lavage of mild asthmatics and healthy subjects. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep;1820(9):1429-36.
325. Chen H, George I, Tyorkin M, Salik E, Sperber K. Retraction: Chronically HIV-1-infected monocytic cells induce apoptosis in cocultured T cells. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177(9):6560.
326. Saegusa J, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Fermin A, Fung MA, et al. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol.* 2009 Mar;174(3):922-31.
327. Volarevic V, Milovanovic M, Lujic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2012 Jun;55(6):1954-64.
328. Tsuboi Y, Abe H, Nakagawa R, Oomizu S, Watanabe K, Nishi N, et al. Galectin-9 protects mice from the Shwartzman reaction by attracting prostaglandin E2-producing polymorphonuclear leukocytes. *Clin Immunol.* 2007 Aug;124(2):221-33.
329. Dai SY, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, et al. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2005 Sep 1;175(5):2974-81.
330. Kanzaki M, Wada J, Sugiyama K, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, et al. Galectin-9 and T cell immunoglobulin mucin-3 pathway is a therapeutic target for type 1 diabetes. *Endocrinology.* 2012 Feb;153(2):612-20.
331. Lv K, Xu W, Wang C, Niki T, Hirashima M, Xiong S. Galectin-9 administration ameliorates CVB3 induced myocarditis by promoting the proliferation of regulatory T cells and alternatively activated Th2 cells. *Clin Immunol.* 2011 Jul;140(1):92-101.
332. Arikawa T, Watanabe K, Seki M, Matsukawa A, Oomizu S, Sakata KM, et al. Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating Fc gamma R expression on macrophages. *Clin Immunol.* 2009 Dec;133(3):382-92.
333. Asakura H, Kashio Y, Nakamura K, Seki M, Dai S, Shirato Y, et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5912-8.

334. Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, Kurotaki H, Mori F, Seki M, et al. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 2002 Sep;72(3):486-91.
335. Yoshida H, Imaizumi T, Kumagai M, Kimura K, Satoh C, Hanada N, et al. Interleukin-1beta stimulates galectin-9 expression in human astrocytes. *Neuroreport.* 2001 Dec 4;12(17):3755-8.
336. Qu WS, Wang YH, Ma JF, Tian DS, Zhang Q, Pan DJ, et al. Galectin-1 attenuates astrogliosis-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2011 Jan;116(2):217-26.
337. Ferraz LC, Bernardes ES, Oliveira AF, Ruas LP, Fermino ML, Soares SG, et al. Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection. *Eur J Immunol.* 2008 Oct;38(10):2762-75.
338. Fahy JV, Wong H, Liu J, Boushey HA. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Jul;152(1):53-8.
339. Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J.* 1998 Apr;11(4):828-34.
340. van den Berg JW, Kerstjens H, Postma D, van der Bij W, Koeter G. Sputum induction in research: beware of the beast. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Nov 15;168(10):1253.

VIII. CLAVES DE LAS ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

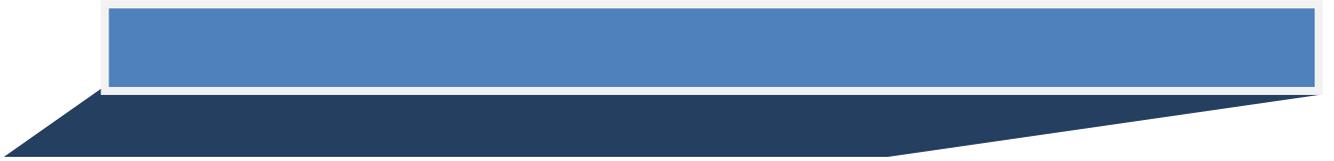


Abreviaturas utilizadas

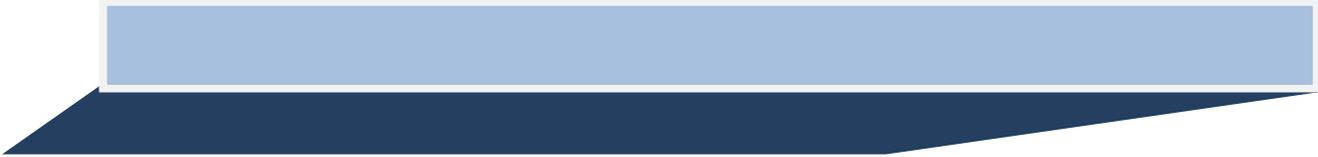
Algunas de las abreviaturas corresponden a definiciones en inglés y se han mantenido para conservar la nomenclatura estándar

- **ABPA**: Aspergilosis broncopulmonar alérgica
- **ACT**: *Asma Control Test*
- **AIC**: Artritis Inducida por Colágeno
- **ADN**: Ácido desoxirribonucleico
- **APC**: Aloficocianina
- **ARNm**: Ácido ribonucleico mensajero
- **ATS**: *American Thoracic Society*
- **CAE**: Condensado de aire exhalado
- **CMH**: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- **CPA**: Células presentadoras de antígeno
- **CT**: Ciclo umbral
- **DAG**: *Donkey anti mouse*
- **DC**: *Dendritic Cell*
- **DTT**: Ditiotreitól
- **DRC**: Dominio de Reconocimiento de carbohidratos
- **EAE**: Encefalitis Autoinmune Experimental
- **EI**: Espujo Inducido
- **EPOC**: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
- **ERS**: *European Respiratory Society*
- **FE_{NO}**: Fracción Exhalada de Óxido Nítrico
- **FEV₁**: Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo
- **FITC**: Isocianato de fluoresceína
- **FVC**: Capacidad Vital Forzada
- **GAM**: *Goat anti Mouse*
- **Gal**: Galectinas
- **Gal-1**: Galectina 1
- **Gal-1r**: Galectina 1 recombinante
- **Gal-3**: Galectina 3
- **Gal-9**: Galectina 9
- **GCI**: Glucorticoide inhalado
- **HRB**: Hiperreactividad Bronquial
- **IFI**: Inmunofluorescencia indirecta
- **IFN- γ** : Interferón gamma
- **Ig**: Inmunoglobulina
- **Ig E**: Inmunoglobulina E
- **IL**: Interleuquina
- **IPA**: Índice de paquetes-años
- **LB**: Lavado Bronquial
- **LBA**: Lavado Broncoalveolar
- **LPS**: Lipopolisacáridos
- **LT**: Linfocitos T
- **MMP**: Metaloproteínasa de la matriz
- **mL**: Mililitros
- **mg**: Microgramos
- μ **L**: Microlitros
- **NO**: Óxido nítrico
- **OCFA**: Obstrucción crónica al flujo aéreo
- **OVA**: Ovoalbúmina
- **PBL**: *Peripheral Blood Lymphocytes*
- **PE**: Ficoeritrina
- **PB**: *Pacific Blue*
- **PBMC**: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
- **PO**: *Pacific Orange*
- **RCD**: Recuento celular diferencial
- **RCT**: Recuento celular total
- **RCP**: Reacción de la cadena de la polimerasa
- **RPM**: Revoluciones por minuto
- **RT-PCR**: *Real-Time Polymerase chain reaction*
- **TGF- β** : *Transforming growth factor beta*
- **Linfocitos Th**: Linfocitos T *helper*
- **TNF- α** : *Tumor Necrosis Factor alfa*
- **VEGF**: *Vascular Endothelial Growth Factor*
- **WT**: *Wildtype*
- **7-AAD**: 7 amino-actinomicina D

IX. ANEXOS



ANEXO-I



- Consentimiento informado de la técnica de Inducción de Esputo
- Protocolo de la técnica de Inducción de Esputo
- Hoja de análisis de la muestra de esputo
- Hoja de información a los pacientes
- Aprobación del estudio por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC)
- Cuestionario Asma Control Test (ACT)
- Clasificación de la GINA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PRUEBA DE INDUCCIÓN DE ESPUTO

Yo,

.....

confirmo que el Dr/a

me ha explicado esta prueba y la ha discutido conmigo. Así,

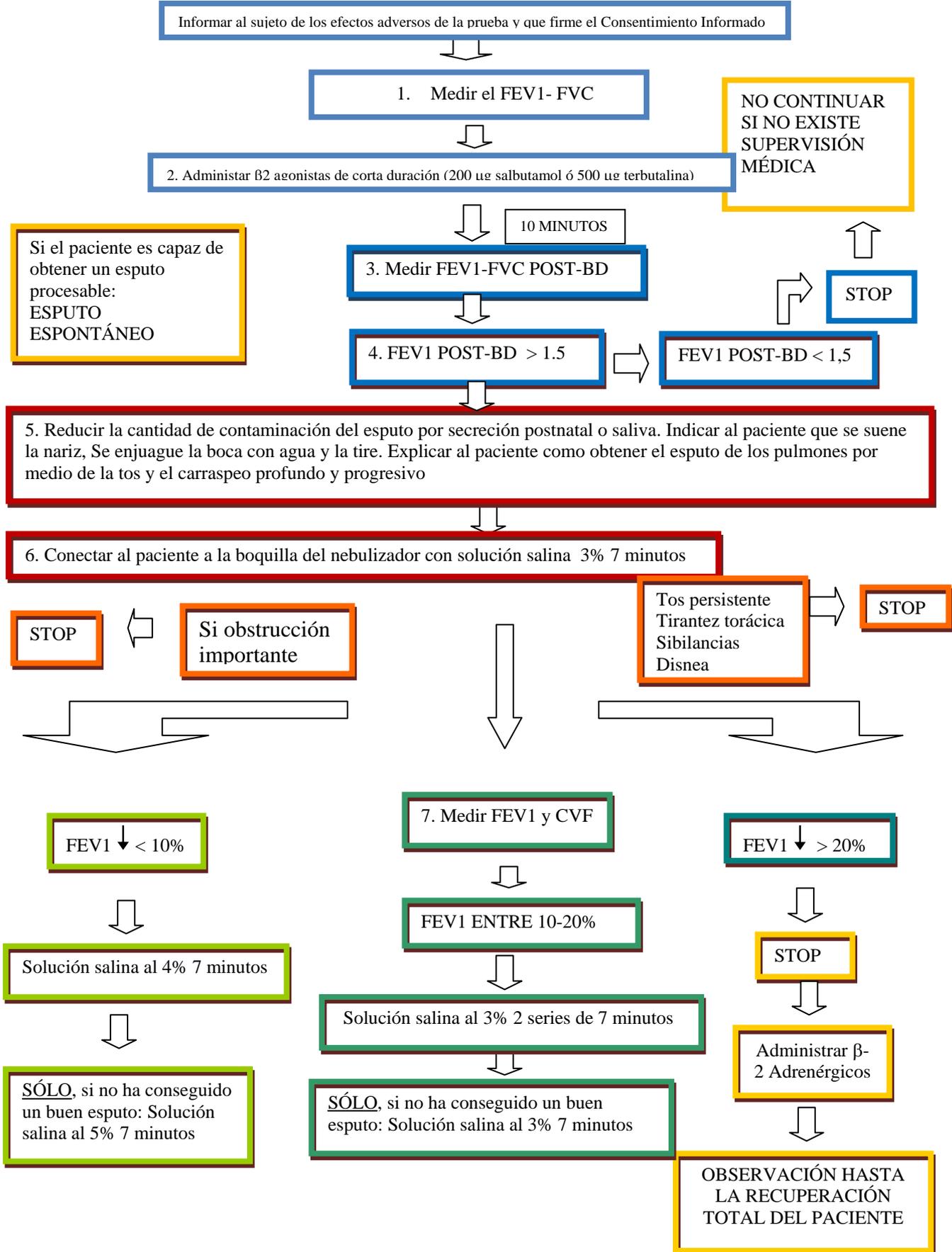
1. Entiendo que con esta prueba se va a estudiar la inflamación de mis bronquios. Esto proporcionará a mi médico una información útil para mejorar el manejo de mi enfermedad.
2. Para esta prueba vendré al laboratorio de Pruebas Funcionales respiratorias (Planta 3^a). El día de la prueba no deberé utilizar la medicación broncodilatadora de corta ó de larga acción ni teofilinas orales desde la mañana del día previo a la prueba (salvo causa mayor).
3. Si he padecido un resfriado, catarro o proceso gripal en las tres semanas previas a la prueba lo avisaré al personal técnico de la clínica.
4. La prueba de inducción del esputo es un procedimiento rutinario para el diagnóstico y seguimiento del asma. Durante la prueba se le pedirá que inhale un aerosol con una solución salina en concentraciones crecientes. Esta solución podría producir un estrechamiento temporal y controlado de mis bronquios. Por este motivo y entre cada concentración de solución salina, se medirá mi capacidad pulmonar y la prueba se parará cuando esta se reduzca en más de un 20%.
5. Entiendo que este procedimiento, es usado de forma rutinaria en el laboratorio sin que suponga ningún riesgo apreciable para mi salud. La prueba de inducción del esputo puede causar molestias ligeras como tos, irritación de la garganta o sabor salado que ceden al acabar la prueba. Estos síntomas desaparecen rápidamente y revierten con el uso de un broncodilatador inhalado (Ventolin o Terbasmin).
6. Entiendo que la realización de esta prueba se realiza bajo mi consentimiento y que puedo declinar el realizarla en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Esto no va a perjudicar mi futuro tratamiento de forma alguna.
7. Si necesitase cualquier otra explicación me pondré en contacto con el personal del Servicio de Neumología llamando al teléfono 91-520-22-77.
8. Por lo tanto, acepto voluntariamente realizar la prueba.

Madrid a

de 2010.



TÉCNICA DE INDUCCIÓN DEL ESPUTO





ANÁLISIS DEL ESPUTO INDUCIDO-

FECHA:

NÚMERO ESPUTO:

HISTORIA CLÍNICA:

NHC:
NOMBRE Y APELLIDOS:
EDAD:

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA:

PESO:

RECuento CELULAR VIABILIDAD:

C.VIVAS (V):

C.MUERTAS:

C.ESCAMOSAS (CE):

%CE (CE/E X 100):

TOTAL (E):

RECuento CELULAR TOTAL (E-CE) :

VIABILIDAD (V/RCT X 100) :

CONCENTRACIÓN CELULAS/ 1mL:

CÉLULAS

CÉLULAS TOTALES

% CÉLULAS

NEUTRÓFILOS

MACRÓFAGOS

MONOCITOS

EOSINOFILOS

LINFOCITOS

BASÓFILOS

CÉLULAS EPITELIALES

TOTAL

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN CONTROLES

Estimado Sr./Sra:

Queremos invitarle a participar en un estudio de investigación en el que tratamos de averiguar si las galectinas, moléculas inmunorreguladoras en modelo de asma animal, actúan en la regulación del sistema inmune de pacientes asmáticos.

Rogamos que lea con atención estas páginas antes de decidir participar o no y recuerde que su participación es totalmente voluntaria y que puede retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que justificar sus decisiones.

Información sobre el estudio

Se trata de un trabajo de investigación en el que está previsto que participen entre 30 y 40 pacientes, incluyendo pacientes asmáticos controlados y voluntarios sanos. A todos los participantes se les realizará la técnica de inducción de esputo, para poder así obtener una muestra de origen bronquial. El esputo está compuesto, fundamentalmente, por células que se encuentran inmersas en una trama de glicoproteínas, donde también quedan retenidas muchas sustancias incluyendo tanto productos celulares como extracelulares. Todo ello forma un microambiente muy particular que refleja lo que sucede a nivel bronquial.

Tras realizar esta prueba, la muestra se procesará para el estudio de marcadores celulares y moléculas de inflamación.

El objetivo de este estudio es determinar los niveles de expresión de galectina 1; galectina 3 y galectina 9 en el esputo inducido de pacientes adultos con diagnóstico de asma en comparación con controles sanos mediante RT-PCR y citometría de flujo.

El estudio de las galectinas en pacientes asmáticos, únicamente descrito en modelo animal, puede ser una futura diana terapéutica en dichos pacientes, debido a su poder de regular las principales interleucinas que actúan en el asma.

Procedimientos del estudio

Durante el estudio al paciente se le recogerá una muestra de esputo inducido, a través de un nebulizador ultrasónico con suero salino hipertónico al 3%, 4% ó 5% en el laboratorio de Pruebas de Función Pulmonar del Servicio de Neumología.

La muestra se procesará en el Servicio de Inmunología del mismo hospital el mismo día de la inducción. Se realizará un recuento celular total de la muestra y se medirá la viabilidad celular. Si se considera una muestra con una viabilidad aceptable (>60%), la muestra se procesará para medición de Gal1, Gal3 y Gal9, tanto a nivel de citometría de flujo como por RT-PCR.

Posibles riesgos

La inducción de esputo es una prueba que se utiliza de forma rutinaria en el laboratorio sin que suponga ningún riesgo apreciable para la salud de los pacientes. La prueba del esputo puede causar molestias ligeras como tos, irritación de la garganta o sabor salado que ceden al acabar la prueba. Estos síntomas desaparecen rápidamente y revierten con el uso de un broncodilatador inhalado (Ventolin^R o Terbasmin^R).

Confidencialidad

En cumplimiento de lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, se informa a los sujetos participantes en el estudio que los datos que nos proporcione serán estrictamente confidenciales.

Los datos recogidos serán incorporados en un archivo documental en el Hospital de la Princesa. Los ficheros en formato electrónico se recogerán en un ordenador con contraseña inicial para uso exclusivo del Investigador Principal o Colaboradores.

Los datos de carácter personal serán cancelados cuando hayan dejado de ser necesarios o pertinentes para la finalidad del estudio. No serán conservados en forma que permita la identificación del interesado durante un periodo superior a un año, una vez finalizado el estudio.

