

# Incremento de los niveles de IL-8 y MCP-1 en el fluido broncoalveolar de pacientes con proteinosis pulmonar alveolar

## Increased levels of IL-8 and MCP-1 in bronchoalveolar fluid of patients with alveolar pulmonary proteinosis

Glenda Ernst<sup>1</sup>, Tamara Décima<sup>1</sup>, Gabriela Tabaj<sup>2</sup>, Pedro Grynblat<sup>3</sup>, Fernando Galíndez<sup>3</sup>, Patricia Vujacich<sup>4</sup>, Alejandro Salvado<sup>1</sup>, Pablo Young<sup>5</sup>

### RESUMEN

La proteinosis pulmonar alveolar (PPA) es una enfermedad pulmonar intersticial (EPID) producida por alteraciones en la homeostasis de los surfactantes pulmonares. Estos pacientes presentan una interrupción en el proceso de señalización de GM-CSF, que altera numerosas funciones de los macrófagos alveolares. Se ha demostrado una disminución en la expresión de algunas citoquinas. Con el objetivo de comprender el rol de MCP-1 y de IL-8 en el reclutamiento de células hacia el espacio alveolar, se determinaron los niveles de estas citoquinas en muestras de fluido broncoalveolar de pacientes con PPA y se compararon los resultados con muestras de pacientes con EPID y de sujetos control. Se encontró un significativo aumento de IL-8 y de MCP-1 en pacientes PPA, comparados con los sujetos control; sin embargo, estas citoquinas no estuvieron significativamente aumentadas en la mayoría de las muestras de pacientes con EPID.

Si bien los resultados de este trabajo deben ser corroborados con nuevos estudios, los hallazgos mostraron que los pacientes con PPA presentaron un incremento significativo de células en el BAL. El significativo aumento de MCP-1 y de IL-8 en estos pacientes podría ser el responsable del mayor reclutamiento de células hacia el interior de los alvéolos.

**Palabras clave:** enfermedades pulmonares intersticiales, proteinosis pulmonar alveolar, quimiocinas, macrófagos.

### ABSTRACT

Pulmonary Alveolar Proteinosis (PPA) is an Interstitial Lung Disease (ILD) leading by alterations in the pulmonary surfactant homeostasis. These patients, present an interruption in the signaling process of GM-CSF, then, they present several alterations in different functions of the alveolar macrophages. It has shown a decrease in the expression of some cytokines.

In order to understand the role of MCP-1 and IL-8 in the recruitment of cells into the alveolar space; levels of these cytokines in samples of bronchoalveolar fluid of patients with PPA were determined and the results were compared with samples from ILD patients and control subjects.

We found a significant increase in levels of IL-8 and MCP-1 in patients with PPA, compared with control subjects, however these cytokines were not significantly increased in the rest of the patient with EPID.

Although, our results should be strengthened by new studies, our findings have shown that patients with PPA had a significant increase of cells in the BAL. The significant increase of MCP-1 and IL-8 in the samples from these patients could be related with the increase of the recruitment of cells into the alveoli space.

**Keywords:** interstitial lung diseases, pulmonary alveolar proteinosis, chemokines, macrophages.

Fronteras en Medicina 2017;12(4):132-136

### INTRODUCCIÓN

La proteinosis pulmonar alveolar (PPA) es una rara enfermedad cuya etiología se relaciona con alteraciones en la homeostasis de los surfactantes pulmonares. Constituye una entidad de las denominadas enfermedades pulmonares intersticiales de pulmón (EPID). Fue descrita por Samuel H. Rosen en 1958 y su incidencia es de 6.2 pacientes por millón de habitantes<sup>1-4</sup>.

