

A microscopic image of lung tissue, likely a bronchus, showing a central lumen surrounded by a thick, brown-stained wall. The staining highlights the cellular structure and possibly the presence of certain markers. The background is a lighter, purple-stained tissue.

Facultat de Medicina

Facultad de Medicina

Departament de Medicina Interna

Departamento de Medicina Interna

***Estudio de la expresión de NKG2D  
y su ligando MICA en el pulmón  
como factor de susceptibilidad a la  
Enfermedad Pulmonar Obstructiva  
Crónica***

*Tesis Doctoral*

***Albert Sánchez Font***

***2012***



*Estudio de la expresión de NKG2D y su  
ligando MICA en el pulmón como factor  
de susceptibilidad a la Enfermedad  
Pulmonar Obstructiva Crónica*

*Tesis Doctoral*

***Albert Sánchez Font***

**Director:** *Dr. Mauricio Orozco-Levi*

Profesor Asociado de Medicina, CEXS, Universitat Pompeu Fabra  
Jefe del Grupo de Investigación en Lesión, Respuesta Inmune y Función Pulmonar (LIF), IMIM  
Unidad de Dinámica Pulmonar para el Ejercicio, Rehabilitación y Hemodinámica Pulmonar  
Servicio de Neumología, Hospital del Mar – Parc de Salut Mar  
CIBER de Enfermedades Respiratorias

**Co-Director:** *Dr. Víctor Curull Serrano*

Profesor Asociado de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona  
Jefe de Sección de la Unidad de Endoscopia Respiratoria  
Servicio de Neumología, Hospital del Mar – Parc de Salut Mar  
CIBER de Enfermedades Respiratorias

2012





El **Dr. Mauricio Orozco-Levi**, Jefe Clínico del Servicio de Neumología del Hospital del Mar y Jefe del Grupo de Investigación en Lesión, Respuesta Inmune y Función Pulmonar,

### **CERTIFICA**

Que la Tesis Doctoral con el título "Estudio de la expresión de NKG2D y su ligando MICA en el pulmón como factor de susceptibilidad en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica" presentada por **Albert Sánchez Font** para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo mi dirección. Una vez finalizada autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que quede constancia a tales efectos, firmo la presente en Barcelona, a febrero del 2012.

Dr. Mauricio Orozco-Levi

El **Dr. Víctor Curull Serrano**, Jefe de Sección de la Unidad de Endoscopia Respiratoria del Hospital del Mar,

### **CERTIFICA**

Que la Tesis Doctoral con el título "Estudio de la expresión de NKG2D y su ligando MICA en el pulmón como factor de susceptibilidad en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica" presentada por **Albert Sánchez Font** para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo mi co-dirección. Una vez finalizada autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que quede constancia a tales efectos, firmo la presente en Barcelona, a febrero del 2012.

Dr. Víctor Curull Serrano

EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
FEV <sub>1</sub>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FVC	Capacidad vital forzada
ATS	American Thoracic Society
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
SEPAR	Sociedad Española de patología respiratoria
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIB	Producto interior bruto
BALT	Linfocitos B del tejido linfoideo del bronquio
NK	células <i>Natural Killer</i> o citotóxicos naturales
Th	Linfocitos T colaboradores o CD4+
Tc	Linfocitos T citotóxicos o CD8+
Ts	Linfocitos T supresores o reguladores
TCR	Receptor de linfocitos T
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
HLA	<i>Human leucocyte antigens</i>
mIg	Inmunoglobulina de membrana
TNF	Factor de necrosis tumoral
AcM	Anticuerpo monoclonal
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CMV	Citomegalovirus
DC	Célula dendrítica
DAP10	Proteína activadora DNAX de 10 kDa
DAP12	Proteína activadora DNAX de 12 kDa
EBV	Virus de Epstein-Barr
FcR	Receptor del fragmento cristalizable de las inmunoglobulinas
IFN	Interferón
IL	Interleucina
Ig	Inmunoglobulina
Ig-SF	Superfamilia de las inmunoglobulinas
ILT	<i>Ig-like transcripts</i>
NKG2D	Natural Killer Group 2D
hsp70	<i>Heat shock protein 70</i> humana
KIR	Receptor de células citotóxicas con dominios Ig
KLR	Receptores de células citotóxicas tipo lectina
LIR	Receptores de leucocitos con dominio Ig