El paciente tiene derecho al acceso, rectificación, cancelación, y oposición de sus datos personales.

Sólo aquellos datos de la Historia Clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación se hará por el Investigador Principal y los Investigadores Colaboradores de estudio, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias perteneciente a los sujetos participantes en el estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código de forma que sea imposible su reconocimiento por terceras personas, y sólo el Investigador Principal y los Colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y su Historia Clínica.

El protocolo ha sido redactado de conformidad con las normas de buena práctica clínica de la Unión Europea y a la versión vigente de la declaración de Helsinki y ha sido aprobado por nuestro Comité de Ética en la Investigación Clínica, al cual usted puede informar de cualquier hecho que considere oportuno dirigiendo la correspondencia al Presidente del Comité Ético.

Si a lo largo del estudio tuviera cualquier duda o problema no dude en ponerse en contacto con el equipo de investigación llamando al teléfono 91-520-22-77.

El Dr/Dra _____ me ha proporcionado una copia de la información completa acerca del estudio.

El Dr/Dra. _____ me ha dado la oportunidad de preguntar sobre cualquier cuestión relacionada con el estudio. Me ha explicado que soy libre de abandonarlo en cualquier momento si lo deseara, sin que ello repercuta en el seguimiento de mi enfermedad ni en el tratamiento médico.

He leído y comprendido todo lo que se me ha explicado, y consiento en participar en el estudio bajo mi responsabilidad:

Firma del paciente _____ Fecha _____

Nombre del paciente _____

Firma del investigador _____ Fecha _____

Nombre del investigador _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN PACIENTES ASMÁTICOS

Estimado Sr./Sra:

Queremos invitarle a participar en un estudio de investigación en el que tratamos de averiguar si las galectinas, moléculas inmunorreguladoras en modelo de asma animal, actúan en la regulación del sistema inmune de pacientes asmáticos.

Rogamos que lea con atención estas páginas antes de decidir participar o no y recuerde que su participación es totalmente voluntaria y que puede retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que justificar sus decisiones. Además retirarse del estudio no va suponer menoscabo alguno en la atención médica que necesita recibir.

Información sobre el estudio

Se trata de un trabajo de investigación en el que está previsto que participen entre 30 y 40 pacientes, incluyendo pacientes asmáticos controlados y voluntarios sanos. A todos los pacientes se les realizará la técnica de inducción de esputo, para poder así obtener una muestra de origen bronquial. El esputo está compuesto, fundamentalmente, por células que se encuentran inmersas en una trama de glicoproteínas, donde también quedan retenidas muchas sustancias incluyendo tanto productos celulares como extracelulares. Todo ello forma un microambiente muy particular que refleja lo que sucede a nivel bronquial.

Tras realizar esta prueba, la muestra se procesará para el estudio de marcadores celulares y moléculas de inflamación.

El objetivo de este estudio es determinar los niveles de expresión de galectina 1; galectina 3 y galectina 9 en el esputo inducido de pacientes adultos con diagnóstico de asma en comparación con controles sanos mediante RT-PCR y citometría de flujo.

El estudio de las galectinas en pacientes asmáticos, únicamente descrito en modelo animal, puede ser una futura diana terapéutica en dichos pacientes, debido a su poder de regular las principales interleucinas que actúan en el asma.

Procedimientos del estudio

Durante el estudio al paciente se le recogerá una muestra de esputo inducido, a través de un nebulizador ultrasónico con suero salino hipertónico al 3%, 4% ó 5% en el laboratorio de Pruebas de Función Pulmonar del Servicio de Neumología.

La muestra se procesará en el Servicio de Inmunología del mismo hospital el mismo día de la inducción. Se realizará un recuento celular total de la muestra y se medirá la viabilidad celular. Si se considera una muestra con una viabilidad aceptable (>60%), la muestra se procesará para medición de gal1, gal3 y gal9, tanto a nivel de citometría de flujo como por RT-PCR.

Posibles beneficios

Con esta prueba se van a estudiar marcadores de inflamación de sus bronquios. Esto proporcionará al médico una información útil para mejorar el manejo de mi enfermedad.

Posibles riesgos

La inducción de esputo es una prueba que se utiliza de forma rutinaria en el laboratorio sin que suponga ningún riesgo apreciable para la salud de los pacientes. La prueba del esputo puede causar molestias ligeras como tos, irritación de la garganta o sabor salado que ceden al acabar la prueba. Estos síntomas desaparecen rápidamente y revierten con el uso de un broncodilatador inhalado (Ventolin^R o Terbasmin^R).

Confidencialidad

En cumplimiento de lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, se informa a los sujetos participantes en el estudio que los datos que nos proporcione serán estrictamente confidenciales.

Los datos recogidos serán incorporados en un archivo documental en el Hospital de la Princesa. Los ficheros en formato electrónico se recogerán en un ordenador con contraseña inicial para uso exclusivo del Investigador Principal o Colaboradores.

Los datos de carácter personal serán cancelados cuando hayan dejado de ser necesarios o pertinentes para la finalidad del estudio. No serán conservados en forma que permita la identificación del interesado durante un periodo superior a 1año, una vez finalizado el estudio.

El paciente tiene derecho al acceso, rectificación, cancelación, y oposición de sus datos personales.

Sólo aquellos datos de la Historia Clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación se hará por el Investigador Principal y los Investigadores Colaboradores de estudio, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias perteneciente a los sujetos participantes en el estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código de forma que sea imposible su reconocimiento por terceras personas, y sólo el Investigador Principal y los Colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y su Historia Clínica.

El protocolo ha sido redactado de conformidad con las normas de buena práctica clínica de la Unión Europea y a la versión vigente de la declaración de Helsinki y ha sido aprobado por nuestro Comité de Ética en la Investigación Clínica, al cual usted puede informar de cualquier hecho que considere oportuno dirigiendo la correspondencia al Presidente del Comité Ético.

Si a lo largo del estudio tuviera cualquier duda o problema no dude en ponerse en contacto con el equipo de investigación llamando al teléfono 91-520-22-77.

El Dr/Dra _____ me ha proporcionado una copia de la información completa acerca del estudio.

El Dr/Dra. _____ me ha dado la oportunidad de preguntar sobre cualquier

cuestión relacionada con el estudio. Me ha explicado que soy libre de abandonarlo en cualquier momento si lo deseara, sin que ello repercuta en el seguimiento de mi enfermedad ni en el tratamiento médico.

He leído y comprendido todo lo que se me ha explicado, y consiento en participar en el estudio bajo mi responsabilidad:

Firma del paciente _____ Fecha _____

Nombre del paciente _____

Firma del investigador _____ Fecha _____

Nombre del investigador _____

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Madrid, 27 de diciembre de 2010

El **Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa** en su reunión del día 22-12-2010 (acta 24/10) evaluó la respuesta a la solicitud de aclaraciones del proyecto de investigación:

TITULO: El papel de la familia de las galectinas como moléculas inmunoregulatoras en el asma.

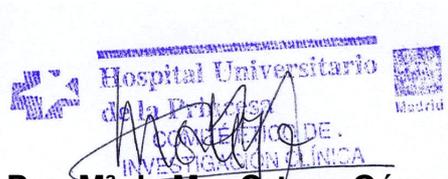
Nº de Registro: PI-486

Investigador principal: Dr. Julio Ancochea Bermúdez (Servicio de Neumología)

Ponentes: M. Ortega

Decisión tomada: **Aprobación (22-12-10)**

Este Comité Ético de Investigación Clínica considera que tanto el proyecto de investigación como la hoja de información al paciente son **ética y metodológicamente aceptables**. Así mismo, considera que los investigadores son competentes para llevar a cabo este proyecto que está enmarcado dentro de las líneas de investigación prioritarias del Hospital Universitario de la Princesa.


Hospital Universitario
de la Princesa
COMITÉ ÉTICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Fdo: **Dra. M^a de Mar Ortega Gómez**
Secretaria del C.E.I.C.

Asthma Control Test™ (La Prueba de Control del Asma) es:

- ▶ Una prueba rápida que produce un resultado numérico para evaluar el control del asma.
- ▶ Reconocida por los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health - NIH) en sus directrices sobre el asma de 2007.¹
- ▶ Convalidada clínicamente por espirometría y evaluaciones de especialistas.²

Para pacientes de 12 años de edad en adelante:

1. Conteste cada pregunta y escriba el número de la respuesta en el cuadro que aparece a la derecha de la pregunta.
2. Sume sus respuestas y escriba el puntaje total en el cuadro del TOTAL que se muestra abajo.
3. Hable con su médico sobre sus resultados.

1. En las últimas **4 semanas**, ¿cuánto tiempo le ha impedido su **asma** hacer todo lo que quería en el trabajo, en la escuela o en la casa?

| | | | | | | | | | |
|---------|---|-----------------------|---|-----------------|---|--------------------|---|-------|---|
| Siempre | 1 | La mayoría del tiempo | 2 | Algo del tiempo | 3 | Un poco del tiempo | 4 | Nunca | 5 |
|---------|---|-----------------------|---|-----------------|---|--------------------|---|-------|---|

PUNTAJE

2. Durante las últimas **4 semanas**, ¿con qué frecuencia le ha faltado el aire?

| | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|----------------|---|---------------------------|---|----------------------------|---|-------|---|
| Más de una vez al día | 1 | Una vez al día | 2 | De 3 a 6 veces por semana | 3 | Una o dos veces por semana | 4 | Nunca | 5 |
|-----------------------|---|----------------|---|---------------------------|---|----------------------------|---|-------|---|

3. Durante las últimas **4 semanas**, ¿con qué frecuencia sus síntomas del **asma** (respiración sibilante o un silbido en el pecho, tos, falta de aire, opresión en el pecho o dolor) lo/la despertaron durante la noche o más temprano de lo usual en la mañana?

| | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|----------------------------|---|--------------------|---|-----------------|---|-------|---|
| 4 o más noches por semana | 1 | De 2 a 3 noches por semana | 2 | Una vez por semana | 3 | Una o dos veces | 4 | Nunca | 5 |
|---------------------------|---|----------------------------|---|--------------------|---|-----------------|---|-------|---|

4. Durante las últimas **4 semanas**, ¿con qué frecuencia ha usado su inhalador de rescate o medicamento en nebulizador (como albuterol)?

| | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--------------------|---|------------------------|---|----------------------------|---|-------|---|
| 3 o más veces al día | 1 | 1 ó 2 veces al día | 2 | 2 ó 3 veces por semana | 3 | Una vez por semana o menos | 4 | Nunca | 5 |
|----------------------|---|--------------------|---|------------------------|---|----------------------------|---|-------|---|

5. ¿Cómo evaluaría el control de su **asma** durante las **últimas 4 semanas**?

| | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|--------------------------|---|
| No controlada en absoluto | 1 | Mal controlada | 2 | Algo controlada | 3 | Bien controlada | 4 | Completamente controlada | 5 |
|---------------------------|---|----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|--------------------------|---|

Si obtuvo 19 puntos o menos, es probable que su asma no esté bajo control. Hable con su médico sobre sus resultados. Las siguientes respuestas no deben sumarse al puntaje total. Converse con su médico acerca de estas respuestas.

TOTAL

En los últimos 12 meses, ¿cuántas veces ha acudido al servicio de emergencias debido al asma (que no hayan resultado en una hospitalización)? _____

En los últimos 12 meses, ¿cuántas veces ha estado hospitalizado debido al asma? _____

Copyright 2002, QualityMetric Incorporated.

Asthma Control Test™ (La Prueba de Control del Asma) es una marca comercial de QualityMetric Incorporated.

La Prueba de Control del Asma es para personas asmáticas de 12 años de edad en adelante.

Referencias: 1. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Institutos Nacionales de la Salud, Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre. *Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma (EPR-3 2007)*. Ítem de NIH No. 08-4051. <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.htm>. Consultado el 10 de septiembre de 2007. 2. Nathan RA y otros. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:59-65.

Tabla 1. Clasificación Clínica de Severidad del Asma

| Nivel de gravedad | Síntomas diurnos | Síntomas nocturnos | Función pulmonar |
|-----------------------------|--|--|---|
| Intermitente leve | < 1 día a la semana | < 2 veces al mes | VEF ₁ o PEF > 80% Variabilidad PEF < 20% |
| Persistente leve | > 1 día a la semana pero no diarios | > 2 veces al mes | VEF ₁ o PEF 80% Variabilidad PEF 20-30% |
| Persistente moderada | Síntomas diarios que afectan la actividad normal | > 1 vez a la semana y afectan el sueño | VEF ₁ o PEF > 60 < 80% Variabilidad PEF > 30% |
| Persistente grave | Síntomas continuos Crisis frecuentes Actividad habitual muy alterada | Frecuentes | VEF ₁ o PEF < 60% Variabilidad PEF > 30% |

Tabla 6. Tratamiento escalonado del asma crónica

| Nivel de severidad | Medicación de control | Medicación de alivio |
|---------------------------|---|---|
| I. Intermitente leve | No requiere | β_2 agonista inhalado de acción corta PRN no mayor 1 vez/día (nivel evidencia A). |
| II. Persistente leve | Beclometasona 250 μ g c/12 h; (total 500 μ g) (nivel de evidencia A) | β_2 agonista de acción corta PRN no mayor de 3 veces/día |
| III. Persistente moderado | Beclometasona 200 – 400 μ g 2 veces/día (400 – 800 /día) con o sin agregado de β_2 agonista de acción prolongada (nivel de evidencia A)* | β_2 agonista de acción corta no mayor de 4 veces al día. |
| IV. Persistente severo | Beclometasona 500 - 1.000 μ g 2 veces/día. Es mejor: 500 μ g de Beclometasona + β_2 agonista de acción prolongada 2 veces al día. (nivel de evidencia A) Si no hay control, subir Beclometasona a 500 μ g c/6 horas + β_2 agonista de acción prolongada 2 veces al día. (nivel evidencia A), o agregar Prednisona 0,5 - 1 mg/kg de peso x 7 a 14 días, manteniendo el esteroide inhalatorio. Alternativas de terapia aditiva: Teofilina acción sostenida (nivel de evidencia B), o leucotrienos (B GINA; D Británica). | β_2 agonista de acción corta 4 veces al día |

(*) Alternativos: Teofilina acción sostenida y antileucotrienos, pero son menos eficaces que los β_2 de acción prolongada (nivel de evidencia B).

Nota: Una vez obtenido el control, y que éste se haya mantenido por al menos 3 meses, se debe intentar una reducción gradual de la medicación para identificar la terapia mínima necesaria para mantener el paciente bajo control. Una forma práctica de indicar el tratamiento en el asma crónica estable se presenta en la Figura 1.

En el caso de Asma severa, ocasionalmente puede no ser factible disminuir o retirar los corticoides orales, debiendo buscarse la dosis mínima de corticoide para mantenerla bajo control.

ANEXO-II

- 
- Tabla de recogida de pacientes y sujetos sanos

| PACIENTE | EDAD | SEXO | ATOPIA | FEV1 | FEV1 % | FVC | FVC % | GINA | FeNO | ACT | FUMADOR | IPA | RINITIS | POLIPOS | AÑOS DE DX |
|----------|------|------|--------|-------|--------|-------|-------|------|------|-----|---------|-----|---------|---------|------------|
| 1 | 28 | M | NO | 4.070 | 116 | 2.320 | 77 | PM | 32 | 25 | SI | 1 | SI | NO | 1 |
| 2 | 45 | M | SI | 2.630 | 110 | 1.760 | 89 | PM | 46 | 25 | NO | | SI | SI | 12 |
| 3 | 73 | M | SI | 2.660 | 82 | 1.920 | 68 | PG | 32 | 18 | NO | | SI | SI | 13 |
| 4 | 34 | M | SI | 2.990 | 132 | 2.420 | 130 | PG | 13 | 19 | NO | | SI | SI | 13 |
| 5 | 75 | M | NO | 2.500 | 110 | 1.910 | 102 | PM | 36 | 22 | NO | | SI | NO | 9 |
| 6 | 60 | M | NO | 1.990 | 88 | 1.570 | 83 | PM | 33 | 19 | NO | | SI | NO | 6 |
| 7 | 61 | M | NO | 1.820 | 87 | 1.470 | 85 | PG | 53 | 21 | NO | | SI | SI | 11 |
| 8 | 66 | M | SI | 3.440 | 113 | 2.960 | 114 | PG | 38 | 21 | NO | | SI | NO | 1 |
| 9 | 52 | M | SI | 2.740 | 85 | 2.980 | 98 | PM | 14 | 16 | NO | | SI | SI | 4 |
| 10 | 59 | H | NO | 2.180 | 81 | 3.620 | 115 | PM | 82 | 24 | NO | | NO | NO | 12 |
| 11 | 50 | M | NO | 1.220 | 79 | 1.700 | 90 | PG | 38 | 25 | NO | | SI | SI | 13 |
| 12 | 67 | M | NO | 1.620 | 80 | 1.700 | 70 | PM | 35 | 25 | NO | | NO | NO | 11 |
| 13 | 66 | M | NO | 3.830 | 107 | 2.760 | 97 | PM | 40 | 25 | NO | | NO | NO | 10 |
| 14 | 63 | H | NO | 3.990 | 112 | 3.420 | 110 | PM | 53 | 25 | NO | | SI | NO | 8 |
| 15 | 26 | M | SI | 3.500 | 94 | 2.500 | 77 | PM | 18 | 23 | NO | | NO | NO | 4 |
| 16 | 28 | M | SI | 3.070 | 94 | 2.390 | 96 | PM | 38 | 24 | NO | | SI | NO | 25 |
| 17 | 55 | M | SI | 3.500 | 100 | 2.540 | 84 | PG | 25 | 18 | NO | | NO | NO | 2 |
| 18 | 48 | M | NO | 5.960 | 102 | 5.100 | 105 | PM | 21 | 22 | SI | 20 | SI | NO | 2 |
| 19 | 25 | H | SI | 2.400 | 87 | 2.890 | 94 | PG | 32 | 23 | NO | | SI | NO | 22 |
| 20 | 28 | M | NO | 5.420 | 113 | 4.020 | 98 | PL | 11 | 25 | NO | | NO | NO | 20 |
| 21 | 24 | H | SI | 3.530 | 84 | 2.130 | 65 | PG | 40 | 24 | NO | | SI | SI | 14 |
| 22 | 62 | H | SI | 3.380 | 121 | 2.520 | 107 | PM | 16 | 25 | NO | | SI | NO | 55 |
| 23 | 59 | M | NO | 4.810 | 119 | 4.010 | 119 | PM | 59 | 21 | NO | | SI | SI | 12 |
| 24 | 32 | M | SI | 4.070 | 116 | 2.320 | 77 | PM | 32 | 25 | NO | | SI | NO | 20 |