Los surfactantes pulmonares están constituidos en un 90% por lípidos, principalmente fosfatidilcolina y en menor cantidad fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, esfingomielina y glucolípidos<sup>5</sup>. El otro 10% lo constituyen proteínas hidrofílicas (surfactantes SP-A y SP-D) e hidrofóbicas (SP-C y SP-D). Estas proteínas cumplen un rol importante tanto en el metabolismo de los surfactantes como en la respuesta inmunológica, ya que son capaces de opsonizar microorganismos y activar los macrófa-

1. Servicio de Neumología, Hospital Británico de Buenos Aires.
2. Servicio de Neumología, Hospital Cetrángolo.
3. Servicio de Endoscopia, Hospital María Ferrer.
4. Servicio de Endoscopia, Hospital de Clínicas José de San Martín.
5. Servicio de Clínica Médica, Hospital Británico de Buenos Aires.

Correspondencia: Dr. Pablo Young | Hospital Británico, Perdriel 74, C1280AEB CABA, Rep. Argentina | Tel 5411 43096400 Fax 5411 43043393 | pabloyoung2003@yahoo.com.ar

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 21/09/2017 | Aceptado: 16/10/2017

gos alveolares<sup>6</sup>. Tanto lípidos como proteínas son sintetizados por neumocitos tipo II. También se han encontrado glicosaminoglicanos (GAG) y glicoproteínas como constituyentes de los surfactantes pulmonares<sup>7</sup>. El metabolismo normal de los surfactantes pulmonares implica un recambio constitutivo. Los cuerpos lamelares serán secretados hacia el espacio alveolar, donde forman estructuras de surfactantes conocidas como mielina tubular. Los agregados de mielina se inactivan y forman nuevamente pequeños agregados, los cuales son reutilizados por neumocitos tipo II como fuente de precursores para re-sintetizar nuevamente surfactantes activos. Alrededor de un 30% de los surfactantes que se inactivan son fagocitados por macrófagos alveolares, en un proceso dependiente del factor de crecimiento de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF)<sup>8</sup>. Un déficit en GM-CSF impide el catabolismo de los surfactantes pulmonares, lo cual produce su acumulación, llenando el espacio alveolar y reduciendo el espacio para el intercambio gaseoso, circunstancia que lleva al cuadro clínico de la PPA.

Existen tres formas de presentación de esta enfermedad. Una forma congénita asociada a mutaciones en el gen que codifica para la cadena  $\beta$  del receptor de GM-CSF, otra forma secundaria tanto a desórdenes oncológicos y/o hematológicos, infecciones o inhalación de polvos inorgánicos como el sílice, y por último, la forma primaria debida a mecanismos autoinmunes donde se pueden encontrar anticuerpos neutralizantes contra GM-CSF<sup>9</sup>. La forma primaria es la más frecuente y corresponde al 90% de todas las presentaciones. Los pacientes con autoanticuerpos anti-GM-CSF poseen macrófagos alveolares gigantes cargados con acúmulos de surfactantes que son incapaces de depurar. La interrupción de la señalización de GM-CSF con su receptor altera numerosas funciones de los macrófagos, entre las cuales se destacan una disminuida expresión de algunos receptores de inmunoglobulinas, así como una menor capacidad de adhesión y de migración frente a estímulos quimiotácticos. Más aún, se postula que el acúmulo de material lipoproteico en su interior podría alterar la síntesis de algunas citoquinas<sup>8</sup>.