NCR	Receptores de citotoxicidad natural
NKR	Receptores de las células citotóxicas naturales
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rADCC	Citotoxicidad natural dependiente de anticuerpo reversa
SHP	Fosfatasa con dominios SH2
TAP	Transportadores en la presentación de antígenos
TCR	Receptor de células T



Los trabajos que constituyen la presente Tesis Doctoral han sido subvencionados por las siguientes ayudas en investigación:

- Beca SOCAP obtenida en 2004 con una duración de 1 año para el proyecto de investigación "Expressió de MIC-A en l'epiteli bronquial com a factor de susceptibilitat en el pacient amb malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC)".

(IP: Albert Sánchez Font)

- Beca del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) obtenida en 2005 con el número FIS PI05/2438 y con una duración de 3 años para el proyecto "Expresión de moléculas MIC-A en el epitelio bronquial de fumadores: ¿un marcador de la susceptibilidad a la EPOC?".

(IP: Mauricio Orozco-Levi)

- Beca BECARIO SEPAR obtenida en 2005 con una duración de 1 año para el proyecto de investigación "Expresión de moléculas MIC-A en el epitelio bronquial de fumadores: ¿un marcador de la susceptibilidad a la EPOC?".

(IP: Albert Sánchez Font)

- Becas en forma de ayuda para estancias en el extranjero (SEPAR, FUCAP y SOCAP), durante 1 año, en el Hospital Fred Hutchinson (Seattle) obtenidas en el año 2007 y siendo Mauricio Orozco-Levi el beneficiario.

- Beca del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) obtenida en 2008 con el número FIS PI08/1612 y con una duración de 3 años para el proyecto "Estudio multicéntrico EMICON: Deterioro de la inmunovigilancia antitumoral en fumadores con alto riesgo de cáncer pulmonar: papel de las moléculas MIC-A circulantes".

(IP: Mauricio Orozco-Levi)

# 0. Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)</b> .....	<b>13</b>
1.1.1 Definición de EPOC .....	13
1.1.2 Clasificación de la gravedad de la EPOC .....	13
1.1.3 Datos epidemiológicos .....	15
1.1.3.1 Prevalencia .....	15
1.1.3.2 Morbilidad .....	16
1.1.3.3 Mortalidad .....	17
1.1.3.4 Impacto socioeconómico de la EPOC .....	18
1.1.3.5 Factores de riesgo .....	18
1.1.4 Etiopatogenia de la EPOC .....	21
<b>1.2 El sistema inmune</b> .....	<b>23</b>
1.2.1 La respuesta inmune .....	23
1.2.2 El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) .....	26
<b>1.3 MICA y su receptor NKG2D</b> .....	<b>32</b>
1.3.1 Las moléculas MICA.....	32
1.3.2 Polimorfismo de los genes MIC .....	33
1.3.3 El receptor NKG2D .....	35
1.3.4 Señalización a través de NKG2D .....	36
1.3.5 Papel del NKG2D en la activación y co-estimulación .....	38
1.3.6 Ligandos de NKG2D .....	39
1.3.7 Estudios estructurales sobre las interacciones con NKG2D .....	39
1.3.8 Papel del NKG2D en la patogénesis de tumores y otras enfermedades ....	40