Características clínicas de los pacientes asmáticos

M: masculino; **F:** femenino **FEV₁:** volumen espiratorio forzado en un segundo; **FVC:** capacidad vital forzada; **FeNO:** Fracción exhalada de Oxido nítrico expresado en partes por billón; **ACT:** Asma Control Test. **IPA:** índice de paquetes-año. **Dx:** Diagnóstico. **PM:** Persistente Moderado. **PL:** Persistente Leve. **PG:** persistente grave

| PACIENTE | EDAD | SEXO | ATOPIA | FEV1 | FEV1 % | FVC | FVC % | CI | FeNO | ACT | FUMADOR | IPA | RINITIS | POLIPOS | AÑOS DE DX |
|----------|------|------|--------|------|--------|------|-------|----|------|-----|---------|-----|---------|---------|------------|
| 1 | 53 | H | NO | 5130 | 114 | 4240 | 118 | NA | 15 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 2 | 30 | H | NO | 4940 | 96 | 4110 | 96 | NA | 14 | NA | SI | 5 | NO | NO | NA |
| 3 | 32 | H | NO | 4890 | 91,8 | 4290 | 97,8 | NA | 23 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 4 | 45 | H | NO | 5390 | 123 | 4550 | 127 | NA | 18 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 5 | 53 | H | NO | 5730 | 128 | 4086 | 136 | NA | 15 | NA | SI | 18 | NO | NO | NA |
| 6 | 28 | H | NO | 4560 | 118 | 4190 | 120 | NA | 21 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 7 | 27 | M | NO | 4220 | 108 | 3710 | 109 | NA | 22 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 8 | 34 | M | NO | 4240 | 115 | 3050 | 96 | NA | 18 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 9 | 33 | M | NO | 3900 | 102 | 3460 | 106 | NA | 18 | NA | SI | 9 | NO | NO | NA |
| 10 | 37 | H | NO | 4200 | 110 | 3620 | 112 | NA | 23 | NA | SI | 9 | NO | NO | NA |
| 11 | 27 | M | NO | 5240 | 115 | 4700 | 120 | NA | 23 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 12 | 28 | M | NO | 3850 | 112 | 3350 | 112 | NA | 25 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 13 | 37 | M | NO | 4970 | 103 | 3600 | 104 | NA | 24 | NA | SI | 5 | NO | NO | NA |
| 14 | 37 | M | NO | 5150 | 100 | 4380 | 102 | NA | 25 | NA | SI | 3 | NO | NO | NA |
| 15 | 28 | M | NO | 5350 | 110 | 3730 | 102 | NA | 19 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 16 | 27 | H | NO | 4780 | 96 | 4150 | 99 | NA | 17 | NA | NO | NA | NO | NO | NA |
| 17 | 28 | H | NO | 4720 | 99 | 3840 | 95 | NA | 34 | NA | SI | 4 | NO | NO | NA |
| 18 | 26 | M | NO | 4790 | 105 | 3900 | 103 | NA | 14 | NA | SI | 3 | NO | NO | NA |

Características clínicas de los controles sanos

M: masculino; **F:** femenino **FEV₁:** volumen espiratorio forzado en un segundo; **FVC:** capacidad vital forzada; **FeNO:** Fracción exhalada de Oxido nítrico expresado en partes por billón; **ACT:** Asma Control Test. **IPA:** índice de paquetes-año. **Dx:** Diagnóstico. **PM:** Persistente Moderado. **PL:** Persistente Leve. **PG:** persistente grave. **NA:** No aplica.

ANEXO-III

- 
- Publicaciones realizadas en el transcurso de la realización de la tesis

- **Sanchez-Cuellar S**, de la Fuente H, Cruz-Adalia A, Lamana A, Cibrian D, Giron RM, Vara A, Sanchez-Madrid F, Ancochea J. Reduced expression of galectin-1 and galectin-9 by leucocytes in asthma patients. *Clin Exp Immunol*. 2012 Dec;170 (3):365-74.
(F.I : 3.36)

- de la Fuente H, Perez-Gala S, Bonay P, Cruz-Adalia A, Cibrian D, **Sanchez-Cuellar S**, Dauden E, Fresno M, García-Diez A, Sanchez-Madrid F. Psoriasis in humans is associated with down-regulated of galectins in dendritic cells. *J Pathol*. 2012 Oct;228 (2):193-203
(FI: 6.31)

Reduced expression of galectin-1 and galectin-9 by leucocytes in asthma patients

S. Sanchez-Cuellar,^{1*}

H. de la Fuente,^{1†} A. Cruz-Adalia,[†]

A. Lamana,[†] D. Cibrian,[†]

R. M. Giron,^{*} A. Vara,[†]

F. Sanchez-Madrid^{†‡} and J. Ancochea^{*}

^{*}Neumology Department, [†]Immunology

Department, Instituto de Investigación Sanitaria

Princesa, Hospital Universitario de La Princesa,

and [‡]Centro Nacional de Investigaciones

Cardiovasculares, Madrid, Spain

Accepted for publication 15 August 2012

Correspondence: F. Sánchez Madrid,

Immunology Department, Instituto de

Investigación Sanitaria Princesa, Hospital

Universitario de la Princesa, Diego de Leon 62,

28006, Madrid, Spain.

E-mail: fsanchez.hlpr@salud.madrid.org

[†]These authors contributed equally to this work.

Summary

Accumulating evidence shows that galectins play roles in the initiation and resolution phases of inflammatory responses by promoting anti- or proinflammatory effects. This study investigated the presence of three members of the galectin family (galectin-1, -3 and -9) in induced sputum samples of asthma patients, as well as their possible implication in the immunopathogenesis of human asthma. Levels of interleukin (IL)-5, IL-13, and galectins were determined in leucocytes isolated from induced sputum samples by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) immunofluorescence and flow cytometry. High levels of IL-5 and IL-13 mRNA were detected in sputum cells from asthma patients. In parallel, immunoregulatory proteins galectin-1 and galectin-9 showed a reduced expression on macrophages from sputum samples compared with cells from healthy donors. *In-vitro* immunoassays showed that galectin-1 and galectin-9, but not galectin-3, are able to induce the production of IL-10 by peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. These findings indicate that macrophages from sputum samples of asthma patients express low levels of galectin-1 and galectin-9, favouring the exacerbated immune response observed in this disease.

Keywords: asthma, galectin-1, galectin-9, immunoregulation, macrophages

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory respiratory disease characterized by airway inflammation, airway hyperresponsiveness (AHR) and reversible airway obstruction [1]. In atopic asthma, inhalation of allergens stimulates cells of the innate immune system to secrete cytokines that promote CD4⁺ T cell antigen recognition, and favouring a T helper type 2 (Th2) response. Recent studies indicate that Th1 and Th17 cells might also play an important role in the pathophysiology of asthma. There is evidence that interferon (IFN)- γ secretion can cause severe airway inflammation [2], while interleukin (IL)-17 is important for neutrophil recruitment; this cytokine has been detected in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage fluid and sputum from asthma patients [3]. The importance of regulatory T cells in controlling these processes, either via contact-dependent suppression or through IL-10 and transforming growth factor (TGF)- β secretion, is now emerging [4–6].

Galectins are a family of β -galactoside-binding animal lectins with functions in a variety of biological processes,

including inflammation and allergic pathologies [7]. Galectin-3 (gal-3) has been described mainly as a powerful proinflammatory signal. Deficiency for gal-3 results in less AHR in a model of ovalbumin (OVA)-induced asthma as well as in defects of airways remodelling [8,9]. However, gene therapy with gal-3 has shown beneficial effects in two murine models of asthma through the down-regulation of IL-5 gene expression [10,11] associated with inhibition of suppressor of cytokine signalling (SOCS)1 and SOCS3 expression [12]. *In vivo*, gal-1 administration has immunosuppressive and anti-inflammatory effects in various experimental animal models of inflammation and autoimmunity [13–15]. Also, gal-9 administration reduces AHR and Th2 cell-associated airway inflammation in a model of asthma [16]. However, in mice with OVA-induced asthma, the blockade of T cell immunoglobulin (Ig) and mucin domain (TIM-3) (gal-9 ligand) has beneficial effects by skewing the Th2 response towards Th1 response, suggesting that its role in airway inflammation may be more complex [17]. In spite of the growing evidence about the immunoregulatory roles of gal-1 and gal-9, our knowledge of

their precise role in human inflammatory diseases remains scarce. In this regard, it has been described recently that Langerhans and dendritic cells (DCs) from psoriasis patients express low levels of gal-1 compared to healthy donors [18], as well as higher gal-9 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of rheumatoid arthritis patients with low disease activity compared to those with high disease activity [19].

To explore the contribution of galectins in human asthma, induced sputum samples were collected from asthma patients and healthy controls. Expression of gal-1, -3 and -9 was analysed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), flow cytometry and immunofluorescence.

Material and methods

Subjects

The ethics committee of the Hospital de La Princesa, Madrid, Spain (PI-486) approved the study; all participants gave informed written consent. Twenty-four asthmatic subjects with stable asthma (19 women and five men) without systemic steroids and 18 healthy controls (nine women and nine men) were included. Asthma severity was scored according to the criteria of the Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA) (<http://www.ginasthma.com>) based on current therapy. Asthmatic subjects were grouped into atopics and non-atopics based on detection of specific IgE antibodies to house-dust mite, pets or pollen (grass or tree) and on a clinical history suggestive of allergic response to those allergens. Symptoms were measured using the asthma control test (ACT). Prebronchodilator forced expiratory volume in 1 s (FEV₁), FEV₁ (%), prebronchodilator forced vital capacity (FVC), FVC (%) and ratio FEV₁/FVC was measured by spirometry (Jaeger, Wuertzburg, Germany). Exhaled nitric oxide (FeNO) was measured using a NIOX-MINO® monitor (Aerocrine, Solna, Sweden). Patients continued with their usual inhaled corticosteroids (ICS) treatment which was categorized as follows: < 500 µg/day beclomethasone dipropionate (BDP) or equivalent (*n* = 9), 500–1000 µg/day BDP or equivalent (*n* = 8) and > 1000 µg/day BDP or equivalent (*n* = 7). Clinical parameters: age, sex, pulmonary function, asthma severity, atopic status, ACT, FeNO, ICS, number of years since diagnosis and history of smoking, rhinitis and nasal polyps were collected. Clinical parameters are summarized in Table 1.

Sputum induction

The sputum induction protocol from Pizzichini was followed, with some modifications [20]. Briefly, before sputum induction all subjects inhaled salbutamol (200 µg) via metered dose inhaler. Sputum was induced by 7-min

Table 1. Clinical characteristics of asthma patients and healthy donors.

| | Asthma | Controls |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|
| Subjects (<i>n</i>) | 24 | 18 |
| Age | 50.34 (24–75) | 33.88 (26–53) |
| Sex (male/female) | 5/19 | 9/9 |
| Atopic/non-atopic | 12/12 | 0/12 |
| ICS BDP dose: (<i>n</i>) | | |
| • < 500 µg/day | 9 | 0 |
| • 500–1000 µg/day | 8 | 0 |
| • > 1000 µg/day | 7 | 0 |
| Lung function | | |
| • FEV ₁ (ml) | 2623 (1470–5100)* | 3937 (3350–4550)* |
| • FEV ₁ %pred | 94.5 (65–119)* | 108.5 (65–136)* |
| • FVC (ml) | 3220 (1220–5960)* | 4789 (3850–5730)* |
| • FVC%pred | 100.4 (79–132) | 108.2 (96–128) |
| • FEV ₁ /FVC ratio | 76 (57–105)* | 83.2 (72–88)* |
| FeNO (ppb) | 35 (11–82)* | 20 (14–34)* |
| ACT | 22 (16–25) | 25 |
| Current smokers (%) | 8.3% (2/22) | 44% (8/10) |
| (yes/no) | | |
| Packs years | 10 | 7 |
| Years of diagnosis | 12.7 (1–55) | |
| Rhinitis (yes/no) | 18/6 | 0/17 |
| Nasal polyps (yes/no) | 8/16 | 0/17 |

Results are expressed as mean (range). ICS BDP dose: inhaled corticosteroid dose µg/day beclomethasone; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; FeNO: exhaled nitric oxide; ppb: parts per billion; ACT: asthma control test. Pack years: averaged over the complete life-span. Differences between means were tested for lung function and FeNO by Mann-Whitney *U*-test, **P* ≤ 0.05.

inhalation of hypertonic saline generated with an Omron Nebulizer (NE-U17-E). Subjects initially inhaled 3% saline, and if sufficient sputum was not produced the procedure was repeated with higher concentrations (4 and 5%). Subjects then expectorated into a sterile specimen cup. FEV₁ was measured at baseline, after salbutamol inhalation and after each inhalation period, and the procedure was stopped if FEV₁ fell by more than 10% or the patient coughed, wheezed or felt chest pain.

Sputum was weighed, dispersed with 4 volumes of 0.1% dithiothreitol (Calbiochem Corp., San Diego, CA, USA) and incubated in a shaking waterbath at 37°C for 30 min. Cell viability was determined by Trypan blue exclusion. The differential count was obtained by counting 400 cells after Diff-Quik staining. If more than 5 × 10⁵ cells were collected, 50% was frozen immediately for RNA extraction and the remaining 50% used for flow cytometry analysis. When fewer than 5 × 10⁵ cells were collected, the sample was used for just one of these procedures.

Antibodies

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD45, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human HLA-DR, allophycocyanin (APC)-H7-conjugated anti-human

CD14, Pacific blue (PB)-conjugated anti-human CD16, Pacific orange (PO)-conjugated anti human CD45 and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) were all from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Polyclonal goat anti-human gal-1, gal-3 and gal-9 were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Secondary antibodies Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-goat (DAG), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse (GAM) and Alexa Fluor 488-conjugated DAG were from Molecular Probes (Leiden, the Netherlands).

Flow cytometry

Sputum cells from 15 asthma patients and 10 healthy donors were labelled with PO-anti-CD45, PE-anti-HLA-DR, PB-anti-CD16 and APC-H7-anti-CD14. For galectin detection, cells were stained with goat polyclonal anti-gal-1, anti-gal-3 or anti-gal-9 followed by Alexa Fluor 647-DAG. Before antibody incubation, Fc-receptors were blocked with human gamma-globulin. Analyses were performed with a fluorescence activated cell sorter (FACS)Canto II cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Galectin expression was analysed as mean fluorescence intensity (MFI).

Cytokine expression

PBMC were isolated from 15 ml of venous peripheral blood from five healthy donors by density gradient. PBMC were seeded (5×10^5) onto 24-well plates and stimulated with 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS); where indicated, 10 µg/ml human recombinant (h) gal-1 (Preprotech, London UK), gal-3 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) or gal-9 (R&D Systems) were added. After 24 h, cytokine expression was detected at mRNA and protein level using RT-PCR and cytometric bead array (BD Biosciences), respectively. Bead array data were acquired using FACS-Canto II cytometer.

In addition, IL-10 and IL-4 production were analysed in peripheral blood lymphocytes (PBLs) from four healthy donors. Briefly, PBMC were depleted of monocytes and PBLs (2×10^6) were seeded onto 24-well plates precoated or not with 0.5 µg/ml anti-CD3 and 1 µg/ml anti-CD28; where indicated, 10 µg/ml h gal-1, h gal-3 or h gal-9 were added. After 24 h of incubation, culture supernatants were collected and quantified by cytometric bead array.

Quantitative real-time PCR

RNA was isolated with Trizol RNA reagent (Invitrogen, Eugene, OR, USA) and RT-PCR was performed from 250 ng of RNA from 16 asthma patients and 11 healthy donors. In the case of PBMC, RNA was isolated from five healthy donors. mRNA levels of IL-5, IL-13, gal-1, gal-3 and gal-9 for sputum samples and IL-10, IL-12A, IL-12B, IL-1β

and TNF-α for PBMC were determined in duplicate using Power SYBR Green PCR master mix from Applied Biosystems (Warrington, UK). Expression levels were normalized using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or beta-actin as controls. Primers sequences are shown in Supplementary Table S1.