Thomassen y de Tracey han descripto previamente un significativo incremento de los niveles de IL-8 y de MCP-1 en muestras de lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes con PPA comparados con sujetos sanos<sup>10,11</sup>. Más aún, en modelos murinos de proteinosis también se ha reportado un significativo aumento de MCP-1<sup>12</sup>. Estos resultados sugerirían la participación de MCP-1 en la homeostasis pulmonar. Sin embargo, no se ha analizado si estos niveles son comparables con los hallados en otras EPID. El objetivo de este estudio fue analizar los niveles de MCP-1 y de IL-8 en relación con el número total de células en muestras de BAL de pacientes con PPA y comparar los resultados con muestras de pacientes con EPID y sujetos control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población.** Se utilizaron muestras de BAL de pacientes de un Hospital de referencia en Rehabilitación Respiratoria. Se incluyeron pacientes que requirieron una endoscopia para confirmar un diagnóstico presuntivo de EPID, o para evaluar la vía aérea por otras causas. Se utilizaron muestras de pacientes del Hospital María Ferrer, del Hospital Cetrángolo, del Hospital de Agudos de Formosa y del Hospital de Clínicas José de San Martín. Se utilizó como grupo control sujetos que luego de intubaciones prolongadas por traumatismos o accidentes desarrollaron estenosis de tráquea. Se utilizaron sujetos que requirieron una fibrobroncoscopia como control posquirúrgico de la estenosis traqueal. Solo se obtuvo BAL de las personas que, por baja tolerancia al procedimiento, requirieron anestesia general y estuvieron de acuerdo voluntariamente en participar de este estudio.

**Lavado broncoalveolar.** En los pacientes con EPID, se realizó el BAL en el lóbulo que presentó mayor compromiso tomográfico y en los sujetos control se realizó el BAL en el lóbulo medio. En ambos casos se instilaron 140 ml de solución fisiológica (SF) a temperatura ambiente (TA), administrada en bolos de 20 ml y recuperados con jeringa. Se juntaron todas las fracciones obtenidas en un *pool*, se homogeneizó y tomó una alícuota aproximadamente 15 ml (cuando la recuperación de BAL superó los 45 ml) para ser utilizado en este estudio. Este fluido fue filtrado con gases estériles para descartar mucosidades.

Para evitar la contaminación de la muestra con células bronquiales, se descartó la primera jeringa cuando se necesitó aspiración previa a la toma del BAL. Se descartaron las muestras sanguinolentas o con más de 5% de células epiteliales.

Respecto de los pacientes con PAP, se utilizaron, en la mayoría de los casos, muestras de lavado pulmonar total (LPT). En dos pacientes fue posible la realización de LPT. En uno de los pacientes, por la baja tolerancia al procedimiento, debió realizarse un lavado por segmentos (BAL secuenciales en diferentes segmentos pulmonares) y finalmente en una de las pacientes solo pudo realizarse un BAL. Durante la realización de los LPT, se utilizaron entre 8-14 litros de SF a TA; se lavó hasta que el líquido recuperado mostró escasa turbidez. Se tomaron muestras de cada fracción de lavado obtenidas tanto de los LPT, como del lavado por fragmentos, y todas ellas fueron analizadas.

Las muestras se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (RPM) durante 8 minutos. El sobrenadante (SN) libre de células recuperado fue fraccionado y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El *pellet* celular se lavó con SF, y solo en los pacientes con PPA se filtraron con un filtro (con un poro de  $40\ \mu\text{m}$ ) para descartar los detritos acelulares presentes en este tipo de muestras. Se realizaron los recuentos celulares en un microscopio óptico, utilizando una cámara de Newbauer. Se utilizó 0.4% de azul tripán para calcular la viabilidad

**Tabla 1.** Características descriptivas de cada grupo de pacientes con EPID y de los sujetos control. El estatus fumador: Nunca: pacientes que fumaron menos de 100 cigarrillos en toda su vida, Previo: pacientes que no fumaron ningún cigarrillo en los últimos 6 meses y Actual: pacientes fumadores al momento del estudio. FVC: capacidad vital forzada, TLC: capacidad vital pulmonar total y DLCO: difusión de monóxido de carbono. En esta tabla los valores mostrados representan la mediana y el intervalo intercuartil 25-75%. En los sujetos control solo se realizaron espirometrías.