1.3.9 Sobre-expresión de ligandos de NKG2D en células inmunes activadas .....	43
1.3.10 Sobre-expresión de ligandos de NKG2D en células infectadas .....	43
1.3.11 Estímulos conocidos y mecanismos moleculares que activan la expresión del ligando de NKG2D .....	44
1.3.12 Aspectos inmunológicos de la EPOC y potencial papel de la interacción MICA-NKG2D .....	46
<b>Hipótesis de trabajo .....</b>	<b>49</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
3.1 Material .....	51
3.2 Pacientes .....	53
3.3 Anticuerpos primarios y secundarios .....	57
3.4 Fundamento de las técnicas .....	58
3.4.1 Fundamento del método de la avidina-biotina peroxidasa .....	58
3.4.2 Fundamento de la inmunohistoquímica para RAET1, proSCP y Casp3.....	59
3.4.3 Fundamento de la inmunohistoquímica para MICA .....	60
3.4.4 Fundamento de la técnica de <i>Western blot</i> .....	63
3.4.5 Fundamento de la microscopía láser confocal y de la citometría de flujo .....	64
3.4.6 Fundamento de los cultivos celulares de los alvéolos de ratón .....	65
3.4.7 Fundamento de la exposición al humo del tabaco .....	66
3.4.8 Fundamento de la preparación de los linfocitos de ratón y ensayos de citotoxicidad .....	67
3.4.9 Fundamento de los ratones transgénicos RAET1-Tg .....	67
3.4.10 Fundamento de la depleción de linfocitos <i>in vivo</i> , ensayos de bioactividad de la caspasa y PCR cuantitativa en tiempo real .....	70

3.4.11 Fundamento de la obtención de lavado broncoalveolar (LBA) y recuento celular .....	71
3.4.12 Fundamento de la caracterización de los linfocitos pulmonares .....	71
3.4.13 Fundamento del funcionalismo pulmonar .....	72
3.4.14 Fundamento de la tomografía computarizada (TC) torácica.....	72
3.4.15 Fundamento de la fibrobroncoscopia con obtención de la biopsia bronquial y procesamiento de la pieza quirúrgica en toracotomía .....	73
3.4.16 Fundamento de los cultivos celulares de tejido pulmonar humano y citometría de flujo .....	74
<b>3.5 Análisis estadístico .....</b>	<b>75</b>
<b>3.6 Protocolos .....</b>	<b>76</b>
3.6.1 Técnica de la avidina-biotina peroxidasa preinclusión para microscopía de luz.....	76
3.6.2 Técnica de <i>Western blot</i> .....	78
3.6.3 Técnica de la tinción con Ac anti-MICA .....	79
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1 El humo del tabaco induce la síntesis de ligandos de NKG2D en el epitelio pulmonar de ratón .....</b>	<b>80</b>
<b>4.2 El ligando de NKG2D induce en epitelio alveolar la activación de las células activadoras de linfocitos T <i>in vitro</i> .....</b>	<b>82</b>
<b>4.3 La sobreexpresión de ligandos de NKG2D en ratones transgénicos induce enfisema pulmonar .....</b>	<b>84</b>
<b>4.4 La sobreexpresión de ligandos de NKG2D en ratones transgénicos induce apoptosis y activación de las células estimuladoras de linfocitos T, pero no inflamación .....</b>	<b>87</b>
<b>4.5 La elevada expresión del ligando NKG2D en el pulmón de los pacientes afectados de la EPOC se asocia al desarrollo de dicha enfermedad .....</b>	<b>89</b>
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>97</b>

5.1 Introducción.....	97
5.2 MICA, ligando de NKG2D, no se expresa por defecto en el epitelio bronquial....	98
5.3 Expresión de MICA y exposición al humo del tabaco.....	99
5.4 La expresión de MICA en el epitelio bronquial y alveolar se relaciona con la presencia de la EPOC .....	100
5.5 Consideraciones respecto a la ausencia de MICA en algunos fumadores y algunos pacientes con la EPOC: ¿se puede explicar?.....	102
5.6 La expresión de los ligandos de NKG2D tiene una relación causa-efecto con la EPOC.....	104
5.7 Comentarios respecto del factor iniciador del trastorno del sistema MICA en la EPOC.....	106
5.8 Comentarios respecto de la ausencia de exclusividad de la alteración de MICA y la EPOC.....	106
5.9 El sistema MICA-NKG2D puede representar una nueva diana terapéutica en la EPOC.....	107
5.10 Especificaciones respecto al papel del doctorando en las investigaciones incluidas en la memoria de la tesis doctoral.....	110
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>112</b>
<b>8. PUBLICACIONES.....</b>	<b>127</b>
<b>9. COMUNICACIONES A CONGRESOS.....</b>	<b>141</b>

## 1. Introducción

### 1.1 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

#### 1.1.1. DEFINICIÓN DE EPOC (1)

La GOLD (del inglés *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) define la EPOC como una enfermedad prevenible y tratable, con afectación sistémica extrapulmonar que puede contribuir a la gravedad en algunos pacientes. El componente pulmonar se caracteriza por una limitación al flujo de aire que no es completamente reversible. Esta limitación al flujo de aire es por lo general progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria pulmonar anómala a partículas o gases nocivos.