Fluorescence microscopy

Cytospin preparations were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100. After blocking of Fc-receptors with human gamma-globulin, cytospin preparations were labelled with anti-gal-1, anti-gal-3 or anti-gal-9. Next, Alexa Fluor 488-coupled DAG 1:100 was added. Preparations were blocked with goat serum and incubated with mouse anti-human CD45 followed by Alexa Fluor 568-coupled GAM. Finally, Alexa Fluor 647 anti-MHC-II was added. Nucleus was counterstained with Hoechst 33342. Images were captured with wide-field fluorescence Leica DMIRE2 microscope coupled to a monochromator (Polychrome IV from Till Photonics, Lochhamer Schlag, Germany) and CCD camera (CoolSNAP HQ; Photometrics, Tucson, AZ, USA).

Statistical analysis

Data were analysed with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). The Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney *U*-test or Wilcoxon's matched-pairs test were used when appropriate. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Subjects, lung function and sputum differentials

Sputum samples were obtained from 24 asthma patients and 18 control subjects. The mean FEV₁ of the 24 asthma patients was 2623 ml (94.5%) and the mean FVC was 3320 ml (100.4%), while the FEV₁/FVC ratio was 76.73. The distribution of asthma according to severity and current therapy using GINA guidelines was as follows: mild intermittent ($n = 0$), mild persistent ($n = 1$), moderate persistent ($n = 15$) and severe persistent ($n = 8$). Atopy was found in 12 of 24 asthma patients. Two of 24 asthma patients and eight of 18 control subjects had a history of smoking. All healthy controls had normal spirometry and all participants denied clinical symptoms of upper or lower airway disease during the previous 4 weeks and the use of anti-asthma medication in the last 5 years. Clinical characteristics of patients are shown in Table 1.

The quality of induced sputum samples was determined by the presence of <20% squamous epithelial cells and >50% cell viability assessed by vital dye 7-AAD exclusion. The samples that did not fulfil quality criteria were excluded

Table 2. Differential cell counts (cytospins) in induced sputum.

| | Healthy | Asthma |
|------------------------|-----------------|------------------|
| Total cells (10^5) | 7.20 (1–20) | 7.10 (1–20) |
| Neutrophil % | 43.84 (25–65) | 48.60 (40–57) |
| Macrophage/monocyte % | 53.07 (34–71) | 38.3 (34–41) |
| Lymphocyte % | 0.48 (0.2–0.8) | 0.72 (0.4–1.3) |
| Eosinophil % | 0.97 (0–2) | 1.43 (0.13–2.73) |
| Epithelial cells % | 1.57 (0.5–3.2)* | 9.57 (5.5–12.5)* |

Data are expressed as mean (range) * $P < 0.05$.

from the study. Differential cell count obtained from cytospin preparations are shown in Table 2. FACS analysis of single-cell suspensions stained for cell surface markers detected a predominance of leucocytes ($CD45^+$, 60–90%), most of which were $CD16^+$. Representative flow histograms are shown in Supplementary Fig. S1.

Th2 cytokine and galectin mRNA expression in sputum samples

The expression of gal-1, gal-3 and gal-9 were analysed by RT-PCR in cells isolated of induced sputum samples from asthma patients and healthy control subjects.

Gal-1 and gal-3 mRNA levels in samples from asthma patients [mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) = 2.6 ± 0.4 and 4.4 ± 1.4 , respectively] were lower than those from healthy subjects (4.7 ± 1.2 and 20.0 ± 8.7) (Fig. 1a). In contrast, gal-9 mRNA expression did not vary significantly between the two groups (3.2 ± 1.3 versus 3.3 ± 1.1) (Fig. 1a). As expected, sputum samples from asthma patients contained elevated mRNA levels of the Th2 cytokines IL-5 and IL-13 ($P < 0.05$, Fig. 1b).

The Th17 response has been proposed recently to play an important role during the pathology of allergic asthma [21]. However, the Th17 cytokines IL-17 and IL-23 were undetectable in sputum samples under our experimental conditions (data not shown).

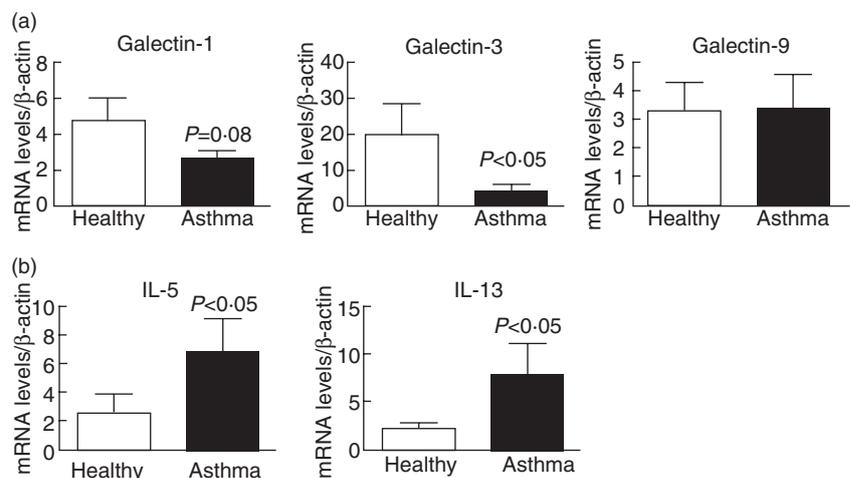
Gal-1, gal-3 and gal-9 expression in leucocytes from induced sputum samples

Surface expression of galectin proteins in sputum cells was determined by flow cytometry. First, using sputum samples from healthy donors we determined whether galectins were expressed differentially in the main subsets of sputum leucocytes observed in cytospin. Differential expression of HLA-DR was used to distinguish macrophages ($CD16^+DR^+$) and neutrophils ($CD16^+DR^-$) and the expression of galectins was studied in both subpopulations. A low level of eosinophil counts ($< 3\%$) was observed in samples from both asthmatic patients and healthy donors (see Table 2). As shown in Fig. 2a, gal-1 and gal-9 were expressed only on macrophages, while gal-3 expression was detected on both macrophages and neutrophils. Differential gal expression by macrophages and neutrophils was also confirmed by immunofluorescence staining of sputum cell samples (Fig. 2b).

Next, we compared galectin expression between asthma patients and healthy controls. Surface expression of gal-1 and gal-9 was clearly diminished in asthma patients compared with the control group ($P < 0.05$) (Fig. 3a,b), which is consistent with the reported action of these proteins as negative regulators of the immune responses [22,23]. Surface expression of gal-3 was highly variable, and although it tended to be lower in asthmatic patients, this difference did not reach statistical significance (Fig. 3b).

Gal-1, gal-9 and especially gal-3 have been linked to allergic conditions. However, we did not find any difference in gal expression between atopic and non-atopic asthma patients, indicating that the lower expression of gal-1 and gal-9 is independent of atopic status (Fig. 3c). In addition, no significant differences in galectin expression were observed when patients were classified according to the dose of inhaled corticosteroids (Supplementary Table S2).

Fig. 1. Induced sputum cells of asthma patients show altered mRNA expression of galectins (gal) and Th2 cytokines. Total RNA was isolated from induced sputum of asthma patients ($n = 16$) and healthy donors ($n = 11$), and real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. (a) Gal-1, gal-3 and gal-9 mRNA expression. (b) Interleukin (IL)-5 and IL-13 mRNA expression. mRNA levels are expressed as arbitrary units respect to β -actin expression. Differences between groups were tested by Mann–Whitney U -test. Bars correspond to mean \pm standard error of the mean.



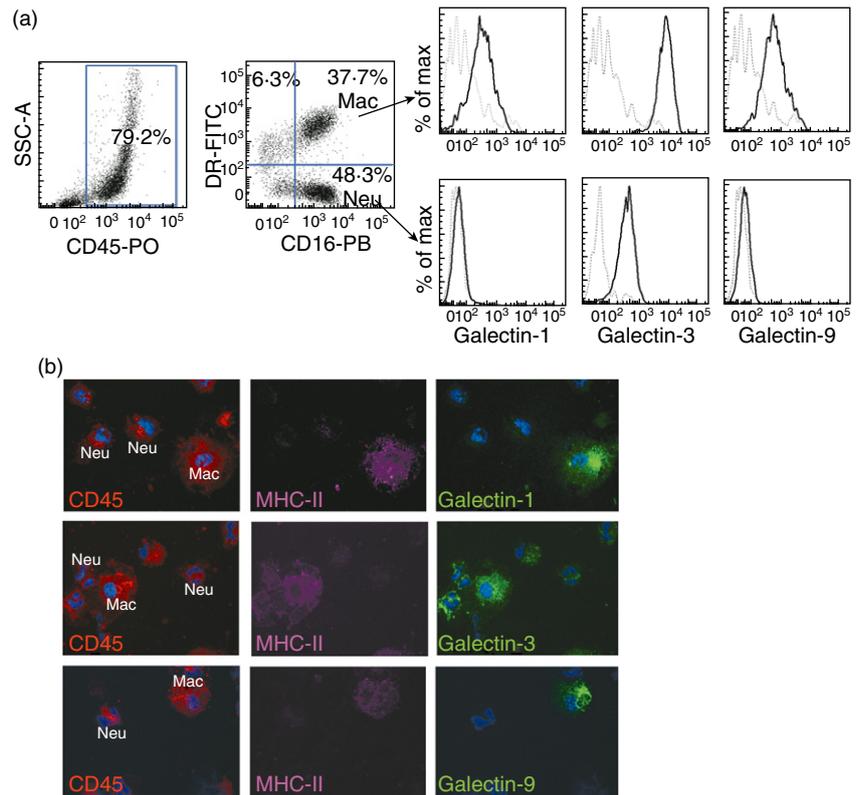


Fig. 2. Macrophages are the main sputum cells expressing galectin (gal)-1 and gal-9. (a) Single-cell suspensions of sputum cells from a healthy donor were stained with anti-CD45, anti-CD16, anti-HLA-DR and anti-gal-1, anti-gal-3 or anti-gal-9, and analysed by flow cytometry. Expression of gal-1, gal-3 and gal-9 was analysed on macrophages (CD16⁺ DR⁺) and neutrophils (CD16⁺ DR⁻). Isotype control (dotted line), gal expression (solid line). (b) Gal-1, gal-3 and gal-9 expression on macrophages detected by triple immunofluorescence in cytospin preparations from sputum cells from a healthy donor. Gal-1, gal-3 and gal-9 (green), major histocompatibility complex (MHC)-class II (magenta) and CD45 (red). Nuclei were stained with Hoescht (blue).

Regulation of cytokine expression by galectins

Next, we explored the role of gal-1, gal-3 and gal-9 in the cytokine production induced by LPS. PBMC were stimulated with LPS in the absence or presence of gal-1, gal-3 and gal-9 during 24 h. RT-PCR assays showed that gal-3 reduced the expression of IL-12A induced by LPS (Fig. 4a). When samples were matched it was observed that the reduction of IL-12A levels occurred in four of five samples tested; however, statistical analysis did not show any significant differences (Supplementary Fig. S2a). Gal-9 also caused a mild inhibition of IL-12B in four of five samples included (Fig. 4a and Supplementary Fig. S2b). In addition, we observed a slight increment of TNF- α expression in PBMC stimulated with LPS in the presence of gal-9. However, analysis of matched samples showed that this effect occurs in only three of five samples (Fig. 4a and Supplementary Fig. S2c). Regarding IL-1 β , we did not detect any significant difference among treatments (Fig. 4a). Conversely, both gal-1 and gal-9 were able to increase the expression of LPS-induced IL-10 mRNA; in both cases the induction of IL-10 expression was observed in all samples tested ($P = 0.01$ and $P = 0.03$, respectively; Fig. 4b and Supplementary Fig. S2d). Moreover, gal-1 and gal-9 in the absence of additional stimulus induced a high expression of IL-10 (Supplementary Fig. S2e). Gal-1, gal-3 and gal-9 were also explored by their effect on anti-CD3/anti-CD28-induced cytokines in peripheral T lymphocytes.

Lymphocytes were stimulated during 24 h with anti-CD3 and anti-CD28 in the presence or not of gal-1, gal-3 and gal-9 as indicated in Material and methods. Cytokine production was determined using a bead-based immunoassay. Our results showed that the presence of gal-1 during T cell receptor (TCR) stimulation induces a high production of IL-10, $P = 0.02$ (Fig. 4c). An augmented IL-4 production was also observed in those lymphocytes co-incubated with gal-3 and anti-CD3/anti-CD28; however, this difference was not statistically significant (data not shown).

Discussion

Most published studies on the immunopathogenesis of asthma and other inflammatory diseases focus on proinflammatory mediators. However, in recent years the study of cells and molecules with immunoregulatory activity has begun to gain importance. The data presented here show that airway cells obtained from induced sputum samples of asthma patients express lower levels of gal-1 and gal-9 and higher levels of IL-5 and IL-13 compared with cells from healthy subjects. In addition, we have identified macrophages as the cells from sputum expressing gal-1 and gal-9. A recent study analysed the presence of galectin-bound proteins in bronchoalveolar lavage (BAL) from patients with mild asthma, and a different profile of galectin-bound proteins was observed between patients and healthy subjects. In parallel, authors describe that BAL contains galectins at low

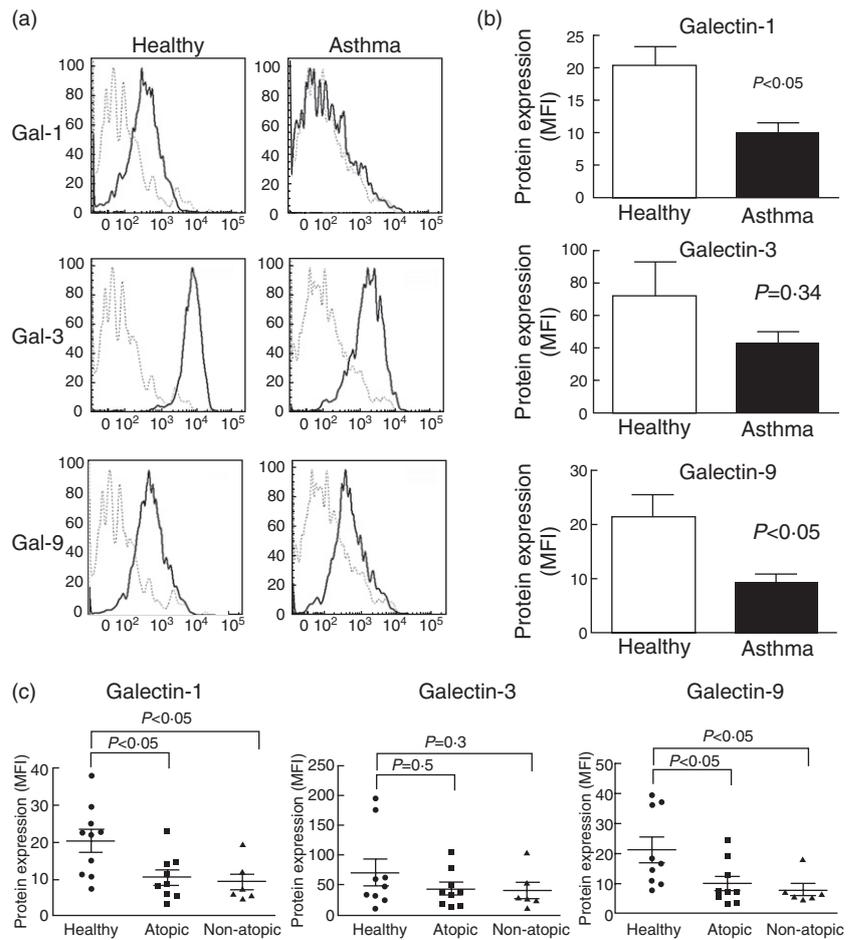


Fig. 3. Surface expression of galectin (gal)-1 and gal-9 is reduced in leucocytes from induced sputum of asthma patients. (a) Cells from sputum samples were stained as in Fig. 2 and galectin expression was analysed on macrophages (CD16⁺ HLA-DR⁺). Representative histograms from a healthy donor and an asthma patient are shown. Isotype control (dotted line), gal expression (solid line). (b) Gal-1, gal-3 and gal-9 expression on leucocytes from asthma ($n = 15$) and healthy donors ($n = 10$). Bars represent mean \pm standard error of the mean of mean fluorescence intensity (MFI) of galectins expression. Differences were tested by Mann–Whitney U-test. (c) Gal expression according to allergic state. Differences between atopy and non-atopy against healthy donors were tested by Mann–Whitney U-test.

concentrations, suggesting that functional interactions with galectins occur at sites where airway cells are present [24].

Numerous studies have highlighted the immunomodulatory properties of galectins [7]. The anti-inflammatory properties of gal-1 have been evaluated in animal models of chronic inflammation [13,25–27]. However, the role of gal-1 in asthma has not been explored previously. Published data highlight the ability of gal-1 to counteract Th1 and Th17-mediated responses through a number of anti-inflammatory mechanisms. One reported mechanism is a skewing of the balance from Th1 towards Th2 polarized immune responses, mainly through the induction of Th1 cell apoptosis. The numerous anti-inflammatory effects of gal-1 include induction of IL-10 release [28,29], down-regulation of the secretion of TNF- α and IFN- γ [30,31] and inhibition of transendothelial migration as well as chemotaxis of neutrophils [32]. Disruption of all these processes could contribute to exacerbated inflammatory responses in an environment with defective expression of this lectin. In the context of asthma, IL-10 plays a key role in the control of inflammatory process, able to down-modulate the Th2 response [33–35]. Decreased IL-10 expression has been linked recently to the impaired ability of natural regulatory T cells from allergic asthma patients to induce a tolerogenic

phenotype in dendritic cells [36]. In this regard, our data show that the presence of gal-1 during LPS stimulation augments the IL-10 expression by PBMCs; this effect was also observed in lymphocytes stimulated through the TCR. Expression of gal-1 is induced by budesonide in an *in-vitro* assay and may account for its immunosuppressive efficacy. The increased gal-1 expression appears to translate into a marked decrease in the migration of eosinophils, the predominant inflammatory cell type in this condition [37].