| Grupos      | n  | Edad (años)       | Género                   | Test de función pulmonar |                     |                     | Estado fumador                      |
|-------------|----|-------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
|             |    |                   |                          | FVC (% teórico)          | TLC (% teórico)     | DLCO (% teórico)    |                                     |
| Control     | 15 | 31<br>(24-58)     | Mujeres: 7<br>Hombres: 8 | 90<br>(94-102)           | ND                  | ND                  | Nunca: 13<br>Previo: 1<br>Actual: 1 |
| NIU         | 6  | 69<br>(54,5-75,5) | Mujeres: 2<br>Hombres: 4 | 57,5<br>(50,0-65,0)      | 52<br>(45-59)       | 43,5<br>(36,5-52,5) | Nunca: 2<br>Previo: 4<br>Actual: 0  |
| NINE        | 4  | 63<br>(54,5-70,0) | Mujeres: 3<br>Hombres: 1 | 88<br>(74-115)           | 97<br>(65-100)      | 49<br>(37-59)       | Nunca: 4<br>Previo: 0<br>Actual: 0  |
| Sarcoidosis | 6  | 45<br>(36,5-50,0) | Mujeres: 4<br>Hombres: 2 | 78<br>(61-85,5)          | 81,5<br>(73,5-83,5) | 64<br>(43-83,5)     | Nunca: 1<br>Previo: 5<br>Actual: 0  |
| NH          | 12 | 56<br>(43,0-56,5) | Mujeres: 3<br>Hombres: 9 | 54<br>(44-74)            | 59<br>(47-78)       | 42<br>(34-47)       | Nunca: 9<br>Previo: 3<br>Actual: 0  |
| PPA         | 4  | 41<br>(33-45)     | Mujeres: 2<br>Hombres: 2 | 51<br>(36-76)            | 56<br>(56-79)       | 48<br>(19-52)       | Nunca: 2<br>Previo: 2<br>Actual: 0  |
| Hx          | 3  | 31<br>(21-42)     | Mujeres: 2<br>Hombres: 1 | 90<br>(90-95)            | 101,5<br>(97-106)   | 65,5<br>(56-75)     | Nunca: 0<br>Previo: 0<br>Actual: 3  |

**Determinación de IL-8 y MCP-1.** Se analizó el nivel de estas en el BAL de los pacientes y sujetos control. Para esto se utilizaron *kits* comerciales de R&D Systems y se procedió de acuerdo a las indicaciones del manual. Brevemente, se sensibilizaron placas Nunc-Maxisorp con anticuerpos monoclonales de captura para las distintas citoquinas durante toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con PBS-Tween al 0.05%, se bloquearon los pocillos sensibilizados con PBS-BSA al 3% y se incubaron junto con las muestras sin diluir durante toda la noche a 4°C. Luego se volvieron a realizar lavados con PBS-Tween y se incubaron con los anticuerpos de detección marcados con avidina-peroxidasa durante 1 hora a TA. Se lavó y se agregó la solución con el sustrato, se incubó 15 min a TA y se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4N). La lectura de las absorbancias se realizó con un detector de ELISA (Multiskan EX, Thermo Electron Corp.) a 450 nm. En cada caso se realizó su correspondiente curva estándar con los estándares provistos por el *kit*, en concentraciones de entre 500 a 16 pg/ml.

**Análisis estadístico.** Los datos fueron analizados mediante *tests* no paramétricos (Kruskal-Wallis y el *test* de comparaciones múltiples de Dunn). Para todos los análisis se utilizó el software GraphPad Prism 5. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando p fue menor que 0.05.

## RESULTADOS

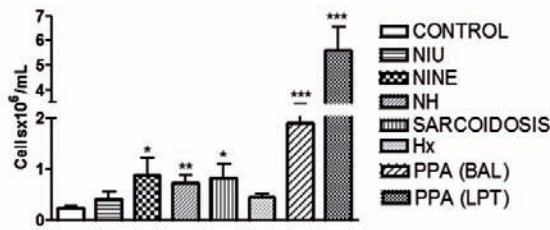
Los pacientes incluidos en este estudio eran de mediana edad, con predominio de hombres, cuya función pulmonar se encontró comprometida. En la **Tabla 1** se de-

tallan las características de cada grupo de pacientes y de los sujetos control.