Gal-3, the most studied galectin in relation to asthma, has been described as a molecule that might contribute to allergic airway inflammation and AHR. We found lower gal-3 gene expression in sputum samples from asthma patients compared with healthy controls; however, differences in surface gal-3 protein were not statistically significant, due possibly to the high variability among subjects.

Gal-9 has a variety of biological activities but is known mainly for its chemotactic activity towards eosinophils [38]. Gal-9 has also been described as a negative regulator of Th1 cells [39], but its role in allergic inflammation is controversial. Administration of gal-9 inhibits allergic airway inflammation and Th2 cytokine expression [16]. However, it has been described that blockade of the ligand of gal-9 (TIM-3) results in ameliorated OVA-induced asthma [17]. Our data

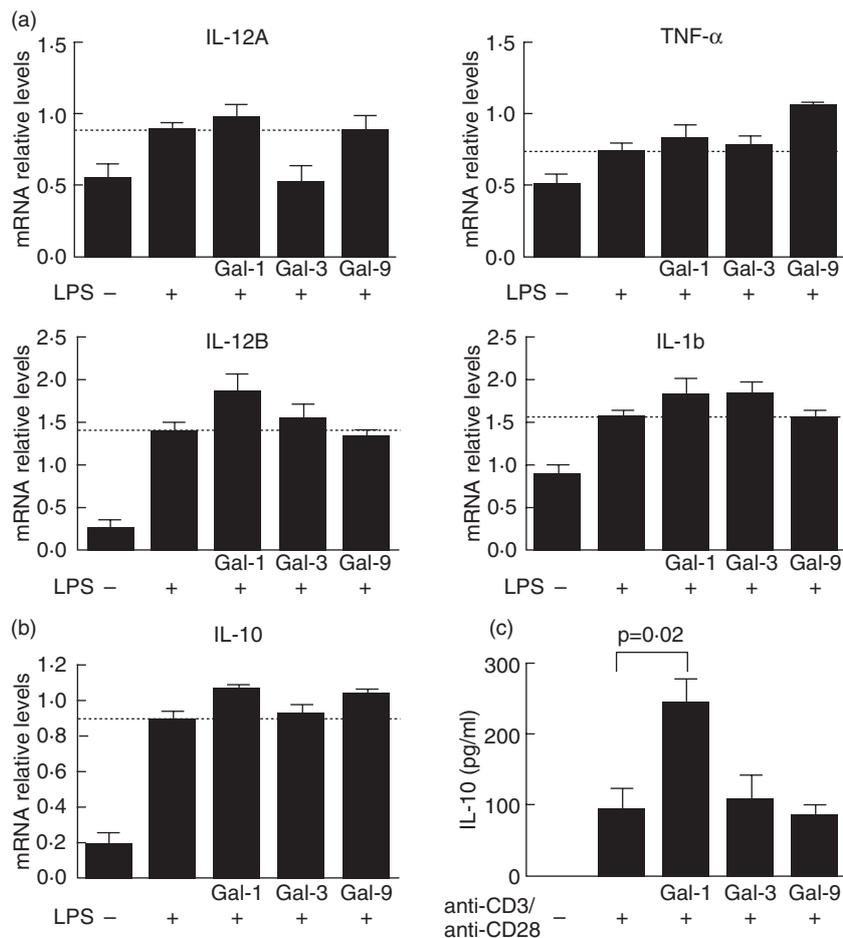


Fig. 4. Galectin (gal)-1 and gal-9 induce interleukin (IL)-10 in human peripheral blood mononuclear cells of healthy donors. (a) Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (5×10^5) were incubated on p24 plates in the presence or not of 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) plus 10 μ g/ml gal-1, gal-3 or gal-9. After 24 h of culture, IL-12A, IL-12B, tumour necrosis factor (TNF)- α and IL-1b expression were analysed by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR). Bars correspond to mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) from five independent experiments. Dashed lines indicate LPS-induced cytokine expression. Differences among groups were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) test. mRNA levels are expressed as arbitrary units respect to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression (b). mRNA IL-10 expression of PBMC treated as in (a), bars correspond to mean \pm s.e.m. from five independent experiments. Dashed line indicates LPS-induced IL-10 expression. (c) IL-10 secretion by peripheral blood lymphocytes (PBL) stimulated with anti-CD3/anti-CD28 in the presence or absence of gal-1, gal-3 or gal-9. PBLs (2×10^6 /ml) were incubated on p24 plates precoated with anti-CD3/anti-CD28, where indicated 10 μ g/ml of gal-1, gal-3 or gal-9 were added. IL-10 production was tested using bead-based immunoassay by flow cytometry. Bars correspond to mean \pm s.e.m. from four independent experiments. Differences among groups were tested by one-way ANOVA test.

show that macrophages of induced sputum samples of asthma patients present low levels of membrane surface-expressed gal-9; however, data obtained from RT–PCR assays did not show any difference in mRNA expression. The gal-9 expressed on the cellular surface corresponds mainly with that produced by the own cell; however, we cannot rule out that, to a certain extent, gal-9 detected on the macrophages could be derived from bystander cells; in addition, post-transcriptional regulation of gal-9 could also account for such differences. Our data show that gal-9 is able to induce IL-10 production by human mononuclear cells, an effect that could be associated with its negative role on the immune response. In this sense, macrophages from

mice treated with exogenous gal-9 produced less TNF- α and IL-1 β but more IL-10 than PBS-treated mice in a model of acute lung injury, in which gal-9 administration resulted in an ameliorated disease [40].

It has been described that galectins might be modified by corticosteroids either inducing or inhibiting their expression [41,42]. However, when asthma patients were classified according to the doses of corticosteroids (< 500 μ g/day and > 1000 μ g/day) no significant differences were detected between groups.

In this study we have also explored the possible regulation of additional LPS-induced cytokines, as IL-1 β , IL-12 and TNF- α by gal-1, -3 and -9. Our results reveal that gal-3

and gal-9 were able to reduce the LPS-induced expression of IL-12A and IL-12B in four of five subjects tested. Accordingly, splenocytes from gal-3-deficient mice secreted more IL-12 compared with wild-type mice in a model of atopic dermatitis [43]. Under our experimental conditions we have not observed inhibition of IL-1 β and TNF- α . Moreover, our results show an increase in TNF- α expression in response to LPS plus gal-9. It is important to note that the doses employed in this study are very low (< 1 μ M) and higher doses of galectins could be necessary to down-modulate cytokine expression. In addition, *in-vitro* gal-9 has shown to induce human monocyte-derived DCs activation [44] as well as TNF- α production [45].

While animal models are extremely useful tools for investigating the role of molecules in the immunopathogenesis of inflammatory diseases, in many situations functions described in animals cannot be extrapolated to humans. Studies of immune parameters in asthma patients are, however, hampered by the restricted availability of lung tissue or bronchoalveolar samples because of the risks and contraindications to obtaining these samples. Sputum induction is thus a valuable, non-invasive means of obtaining viable cells from the lower airway for evaluation of airway inflammation. Using this method to obtain airway cells, we have detected defective expression of gal-1 and gal-9 in asthma patients. The balance of pro- and anti-inflammatory signals determines the final outcome of the immune response, and the low levels of the negative regulators as gal-1 and gal-9 in human asthma may contribute to the inflammatory response present in this disease.

Acknowledgements

We thank the asthmatic patients and healthy subjects for their participation in this study and S. Bartlett for English editing of the manuscript. Supported in part by EU–Mexico FONCICYT-C002-2009-1 ALA/127249, SAF-2008–02635 and SAF-2011–25834 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, INDISNET (Redes Moleculares y Celulares en Enfermedades Inflamatorias) S2011/BMD-2332, MEICA (Molecular and Cellular Mechanisms in Chronic Inflammatory and Autoimmune Diseases, Genoma España) and SEPAR (Sociedad Española de Patología Respiratoria).

Disclosure

Authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- 1 Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; **344**:350–62.
- 2 Cui J, Pazdziorko S, Miyashiro JS *et al.* TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **115**:309–15.

- 3 Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 2003; **97**:726–33.
- 4 McGee HS, Agrawal DK. Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; **180**:211–25.
- 5 Presser K, Schwinge D, Wegmann M *et al.* Coexpression of TGF-beta1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity. *J Immunol* 2008; **181**:7751–8.
- 6 Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:271–83.
- 7 Rabinovich GA, Croci DO. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 2012; **36**:322–35.
- 8 Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O *et al.* Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol* 2004; **165**:2045–53.
- 9 Ge XN, Bahaie NS, Kang BN *et al.* Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice. *J Immunol* 2010; **185**:1205–14.
- 10 del Pozo V, Rojo M, Rubio ML *et al.* Gene therapy with galectin-3 inhibits bronchial obstruction and inflammation in antigen-challenged rats through interleukin-5 gene downregulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **166**:732–7.
- 11 Lopez E, del Pozo V, Miguel T *et al.* Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. *J Immunol* 2006; **176**:1943–50.
- 12 Lopez E, Zafra MP, Sastre B, Gamez C, Lahoz C, del Pozo V. Gene expression profiling in lungs of chronic asthmatic mice treated with galectin-3: downregulation of inflammatory and regulatory genes. *Mediat Inflamm* 2011; **2011**. doi: 10.1155/2011/823279.
- 13 Perone MJ, Bertera S, Shufesky WJ *et al.* Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol* 2009; **182**:2641–53.
- 14 Cedeno-Laurent F, Barthel SR, Opperman MJ, Lee DM, Clark RA, Dimitroff CJ. Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation. *J Immunol* 2010; **185**:4659–72.
- 15 Wang CR, Shiao AL, Chen SY *et al.* Intra-articular lentivirus-mediated delivery of galectin-3 shRNA and galectin-1 gene ameliorates collagen-induced arthritis. *Gene Ther* 2010; **17**:1225–33.
- 16 Katoh S, Ishii N, Nobumoto A *et al.* Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**:27–35.
- 17 Kearley J, McMillan SJ, Lloyd CM. Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody *in vivo*. *J Exp Med* 2007; **204**:1289–94.
- 18 de la Fuente H, Perez-Gala S, Bonay P *et al.* Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *J Pathol* 2012; **228**:193–203.
- 19 Lee J, Oh JM, Hwang J *et al.* Expression of human TIM-3 and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2011; **40**:334–40.
- 20 Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A *et al.* Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **154**:866–9.
- 21 Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol* 2010; **72**:495–516.

- 22 Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; **8**:825–34.
- 23 Oomizu S, Arikawa T, Niki T *et al.* Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. *Clin Immunol* 2012; **143**:51–8.
- 24 Cederfur C, Malmstrom J, Nihlberg K *et al.* Glycoproteomic identification of galectin-3 and -8 ligands in bronchoalveolar lavage of mild asthmatics and healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1820**:1429–36.
- 25 Gomez-Tourino I, Sanchez-Espinel C, Hernandez-Fernandez A *et al.* Galectin-1 synthesis in type 1 diabetes by different immune cell types: reduced synthesis by monocytes and Th1 cells. *Cell Immunol* 2011; **271**:319–28.
- 26 Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009; **10**:981–91.
- 27 Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM *et al.* Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* 2006; **176**:6323–32.
- 28 van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T *et al.* Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J Pathol* 2004; **204**:511–8.
- 29 Cedeno-Laurent F, Opperman M, Barthel SR, Kuchroo VK, Dimitroff CJ. Galectin-1 triggers an immunoregulatory signature in Th cells functionally defined by IL-10 expression. *J Immunol* 2012; **188**:3127–37.
- 30 Stowell SR, Qian Y, Karmakar S *et al.* Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 2008; **180**:3091–102.
- 31 Gil CD, Gullo CE, Oliani SM. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; **4**:74–84.
- 32 La M, Cao TV, Cerchiaro G *et al.* A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte–endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol* 2003; **163**:1505–15.
- 33 Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med* 2008; **8**:437–45.
- 34 Faith A, Singh N, Farooque S *et al.* T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways. *Allergy* 2012; **67**:1007–13.
- 35 Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S *et al.* Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 2006; **116**:146–55.
- 36 Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. Impaired IL-10-dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4+CD25hiCD127lo/– natural regulatory T cells in human allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; **180**:823–33.
- 37 Delbrouck C, Doyen I, Belot N *et al.* Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Lab Invest* 2002; **82**:147–58.
- 38 Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M *et al.* Human egalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; **273**:16976–84.
- 39 Zhu C, Anderson AC, Schubart A *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; **6**:1245–52.
- 40 Kojima K, Arikawa T, Saita N *et al.* Galectin-9 attenuates acute lung injury by expanding CD14+ plasmacytoid dendritic cell-like macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; **184**:328–39.
- 41 Gong YB, Huang YF, Li Y *et al.* Experimental study of the mechanism of tolerance induction in dexamethasone-treated dendritic cells. *Med Sci Monit* 2011; **17**:BR125–31.
- 42 Maldonado CA, Sundblad V, Salatino M *et al.* Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages. *Histol Histopathol* 2011; **26**:747–59.
- 43 Saegusa J, Hsu DK, Chen HY *et al.* Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol* 2009; **174**:922–31.
- 44 Dai SY, Nakagawa R, Itoh A *et al.* Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2005; **175**:2974–81.
- 45 Kanzaki M, Wada J, Sugiyama K *et al.* Galectin-9 and T cell immunoglobulin mucin-3 pathway is a therapeutic target for type 1 diabetes. *Endocrinology* 2012; **153**:612–20.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1. Immunophenotype of induced sputum cells. Single-cell suspensions were prepared from sputum samples and stained with anti-CD45, anti-CD16 and anti-CD3 or anti-CD14. Vital dye 7-aminoactinomycin D (7-AAD) was used to exclude dead cells. Representative flow histogram of an asthmatic patient is shown. Numbers inside dot-plots indicate the percentage of each subpopulation.

Fig. S2. Effect of galectins (gal) on cytokine expression. (a–c). Effect of gal-3 on lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin (IL)-12A (a) and of gal-9 on LPS-induced IL-12B and TNF- α (b,c) expression on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy subjects. PBMC (5×10^5) were incubated on p24 plates with 100 ng/ μ l LPS in the presence or not of gal-3 or gal-9 (10 μ g/ml). After 24 h culture, cytokine expression was analysed by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR). Data correspond to five independent experiments. Difference between treatments was analysed by Wilcoxon’s matched-pairs test. (d) Effect of gal-1 and gal-9 on LPS-induced IL-10 expression on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Cells were treated and analysed as in (a–c). (e) Gal-1 and gal-9 induce the expression of IL-10 in PBMC. Mononuclear cells (5×10^5) were incubated on p24 plates in the presence of 10 μ g/ml gal-1, gal-3 and gal-9 during 24 h, and then IL-10 expression was determined by RT–PCR. LPS (100 ng/ml) was used as positive control. Data correspond to mean \pm standard error of the mean of five independent experiments. Differences among treatment were tested by one-way analysis of variance test, * $P < 0.05$.

Table S1. Sequence of primers used for reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR).

Table S2. Relation between beclomethasone (BDP) dose and levels of protein expression [mean fluorescence intensity (MFI)] by flow cytometry.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells

H de la Fuente,^{1,2} Silvia Perez-Gala,³ Pedro Bonay,⁴ Aranzazu Cruz-Adalia,¹ Danay Cibrian,¹ Silvia Sanchez-Cuellar,¹ Esteban Dauden,³ Manuel Fresno,⁴ Amaro García-Diez³ and Francisco Sanchez-Madrid^{1,2*}

¹ Immunology Department, Hospital de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Madrid, Spain

² Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

³ Dermatology Department, Hospital de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Madrid, Spain

⁴ Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Madrid, Spain

*Correspondence to: Francisco Sanchez-Madrid, Immunology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Diego de Leon 62, 28006 Madrid, Spain. e-mail: fsanchez.hlpr@salud.madrid.org

Abstract

We have investigated the expression and role of galectin-1 and other galectins in psoriasis and in the Th1/Th17 effector and dendritic cell responses associated with this chronic inflammatory skin condition. To determine differences between psoriasis patients and healthy donors, expression of galectins was analysed by RT-PCR in skin samples and on epidermal and peripheral blood dendritic cells by immunofluorescence and flow cytometry. In the skin of healthy donors, galectin-1, -3 and -9 were expressed in a high proportion of Langerhans cells. Also, galectins were differentially expressed in peripheral blood dendritic cell subsets; galectin-1 and galectin-9 were highly expressed in peripheral myeloid dendritic cells compared with plasmacytoid dendritic cells. We found that non-lesional as well as lesional skin samples from psoriasis patients had low levels of galectin-1 at the mRNA and protein levels, in parallel with low levels of *IL-10* mRNA compared with skin from healthy patients. However, only lesional skin samples expressed high levels of Th1/Th17 cytokines. The analysis of galectin-1 expression showed that this protein was down-regulated in Langerhans cells and dermal dendritic cells as well as in peripheral blood CD11c⁺ DCs from psoriasis patients. Expression of galectin-1 correlated with IL-17 and IL-10 expression and with the psoriasis area and index activity. Addition of galectin-1 to co-cultures of human monocyte-derived dendritic cells with autologous T lymphocytes from psoriasis patients attenuated the Th1 response. Conversely, blockade of galectin binding increased IFN γ production and inhibited IL-10 secretion in co-cultures of monocyte-derived dendritic cells with CD4⁺ T cells. Our results suggest a model in which galectin-1 down-regulation contributes to the exacerbation of the Th1/Th17 effector response in psoriasis patients.

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: psoriasis; galectin; immunoregulation; skin dendritic cells; myeloid dendritic cells; plasmacytoid cells

Received 4 August 2011; Revised 22 December 2011; Accepted 15 January 2012

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Galectins are a family of highly-conserved glycan-binding proteins. Although initially described as mediators of developmental processes, members of the galectin family are now known to play important roles in the innate and adaptive immune responses [1,2]. Growing evidence indicates that galectin-1 (gal-1) functions as a negative regulator of the inflammatory response. *In vitro* studies revealed that gal-1 limits the immune response, eg promoting apoptosis of Th-1 cells, inducing IL-10 or down-regulating pro-inflammatory cytokines [3,4]. Exogenous gal-1 has immunosuppressive and anti-inflammatory effects in experimental models of inflammation and autoimmunity, such as inflammatory bowel disease, autoimmune

retinal disease, autoimmune diabetes and collagen-induced arthritis [5–8]. In addition, gal-1-deficient mice show augmented Th1 and Th17 responses and enhanced susceptibility to autoimmune neuroinflammation [3].

Similarly to gal-1, gal-9 down-regulates Th-1 and Th17 responses and is involved in the suppression induced by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells through interaction with the Th-1-specific cell surface molecule TIM-3 [9,10]. Studies in models of inflammatory disease, such as complex immune-induced arthritis, allergic asthma and diabetes, support an anti-inflammatory role for gal-9 [10–12]. Unlike gal-1, gal-3 can both positively and negatively regulate the inflammatory response, depending on factors such as the specific inflammatory conditions or the type of target cell [13].

Experimental evidence indicates an involvement of Th1 and Th17 responses in the pathogenesis of psoriasis [14]. Moreover, a recent study described a beneficial effect of gal-9 treatment in a model of IL-23-induced psoriasis-like skin inflammation [15]. To examine the potential role of galectins in the immunopathogenesis of psoriasis, we analysed the expression of gal-1, gal-3 and gal-9 in psoriasis patients and related this to the levels of Th1/Th17 cytokines. We show that expression of gal-1 is decreased in both epidermal dendritic cells (DCs) and peripheral blood myeloid DCs (PBDCs) from these patients. Functional assays showed that gal-1 inhibits the Th1 response in co-cultures of monocyte-derived DCs (moDCs) from psoriasis patients with autologous peripheral blood lymphocytes.

Materials and methods

Study subjects and sample collection

The study was approved by the institutional review board and the independent ethics committee of the Hospital Universitario de la Princesa and conformed to the Declaration of Helsinki principles. After giving informed consent, 10 healthy individuals and 24 untreated patients with moderate to severe psoriasis were enrolled. Patients recruited to the study had a psoriasis area and severity index (PASI) ≥ 10 or a body surface area (BSA) $\geq 10\%$. The following washout periods were established: 14 days for topical corticosteroids; 28 days for conventional systemic treatment, including corticosteroids, methotrexate, cyclosporin, acitretin and phototherapy; and 84 days for biological anti-TNF agents. Skin punch biopsies (10 mm) were obtained from lesional plaque-type psoriatic skin and non-lesional skin. Biopsies from non-lesional skin were at least 5 cm from a lesional plaque, taken preferentially from non-sun-exposed areas. In some cases, 20 ml venous peripheral blood were obtained. Normal skin and peripheral blood samples were obtained from 10 surgical patients without cutaneous disease. In addition, blood samples were obtained from long-term atopic dermatitis patients ($n = 6$, age 23–48 years; mild disease, $n = 3$; moderate disease, $n = 3$). Data regarding gender, age, duration of psoriasis and clinical disease severity (PASI and BSA) are presented in Table 1.

Table 1. Clinical characteristics of psoriasis patients and healthy subjects

| | Psoriasis patients | Healthy subjects |
|-----------------------|--------------------|------------------|
| Subjects (n) | 24 | 10 |
| Sex (M/F) | 13/11 | 4/6 |
| Age (years) | 49.7 (26–81) | 49.1 (44–69) |
| PASI | 20.76 (9.3–53) | |
| BSA (%) | 23 (10–90) | |
| Time of evolution (y) | 22.5 (8–63) | |

Results are expressed as median (interquartile range). M, male; F, female; PASI, psoriasis area and severity index; BSA, body surface area.

RT-PCR analysis of cytokines and lectins

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA (1 μ g) was used to generate cDNA. IL-17a, IL-21, IL-23, IL-12b, IL-10, IL-27, gal-1, gal-3, gal-4, gal-8, gal-9, dectin-1, DCIR and CLEC5A were amplified using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). mRNA was normalized to *GAPDH* levels. Primer sequences are shown in Table S1 (see Supporting information).

Double immunofluorescence staining and measurement of skin gal-1 expression

Skin biopsies were embedded in OCT and frozen. After fixation and permeabilization, skin sections were blocked with 100 μ g/ml human γ -globulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 5% fetal calf serum (FCS) in phosphate-buffered saline (PBS). Sections were incubated with anti-gal-1, anti-gal-3 anti-gal7 or anti-gal-9, all at 10 μ g/ml for 1 h and incubated with AlexaFluor 488-DAG. Mouse anti-human CD1a (T6), or anti-CD11c, biotin-coupled mouse anti-human MHC-class II (DCIS 1/21) and AlexaFluor 647-labelled rat anti-Langerin (Dendritics, Lyon, France) were also used. The sections were examined using Leica DMR immunofluorescence microscopy under the same acquisition conditions. Images were analysed with ImageJ (<http://imagej.softonic.com>) to quantify gal-1 expression. For the analysis of gal-1 expression, fluorescence intensity was determined in regions of interest (ROIs) drawn on CD1a⁺, Langerin⁺ or CD11c⁺, MHC class-II⁺ cells (for description of antibodies and other reagents, see Supporting information, Supplementary materials and methods).

Co-culture of moDCs with autologous PBLs

MoDCs from psoriasis patients preloaded with SEE (0.1 μ g/ml) were co-cultured with autologous PBLs (1 : 10) in the presence or absence of hgal-1 (2 μ M) for 5 days. Cells were harvested and intracellular levels of IFN γ were analysed in T cells using flow cytometry.

Flow cytometry and cell sorting

To analyse galectin surface expression on primary circulating DCs, PBMCs were stained with the following mouse anti-human monoclonal antibodies: PerCP-HLA-DR, FITC-CD3, FITC-CD14, FITC-CD16, FITC-CD19, FITC-CD20, PE-CD123 and V450-CD11c, and goat polyclonal anti-gal-1, anti-gal-3 or anti-gal-9 followed by AlexaFluor 647-DAG. Myeloid DCs (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs) were isolated from PBMCs by cell sorting in a FACSAria cell sorter. The DCs were lysed and galectin expression determined by western blot.

Epidermal and dermal single-cell suspensions from healthy skin donors were obtained after separation of epidermis and dermis as described [16]. Skin cell suspensions were stained with the following antibodies:

FITC-HLA-DR and PE-anti-CD1a, and anti-gal-1, anti-gal-3 or anti-gal-9 followed by AlexaFluor 647-DAG for epidermal cells; and Pacific blue-CD11c, Pacific orange-CD45, FITC-HLA-DR for dermal cells. Dead cells were excluded using 7-Amino-actinomycin D (7 ADD).

Statistical analysis

Data were analysed with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The Kruskal–Wallis test and Mann-Whitney *U*-test were used as appropriate. The Spearman test was used for correlation analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Galectin expression is defective in psoriatic skin

To explore the potential role of galectins in the immunopathogenesis of psoriasis, we conducted an RT–PCR analysis of the expression of *gal-1*, *gal-3*, *gal-4*, *gal-8* and *gal-9* and the lectins *DCIR*, *CLEC5A* and *dectin-1* in non-lesional and lesional skin samples from 24 psoriasis patients and control samples from 10 healthy subjects. Compared with the skin of healthy subjects, lesional and non-lesional skin biopsies from psoriasis patients showed low expression of *gal-1* mRNA (Figure 1A, $p < 0.05$). Levels of *gal-3* and *gal-4* were also low in lesional skin, but expression in non-lesional (asymptomatic) samples was similar to the level in skin from healthy patients. In contrast, *gal-8* and *gal-9* expression was similar in all three types of samples (Figure 1A). *Dectin-1* was detected at high level in lesional skin, in agreement with a recent report [17]. Conversely, we did not observe differences in the expression of *CLEC5A* and *DCIR*.

Increasing evidence suggests that effector Th1 and Th17 cells are key players in the pathogenesis of psoriasis [18]. In order to validate our skin samples, we analysed the mRNA expression of *Th1* and *Th17* cytokines. RT–PCR analysis revealed high expression of *IL-17a*, *IL-21*, *IL-12b* and *IL-23* in lesional skin of psoriasis patients compared with both non-lesional skin and skin samples from healthy donors ($p < 0.05$, Figure 1B; see also Supporting information, Figure S1). We found higher *IL-27* mRNA expression in lesional skin of psoriasis patients than in skin samples from healthy donors (see Supporting information, Figure S1), in agreement with previous data [19]. *IL-27* expression was also elevated in asymptomatic skin from psoriasis patients but this difference was not statistically significant. In contrast, expression of the anti-inflammatory cytokine *IL-10* was low in lesional and non-lesional skin from psoriasis patients compared with healthy donor skin ($p < 0.05$, Figure 1B). Statistical analysis showed that low levels of *gal-1*

are associated with high levels of *IL-17* ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.463$) and with low levels of *IL-10* ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.393$) (Figure 1C).

gal-1, *gal-3* and *gal-9* are expressed in Langerhans cells

Dendritic cells are central participants in immune mechanisms and abnormal activation and function of DCs are associated with several chronic inflammatory conditions, including psoriasis [20]. Despite the importance of galectins in immune response regulation, there has been little study of their role in human primary DCs. To study the immune regulatory function of *gal-1*, *gal-3* and *gal-9* in psoriasis, we examined their expression on skin DCs. Immunofluorescence analysis of MHC class-II⁺ cells in skin sections from healthy subjects revealed expression of *gal-1* and *gal-9* in MHC class-II⁺ stellate cells within the epidermis of healthy individuals, pointing to expression on Langerhans cells (LCs) (Figure 2A). *Gal-3* and *gal-7*, galectins characteristic of keratinocytes [21], were highly expressed on epidermal keratinocytes (Figure 2A). The high expression of *gal-3* by epidermal cells masks the possible expression of these galectins on MHC-class II epidermal cells. In addition, we analysed the expression of *gal-1*, *gal-3* and *gal-9* on LC isolated from epidermal sheets. Flow cytometry analysis clearly showed the expression of *gal-1*, *gal-3* and *gal-9* on LCs (CD1a⁺ cells gated for HLA-DR expression, Figure 2B).

gal-1 expression is reduced in Langerhans cells from psoriasis patients

Double-immunofluorescence staining of skin sections from psoriasis patients showed weak staining of *gal-1* on epidermal CD1a⁺ cells in comparison with healthy donors. To quantify this difference, we measured the mean fluorescence intensity of *gal-1* staining on CD1a⁺ epidermal cells in skin sections from eight psoriasis patients and eight healthy subjects (Figure 3A). This analysis showed that levels of *gal-1* are lower in epidermal CD1a⁺ DCs from lesional and non-lesional skin from psoriasis patients compared with healthy donor skin ($p < 0.05$) (Figure 3B). Recently, it has been described that a subpopulation of inflammatory dendritic epidermal cells (IDECs) are CD1a⁺ [16]. To assess the expression of *gal-1* specifically in LCs, three-colour immunostaining was performed (Figure 4A). The analysis of *gal-1* expression showed that LCs (langerin⁺ CD1a⁺) from psoriasis patients express low levels of *gal-1* compared with healthy donors (Figure 4B). The low levels of *gal-1* were also corroborated in total lysates of skin biopsies from two patients and two healthy donors by western blot (Figure 4C).

gal-1 expression in other populations of skin DCs

Due to the lower expression of *gal-1* in CD1a⁺ cells, we analysed whether there was a differential

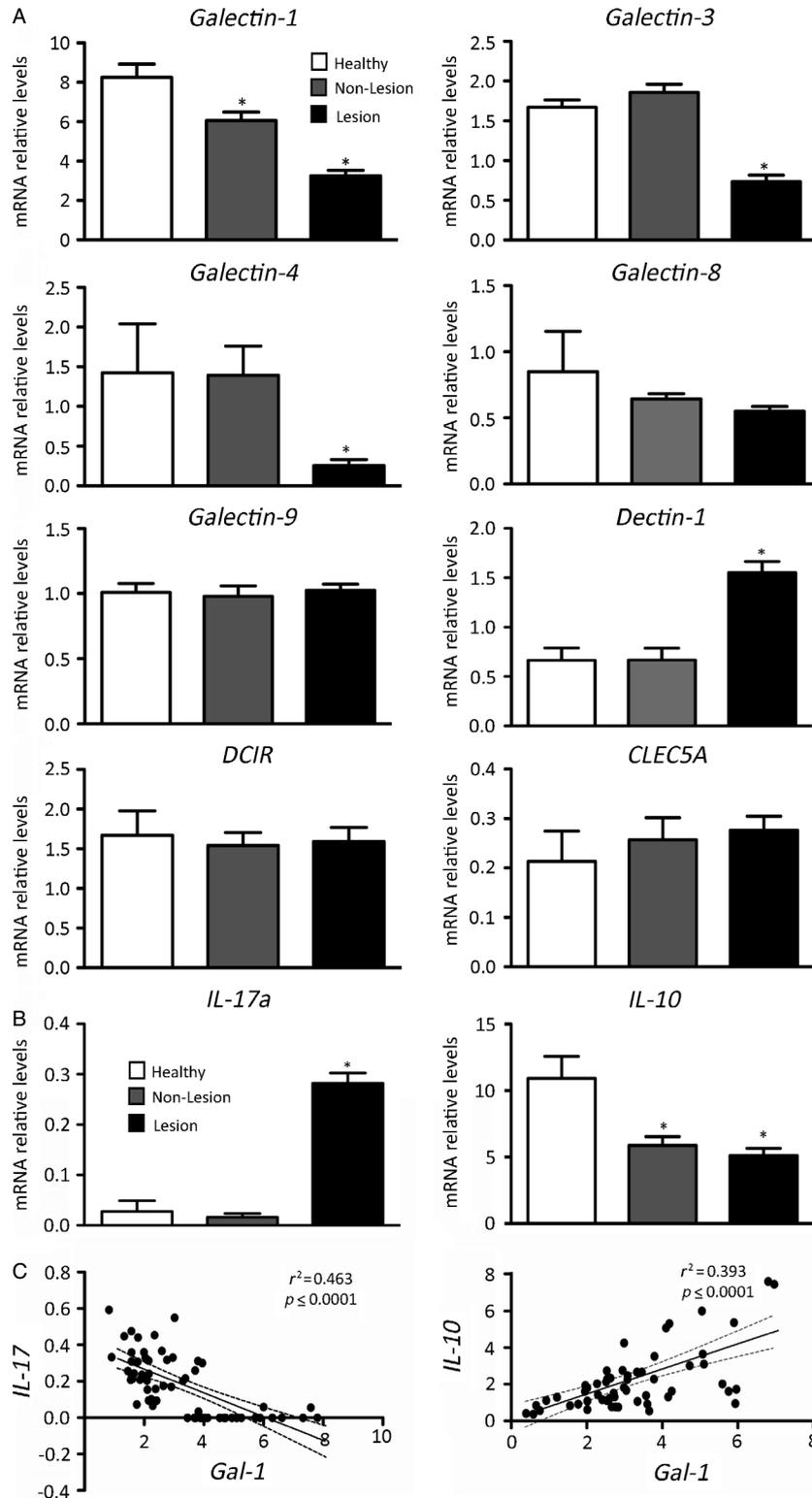


Figure 1. Lesional and non-lesional skin from psoriasis patients expresses low levels of gal-1 and IL-10. RT-PCR analysis of the indicated lectin (A) and cytokine (B) genes in non-lesional and lesional skin from psoriasis patients and healthy subjects; expression levels were normalized to *GAPDH*. Bars represent mean \pm SEM from 24 lesional (black), 24 non-lesional (grey) and 10 healthy samples (empty); differences between groups were analysed by the Kruskal–Wallis and Bonferroni tests (* $p < 0.05$ compared with healthy). (C) Correlation analysis of *gal-1*, *IL-17* and *IL-10* mRNA levels from lesional and non-lesional skin of psoriasis patients; the correlation was tested using the Spearman test.