Cuando se realizó el recuento celular en las muestras de BAL, se encontró una concentración total de células significativamente incrementada en los pacientes con neumonía intersticial no específica (NINE) ( $0.88 \pm 0.33 \times 10^6$  cél/ml;  $p < 0.05$ ), neumonitis por hipersensibilidad (NH) ( $0.74 \pm 0.17 \times 10^6$  cél/ml;  $p < 0.01$ ) y sarcoidosis ( $0.82 \pm 0.28 \times 10^6$  cél/ml;  $p < 0.05$ ) respecto de los sujetos control ( $0.23 \pm 0.04 \times 10^6$  cél/ml). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con neumonía intersticial usual (NIU) ( $0.42 \pm 0.14 \times 10^6$  cél/ml) e histiocitosis X (HX) ( $0.45 \pm 0.05 \times 10^6$  cél/ml). Los pacientes con PPA mostraron un significativo incremento tanto en el BAL ( $1.90 \pm 0.37 \times 10^6$  cél/ml) como en el LPT ( $5.64 \pm 0.90 \times 10^6$  cél/ml), en ambos casos con una  $p < 0.001$  (**Figura 1**). Se encontró un significativo aumento de IL-8 en pacientes PPA, tanto en el BAL como en el LPT, comparados con los sujetos control ( $224.4 \pm 19.5$  pg/ml y  $467.8 \pm 16.4$  ng/ml vs.  $75.78 \pm 12.47$  ng/ml;  $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) (**Figura 2A**). También se encontró un significativo aumento de MCP-1 en pacientes con PPA, en BAL y en LPT, respecto de los sujetos control ( $14500.0 \pm 58.3$  ng/ml y  $14586.0 \pm 899.8$  vs.  $701.3 \pm 197.1$  ng/ml;  $p < 0.001$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) (**Figura 2B**).

## DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el rol de otras quimiocinas en el reclutamiento celular hacia el BAL se determinaron los niveles de IL-8 y MCP-1. IL-8 es uno de

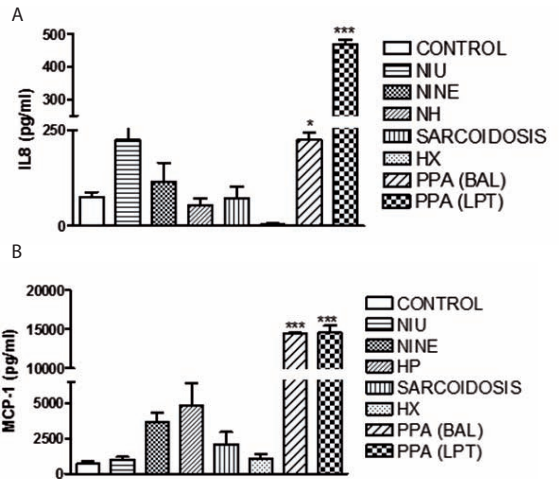


**Figura 1.** Recuento celular en el BAL de los pacientes con EPID y de los sujetos control. Encontramos un incremento en la cantidad de células en el BAL de los pacientes con EPID respecto de los sujetos control. Los datos representan la media y el error estándar. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

los principales quimioattractantes de neutrófilos y, en general, un aumento de la neutrofilia en el BAL de los pacientes con EPID está asociado a mal pronóstico. Algunos autores han reportado que macrófagos alveolares purificados a partir de BAL de pacientes con NIU, incubados *in vitro* responden aumentando la síntesis de IL-8<sup>13</sup>. Sin embargo, King et al. mostraron que los macrófagos alveolares provenientes de pacientes con fibrosis idiopática pulmonar expresan constitutivamente más IL-8 que los macrófagos purificados a partir de sujetos control<sup>14</sup>. En este estudio, solo se encontró un significativo incremento de IL-8 en los pacientes con NIU y con PPA. Este resultado, de acuerdo con lo publicado por King, apoya la idea de que IL-8 jugaría un rol clave en la patogenia de algunas EPID.