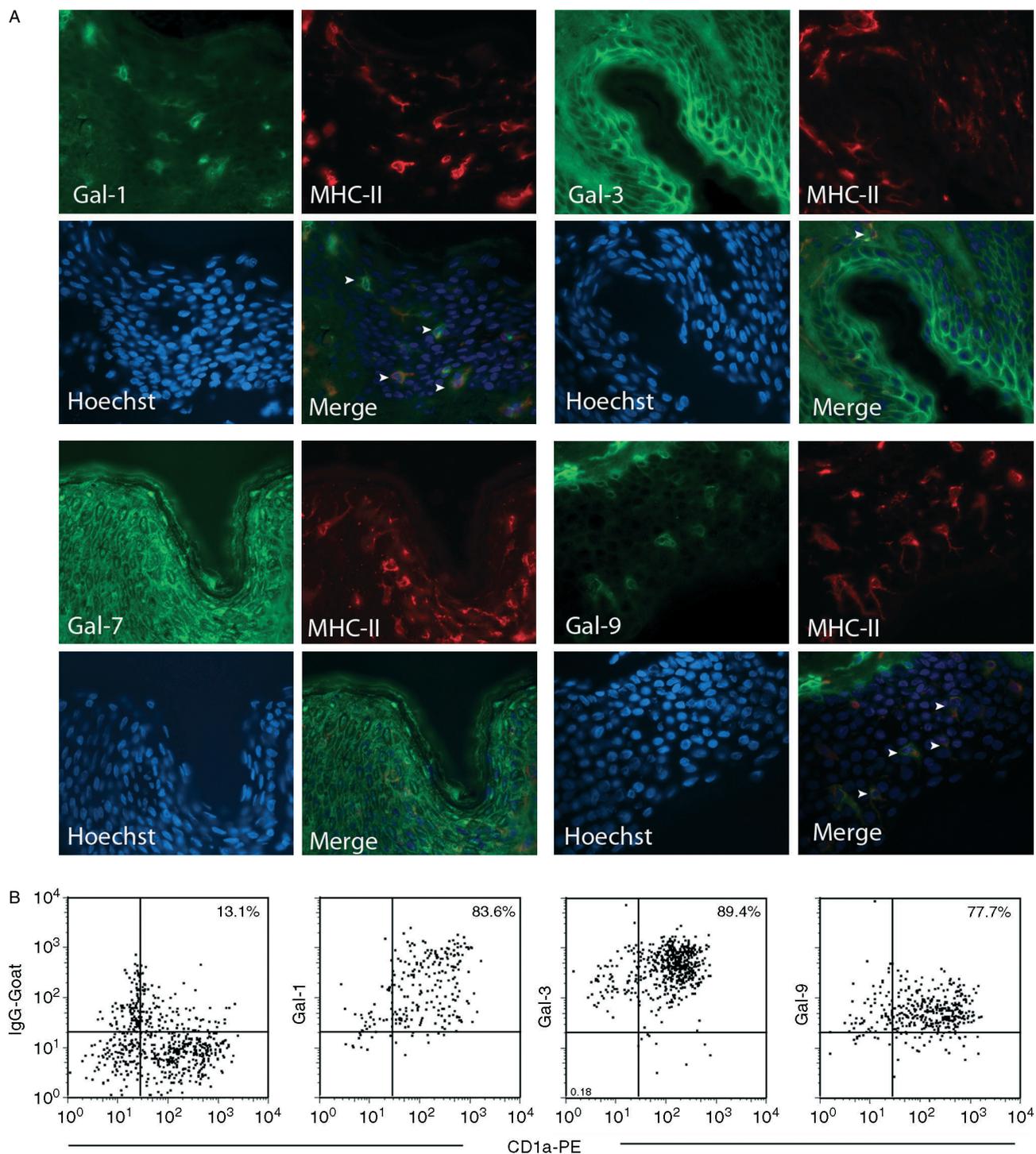


Figure 2. gal-1, gal-3 and gal-9 are expressed in Langerhans cells in normal skin. (A) Double immunofluorescence analysis of skin from a healthy subject for the expression of gal-1, -3, -7 or -9 (green) and MHC-II (red); nuclei were counterstained with Hoechst (blue); arrowheads mark galectin expression on LCs. (B) Three-colour flow cytometry analysis of galectin expression in DCs isolated *ex vivo* from the epidermal sheet of normal skin. Cells were gated for HLA-DR expression and galectin expression was then determined on CD1a⁺ cells.

expression between IDECs (CD1a⁺) and LCs. The analysis of gal-1 expression in four-colour immunostaining (MHC class-II, CD1a, langerin and gal-1) from lesional psoriatic skin revealed that IDECs express very low levels of gal-1 (Figure 5A). Dermal DCs (dDCs) are the other major population of skin DCs in healthy skin [22]. An additional population of inflammatory dermal DCs (CD11c⁺) has been recently described in

patients with psoriasis [23]. The analysis of galectin expression on dDCs by flow cytometry of DCs derived from healthy donor skin showed a mild expression of gal-1 and gal-9 (Figure 5B, and data not shown). Three-colour immunostaining (MHC class-II, CD11c and gal-1) of skin samples from psoriasis patients and healthy donors corroborated the low expression of gal-1 in dDCs in healthy donors (Figure 5B) and showed

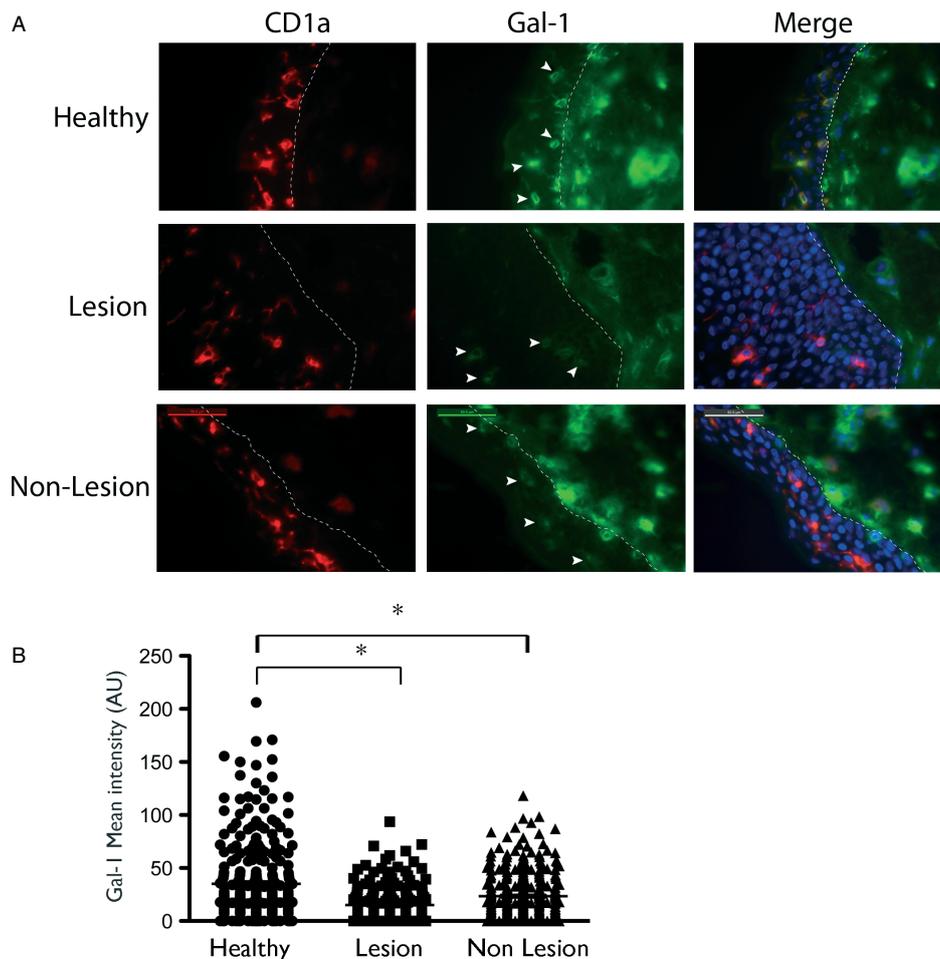


Figure 3. Epidermal CD1a⁺ cells from psoriasis patients express low levels of gal-1. (A) Immunofluorescence analysis of gal-1 expression in skin sections from a healthy donor and a psoriasis patient. Double immunofluorescence of CD1a (red) and gal-1 (green) is shown; arrowheads mark gal-1 expression on CD1a⁺ cells. (B) Quantification of gal-1 expression on CD1a⁺ cells. gal-1 signal intensity was measured on CD1a⁺ cells using ImageJ software. Data are mean \pm SD of fluorescence intensity from four psoriasis patients and four healthy controls; at least 50 cells were analysed for each section.

an even lower expression in psoriasis patients (see Supporting information, Figure S2).

Galectins are differentially expressed in peripheral DC subsets, and gal-1 expression is defective in peripheral DCs of psoriasis patients

Like skin, peripheral blood contains distinct DC populations. The main PBDC subsets are myeloid DCs (mDCs, CD11c⁺) and plasmacytoid DCs (pDCs, CD123⁺) [24]. These subsets differ in their origin, surface markers and functions [25]. FACS analysis of galectin expression in PBDCs from healthy donors revealed higher surface expression of gal-1, gal-3 and gal-9 on mDCs compared with pDCs (Figure 6A). In contrast, the immunoregulatory molecules ICOS and ICOSL showed no significant differences in expression. Higher expression of gal-1 and gal-9 in mDCs was also detected by western blot of mDCs and pDCs isolated from peripheral blood by cell sorting. We next determined whether galectin expression on peripheral blood mDCs was affected in psoriasis. Flow cytometry analysis revealed significantly lower gal-1 expression

on mDCs from psoriasis patients (Figure 6B). Correlation analysis between disease activity (PASI) and gal-1 expression in mDCs showed that higher disease activity indices are associated with lower levels of gal-1 (Figure 6C; $r^2 = -0.5662$, $p = 0.03$). Expression of gal-3 and gal-9 was also slightly lower, but these differences were not statistically significant. Levels of ICOS and ICOSL were similar in psoriasis patients and healthy subjects. To determine whether the reduced expression of gal-1 was also observed in other inflammatory skin conditions, gal-1 was analysed in peripheral mDCs from patients with atopic dermatitis. Our results showed that expression of gal-1 in mDCs from atopic patients is similar to the expression observed in healthy subjects (Figure 6D).

Inhibition of galectin binding increases IFN γ production and decreases IL-10 production by CD4⁺ T cells

gal-1 and gal-9 have been described as negative regulators of the Th1 immune response [3,26]. To assess this, we measured IFN γ and IL-10 production in co-cultures of CD4⁺ T cells with human moDCs preloaded with

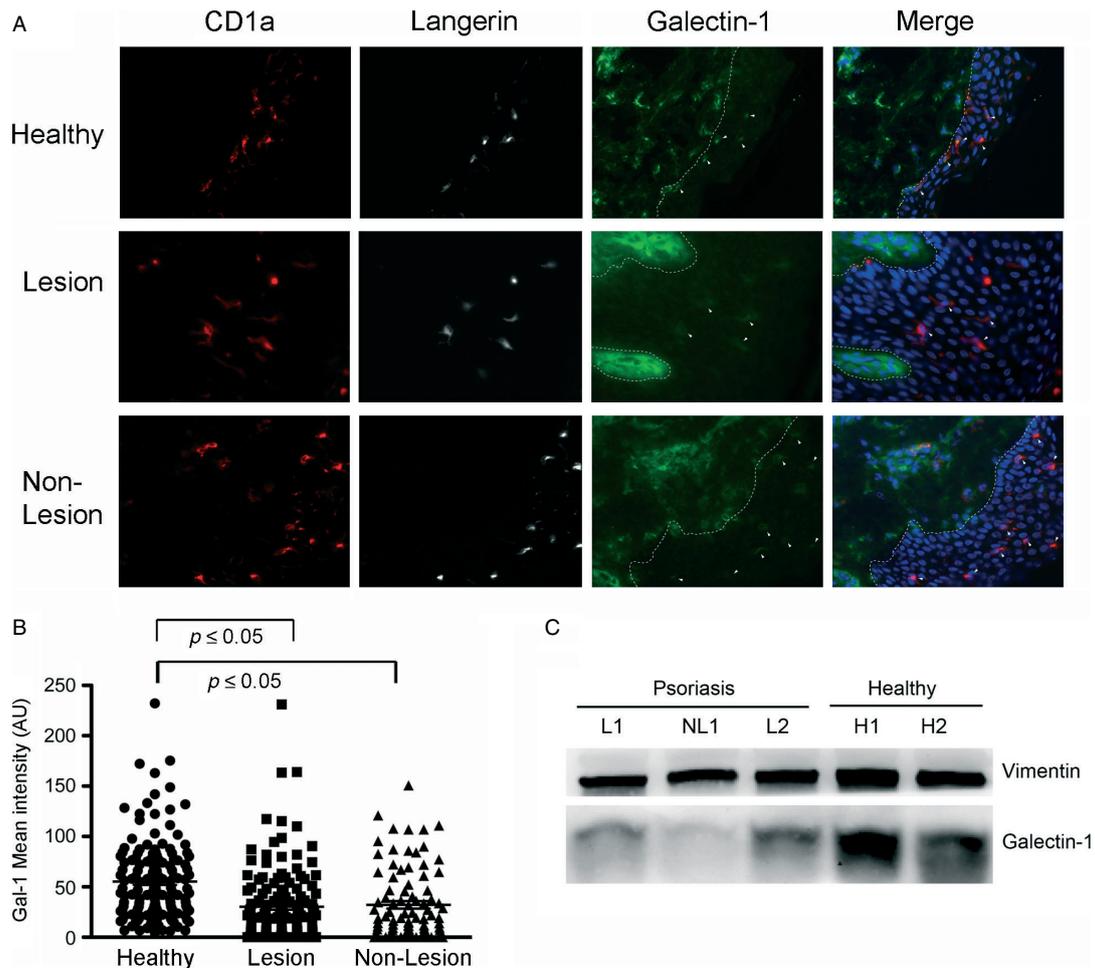


Figure 4. Langerhans cells from psoriasis patients express low levels of gal-1. (A) Immunofluorescence analysis of gal-1 expression in skin from a healthy donor and a psoriasis patient. Triple immunofluorescence of CD1a (red), langerin (white) and gal-1 (green) is shown; arrowheads mark gal-1 expression on LCs. (B) Quantification of gal-1 expression on Langerhans cells. gal-1 signal intensity was measured on CD1a⁺ langerin⁺ cells using ImageJ software; data are mean \pm SD of fluorescence intensity from four psoriasis patients and four healthy controls; at least 50 cells were analysed for each section. (C) gal-1 expression in total lysates of skin biopsies from two psoriasis patients (one from lesional and one from non-lesional skin) and two healthy donors. Vimentin expression was used as the loading control.

superantigen staphylococcal enterotoxin E (SEE) in the presence or absence of lactose (50 mM), an inhibitor of galectin binding. Intracellular staining revealed that inhibiting galectin binding augments IFN γ production by CD4⁺ T cells (Figure 7A) and inhibits IL-10 production induced by SEE (Figure 7A).

We next probed the ability of gal-1 to regulate IFN γ production in cells from psoriasis patients. moDCs from psoriasis patients were preloaded with SEE and co-cultured with autologous PBLs. Exogenously added gal-1 inhibited IFN γ production by T cells from psoriasis patients (Figure 7B). Western blot of total lysates of moDCs from psoriasis patients and healthy donors untreated or treated with LPS showed lower expression of gal-1 in cells from psoriasis samples (Figure 7C).

Discussion

In this study we showed that Langerhans cells and peripheral mDCs from psoriasis patients express low

levels of gal-1. In addition, gal-1 is able to reduce IFN γ secretion by lymphocytes from these patients. Current understanding of the exacerbated immune response observed in psoriasis and other inflammatory diseases is based mainly on the study of the up-regulation of pro-inflammatory molecules. Accordingly, several components of the pathways involved in T cell activation are well-established targets in psoriasis antibody-based therapies, eg anti-TNF α , anti-LFA-1, anti-LFA-3 and, more recently, anti-IL-12/IL-23 [14,27]. However, recent studies acknowledge the importance of anti-inflammatory signals that counterbalance the inflammatory response. Galectins are implicated in the negative regulation of the immune response, participating in processes such as immune cell proliferation [28], apoptosis [29], cellular adhesion and migration [30–32] and modulation of the interactions between T cells and antigen-presenting cells (APCs) [33].

This study shows that primary human skin DCs express gal-1, gal-3 and gal-9 on their cell surface. Moreover, we detected differential expression of gal-1 and gal-9 in peripheral blood myeloid and

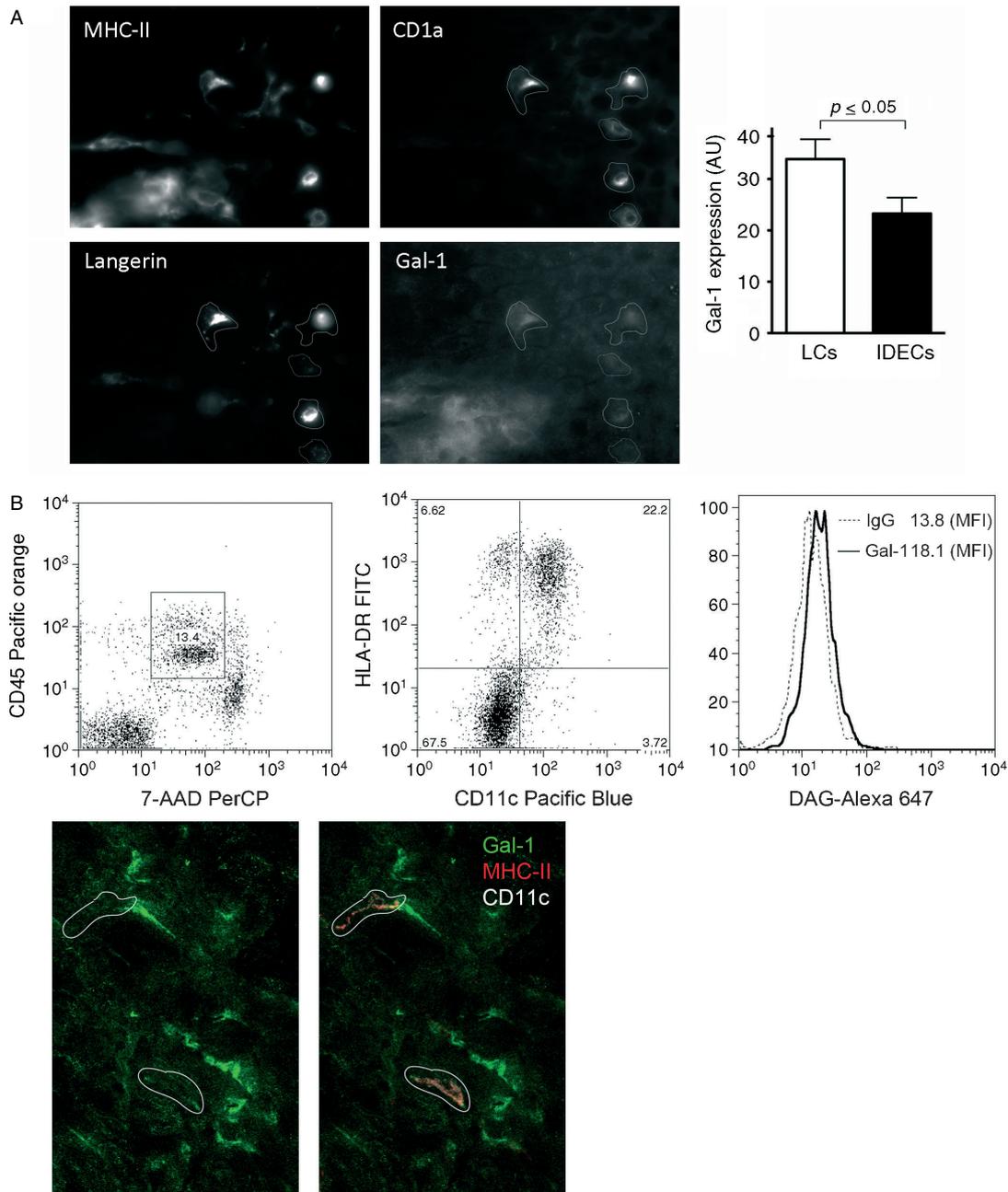


Figure 5. gal-1 expression in IDECs and dermal DCs (dDC). (A) Four-colour immunofluorescence of lesional skin from psoriasis patients. Skin samples were immunostained with anti-MHC class-II, anti-CD1a, anti-langerin and anti-gal-1. gal-1 signal intensity was measured, as in Figure 3, on MHC class II⁺ CD1a⁺ langerin⁺ cells (LCs) and MHC class-II⁺ CD1a⁺ langerin⁻ (IDECs). LCs are indicated by solid line and IDECs by dashed line regions. (B) Flow cytometry analysis of gal-1 expression in dDCs isolated *ex vivo* from the dermal sheet of normal skin. Data inside histogram correspond to mean fluorescence intensity (MFI). Three-colour immunofluorescence from a healthy donor skin biopsy stained with anti-gal-1 (green), anti-MHC class-II (red) and anti-CD11c (white) is shown. Regions indicate dDCs.

plasmacytoid DCs. Although additional studies would be necessary, differential expression of gal-1 and gal-9 might account for different functions in these cells.

The role of endogenous gal-1 in DCs has recently been studied in a mouse model of encephalomyelitis. gal-1, either exogenously supplied or regulated endogenously, drove the differentiation of DCs toward a regulatory function, promoting T cell tolerance [15,34]. Most evidence pointing to gal-1 as a negative regulator of the immune response has been gathered in animal models of inflammatory diseases, and studies

in human disease are comparatively scarce. Here, we demonstrate that psoriasis patients have low expression of gal-1 in peripheral blood myeloid DCs and in LCs of lesional and non-lesional skin that, together with previous studies in animal models [34], indicate an important role of gal-1 in the immunopathogenesis of psoriasis. The positive role of gal-1 in IL-10 production has been proposed as one of the mechanisms involved in the inhibition of Th1 and Th17 responses [34–36]. Our results are consistent with this notion and show that blockade of galectin binding reduces the levels of

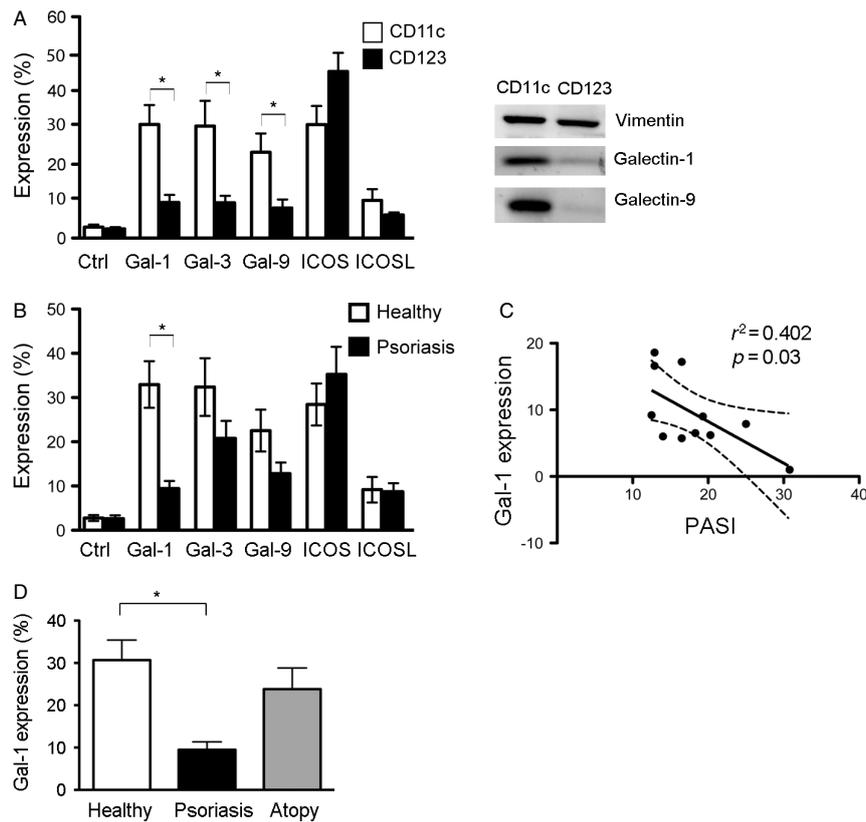


Figure 6. Peripheral blood myeloid DCs from psoriasis patients express low levels of gal-1. (A) gal-1, gal-3 and gal-9 are highly expressed in CD11c⁺ DCs compared with CD123⁺ DCs obtained from healthy donors, evaluated by flow cytometry. Data are mean \pm SEM from 14 independent experiments; gal-1 and gal-9 in total lysates from mDCs and pDCs isolated from peripheral blood by cell sorting. (B) Expression of regulatory molecules in mDCs from psoriasis patients and healthy subjects. Protein expression was determined in CD11c⁺ DCs by flow cytometry, as in (A); bars represent mean \pm SEM from 12 psoriasis patients and 14 healthy subjects. (C) Negative correlation of gal-1 expression in mDCs and disease activity (PASI) in psoriasis patients. Correlation between gal-1 expression and PASI was analysed by Spearman test. (D) gal-1 expression in mDCs from healthy subjects ($n = 14$), psoriasis patients ($n = 12$) and atopic dermatitis patients ($n = 6$); differences were analysed by the Mann–Whitney test, * $p < 0.05$.

IL-10 during antigen presentation. Together with the lower expression of IL-10 observed in psoriatic skin, these results indicate that defects in gal-1 expression by DCs may promote the Th1 and Th17 immune response in psoriasis, likely by controlling IL-10 expression.

The co-culture experiments showed that galectin inhibition increases IFN γ production by CD4⁺ T cells in response to antigen presentation by DCs, suggesting that galectins also regulate the production of pro-inflammatory cytokines. Interestingly, IFN γ production was decreased by addition of recombinant gal-1 to autologous co-cultures of PBLs with moDCs from psoriasis patients. The effects of gal-1 on T cells are likely due to the binding of cell-surface glycoproteins on these cells. A number of T cell glycoproteins, including CD2, CD3, CD7, CD45 and CD43, have been shown to act as receptors for gal-1 binding and to be involved in gal-1-mediated T cell death [37]. However, the absence of apoptosis induction at the doses used in our assays suggests a non-apoptotic mechanism and a gal-1 partner on activated T cells, not yet described. It is known that gal-1 is able to modulate the TNF α and IFN γ secretion without affecting cell viability [38]. The role of galectins in the pathogenesis of psoriasis may also be due to their effect on other

cell types. In this regard, gal-1 inhibited keratinocyte migration in a model of wound healing [39].

Dendritic cells are important for the induction not only of T-cell immunity but also of tolerance. The maintenance of peripheral tolerance has been proposed to involve LC migration to the draining lymph node during steady state. However, DC tolerogenicity is not specific to a DC subset or restricted to the immature APC state [40]. The means by which DCs convey tolerance are not entirely clear, but involve the secretion of suppressive cytokines, such as IL-10, and the induction of regulatory lymphocytes. The expression of specific galectin members on LCs and myeloid peripheral blood DCs may play an important role in the physiology of these cells.

Our data are consistent with a model in which galectin-1 expression and engagement limit skin inflammatory responses, and suggest that gal-1 down-regulation in human DCs may contribute to the exacerbation of the inflammatory response observed in psoriasis. The increased recognition of galectins as immunoregulatory molecules could lead to new therapeutic approaches to restoring the immune equilibrium lost in psoriasis.

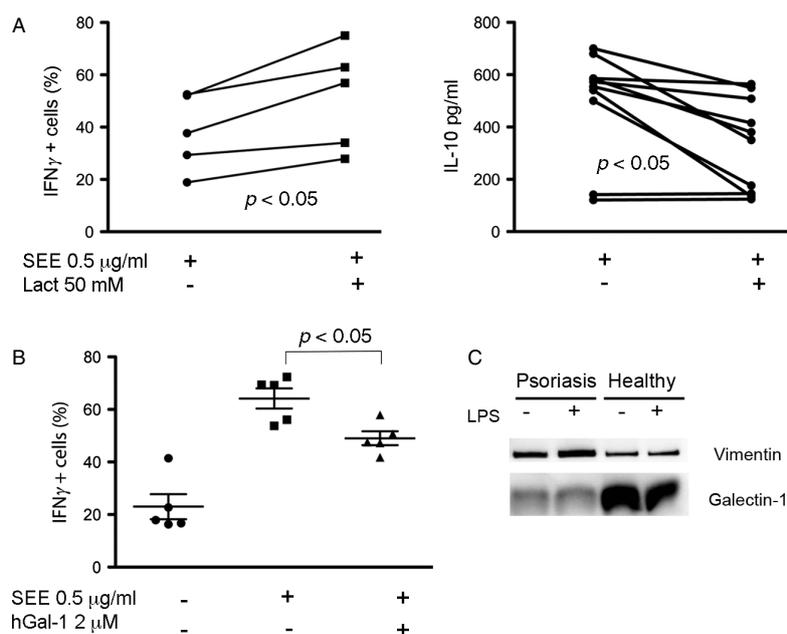


Figure 7. gal-1 inhibits IFN γ production in psoriasis patients. (A) Galectin inhibition increases IFN γ expression and decreases IL-10 production. SEE-preloaded moDCs and allogeneic CD4⁺ T cells, both from healthy donors, were co-cultured for 5 days in the presence or absence of lactose (50 mM), and intracellular levels of IFN γ ($n = 5$) and production of IL-10 ($n = 10$) were determined by flow cytometry and ELISA, respectively. Differences between treatments were analysed by paired *t*-test. (B) gal-1 partially inhibits IFN γ production by LT from psoriasis patients. SEE-preloaded moDCs and autologous LT from psoriasis patients were co-cultured for 5 days with or without 2 μ M gal-1, and intracellular levels of IFN γ were determined in CD4⁺ T cells by flow cytometry. Results from five psoriasis patients are shown; differences between treatments were analysed by the Kruskal–Wallis test. (C) gal-1 expression in total lysates of moDCs from one psoriasis patient and one healthy donor is shown. moDCs at 7 days, with or without LPS, were lysed and loaded on a 12% polyacrylamide gel.

Acknowledgment

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant Nos PI080946, SAF-2008-02635 and SAF-2011-25834) and in part by EU–Mexico FONCICYT (Grant No. C002-2009-1 ALA/127249), INSINET (Grant No. 01592006) and MEICA (Genoma España). We thank Dr Miguel Vicente Manzanares and Dr Manuel Gómez Gutiérrez for critical reading of the manuscript, and S. Bartlett for English editing.

Author contributions

HFF, conception and performance of experiments, generation of figures, literature search and writing the manuscript; SPG, patient recruitment, performance of experiments, literature search; PB, performance of experiments, generation of figures, literature search; ACA, performance of experiments, generation of figures; DNP and SSC, performance of experiments; MF, conception of experiments; ED, patient recruitment, writing the manuscript; AGD, study design, data interpretation; FSM, study design, data interpretation.

Abbreviations

APC, antigen-presenting cell; DC, dendritic cell; gal, galectin; LC, Langerhans cell; mDC, myeloid dendritic

cell; moDC, monocyte-derived dendritic cell; PASI, psoriasis area and severity index; PBDC, peripheral blood dendritic cell; pDC, plasmacytoid dendritic cell; SEE, superantigen staphylococcal enterotoxin E.

References

- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, *et al.* Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; **19**: 433–440.
- Rabinovich GA, Toscano MA. Turning ‘sweet’ on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 338–352.
- Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; **8**: 825–834.
- van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T, *et al.* Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J Pathol* 2004; **204**: 511–518.
- Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, *et al.* Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* 2006; **176**: 6323–6332.
- Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, *et al.* Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2003; **124**: 1381–1394.
- Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, *et al.* Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 1999; **190**: 385–398.
- Perone MJ, Bertera S, Tawadrous ZS, *et al.* Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *J Immunol* 2006; **177**: 5278–5289.

9. Seki M, Oomizu S, Sakata KM, *et al.* Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 2008; **127**: 78–88.
10. Chou FC, Shieh SJ, Sytwu HK. Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 2403–2411.
11. Katoh S, Ishii N, Nobumoto A, *et al.* Galectin-9 inhibits CD44–hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**: 27–35.
12. Arikawa T, Watanabe K, Seki M, *et al.* Galectin-9 ameliorates immune complex-induced arthritis by regulating FcγR expression on macrophages. *Clin Immunol* 2009; **133**: 382–392.
13. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009; **230**: 160–171.
14. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; **445**: 866–873.
15. Niwa H, Satoh T, Matsushima Y, *et al.* Stable form of galectin-9, a Tim-3 ligand, inhibits contact hypersensitivity and psoriatic reactions: a potent therapeutic tool for Th1- and/or Th17-mediated skin inflammation. *Clin Immunol* 2009; **132**: 184–194.
16. Fujita H, Shemer A, Suarez-Farinas M, *et al.* Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **128**: 574–582; e571–512.
17. de Koning HD, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems IM, *et al.* A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010; **130**: 2611–2620.
18. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23–Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 1339–1350.
19. Shibata S, Tada Y, Kanda N, *et al.* Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009; **130**: 1034–1039.
20. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 699–711.
21. Magnaldo T, Fowlis D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 1998; **63**: 159–168.
22. Chu CC, Di Meglio P, Nestle FO. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol* 2011; **23**: 28–41.
23. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, *et al.* Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 79–88.
24. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245–252.
25. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008; **29**: 352–361.
26. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1245–1252.
27. Ellis CN, Krueger GG. Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med* 2001; **345**: 248–255.
28. Blaser C, Kaufmann M, Muller C, *et al.* β-Galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 2311–2319.
29. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, *et al.* Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995; **378**: 736–739.
30. Norling LV, Sampaio AL, Cooper D, *et al.* Inhibitory control of endothelial galectin-1 on *in vitro* and *in vivo* lymphocyte trafficking. *FASEB J* 2008; **22**: 682–690.
31. Fulcher JA, Chang MH, Wang S, *et al.* Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling. *J Biol Chem* 2009; **284**: 26860–26870.
32. Cooper D, Norling LV, Perretti M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *J Leukoc Biol* 2008; **83**: 1459–1466.
33. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, *et al.* Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001; **409**: 733–739.
34. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009; **10**: 981–991.
35. Cedeno-Laurent F, Barthel SR, Opperman MJ, *et al.* Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation. *J Immunol* 2010; **185**: 4659–4672.
36. Kuo PL, Hung JY, Huang SK, *et al.* Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway. *J Immunol* 2011; **186**: 1521–1530.
37. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, *et al.* Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006; **16**: R 137–157.
38. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, *et al.* Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2000; **31**: 399–406.
39. Klima J, Lacina L, Dvorankova B, *et al.* Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiol Res* 2009; **58**: 873–884.
40. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 351–358.

SUPPORTING INFORMATION ON THE INTERNET

The following supporting information may be found in the online version of this article:

Supplementary materials and methods

Figure S1. Cytokine expression in skin biopsies from psoriasis patients and healthy donors by RT–PCR.

Figure S2. Quantification of gal-1 expression on dDCs.

Table S1. Sequence of primers used for RT–PCR.