Ha sido estudiada la participación de otras quimiocinas en la patogenia de las EPID<sup>15</sup>. Shinoda et al., en coincidencia con los resultados obtenidos en este estudio, no encontró un aumento significativo de MCP-1<sup>13</sup>. Sin embargo, Suga et al. reportaron un aumento de MCP-1 en pacientes con sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis idiopática pulmonar y fibrosis idiopática pulmonar asociada a enfermedades vasculares del colágeno<sup>15</sup>.

La búsqueda de la utilización de diferentes quimiocinas



**Figura 2.** Niveles de quimiocinas en el BAL de pacientes con EPID comparados con sujetos control. (A) IL-8 y (B) MCP-1. Se analizó la concentración de las quimiocinas y se las comparó con las concentraciones halladas en las muestras control. Los datos representan la media y el error estándar, se utilizó para analizar los datos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

como factores que contribuyan como factores predictores de la fibrosis pulmonar o de las EPID ha dado lugar a un gran número de publicaciones. Es claro que estas enfermedades presentan un desbalance de quimiocinas, pero no hay evidencia de que MCP-1 contribuya a la patogenia de las EPID.

No se encontró correlación en este grupo de pacientes entre los niveles de MCP-1 y la cantidad de macrófagos presentes en el BAL; sin embargo, se encontró un significativo incremento de IL-8 y MCP-1 en el BAL de los pacientes con PPA respecto de los sujetos control. Es importante recordar que los pacientes con PPA presentaron un incremento significativo de células en el BAL. El significativo aumento de MCP-1 y de IL-8 en estos pacientes podría ser el responsable del mayor reclutamiento de células hacia el interior de los alvéolos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Rosen SH, Castleman B and Liebow AA. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 1958; 258: 1123-42.
- Seymour JF, Presneill JJ. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 215-35.
- Ernst G, Caro F, Botto HA, Young P. Pulmonary alveolar proteinosis: Analysis of 7 cases. *Med Clin (Barc)* 2016; 146: e71-72.
- Ernst G, Salvado A, Grynblat P, Tabaj G, Garcia O, Cambursano VH, Young P. Proteinosis alveolar pulmonar: rol de los anticuerpos anti-GM-CSF. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 2017; 74: 46-50. Review.
- Van Golde LMG, Batenburg JJ, Robertson B. The pulmonary surfactant system: Biochemical aspect and functional significance. *Physiol Rev* 1988; 68: 374-455.
- McNeely TB, Coonrod JD. Aggregation and opsonization of type A but not type B Hemophilus influenzae by surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 114-22.
- Crouch EC. Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 177-201.
- Trapnell B, Withsett J, Nakata K. Mechanism of diseases: Pulmonary Alveolar Proteinosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 2527-39.
- Khan A, Agarwal R. Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Respir Car* 2011; 56: 1016-28.
- Thomassen MJ, Yi T, Raychaudhuri B, Malur A, Kavuru MS. Pulmonary alveolar proteinosis is a disease of decreased availability of GM-CSF rather than an intrinsic cellular defect. *Clin Immunol* 2000; 95: 85-92.
- Bonfield TL, Russell D, Burgess S, Malur A, Kavuru MS, Thomassen MJ. Autoantibodies against granulocyte macrophage colony-stimulating factor are diagnostic for pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 481-6.
- Paine R, Morris SB, Jin H, et al. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: 1210-8.

13. Shinoda H, Tasaka S, Fujishima S, et al. Elevated CC chemokine level in bronchoalveolar lavage fluid is predictive of a poor outcome of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 2009; 78: 285-92.
14. Carré PC, Mortenson RL, King TE, et al. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1802-10.
15. Suga M, Iyonaga K, Ichiyasu H, Saita N, Yamasaki H, Ando M. Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 1999; 14: 376-82.