La limitación crónica al flujo de aire se debe a la afectación de las pequeñas vías aéreas (bronquiolitis obstructiva) y a la destrucción parenquimatosa (enfisema). La contribución relativa de cada uno de estos dos factores varía de un individuo a otro. La limitación al flujo de aire se mide con la espirometría, que es la prueba de mayor disponibilidad y reproductibilidad para el estudio de la función pulmonar.

#### 1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA EPOC

La espirometría es esencial para el diagnóstico y proporciona una descripción de la gravedad de las alteraciones anatomopatológicas producidas por la EPOC. La obstrucción al flujo aéreo se define mediante la espirometría cuando el cociente volumen espiratorio forzado en el primer segundo/capacidad vital forzada ( $FEV_1/FVC$ ) tras broncodilatación es menor de 0,7 (o por debajo del límite inferior de la normalidad en personas mayores de 60 años). La gravedad de la obstrucción se categoriza a partir del grado de disminución del  $FEV_1$  porcentual (%) al valor de referencia según

grupo étnico, género, edad, peso y talla, evaluado en fase de estabilidad clínica. Esta clasificación difiere ligeramente dependiendo de las sociedades autoras de los consensos. En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la clasificación del último consenso de la ATS (del inglés *American Thoracic Society*) y la ERS (del inglés *European Respiratory Society*) del año 2004 (2) (Tabla 1.1.1). Aunque también existen otras clasificaciones como la de la SEPAR o Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (3,4) (Tabla 1.1.2).

Los síntomas característicos de la EPOC son la disnea, la tos y la expectoración, de evolución crónica y progresiva. La tos crónica y el aumento de la expectoración frecuentemente preceden en varios años al desarrollo de la limitación del flujo de aire, lo que ofrece una oportunidad única para identificar fumadores y otros individuos con factores de riesgo para desarrollar la EPOC e intervenir en estadios más tempranos de la enfermedad. Sin embargo, algunos individuos desarrollan una limitación importante al flujo de aire sin presentar síntomas de tos ni de aumento de la expectoración.

<b>GRAVEDAD DE LA EPOC</b>	<b>%FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	<b>%FEV<sub>1</sub> (% VALOR DE REF.)</b>
<b>En Riesgo</b>	> 70	> 80
<b>Leve</b>	< 70	> 80
<b>Moderado</b>	< 70	51-80
<b>Grave</b>	< 70	30-50
<b>Muy Grave</b>	< 70	< 30

**Tabla 1.1.1. Clasificación de la gravedad de la EPOC según ATS-ERS 2004.**

Celli BR., et al. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of ATS/ERS position paper. Eur Respir J 2004; 23:932-946.

<b>GRAVEDAD DE LA EPOC</b>	<b>%FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	<b>%FEV<sub>1</sub> (% VALOR DE REF.)</b>
<b>Leve</b>	< 70	≥ 80
<b>Moderado</b>	< 70	50-79
<b>Grave</b>	< 70	30-49
<b>Muy Grave</b>	< 70	< 30

**Tabla 1.1.2. Clasificación de la gravedad de la EPOC según SEPAR 2007.**

Peces-Barba G., et al. Guía clínica SEPAR-ALAT de diagnóstico y tratamiento de la EPOC. Arch Bronconeumol 2008; 44:271-281.

### 1.1.3. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

La definición imprecisa y variable de la EPOC ha hecho difícil cuantificar la prevalencia, morbilidad y mortalidad de esta enfermedad. Todavía existe hoy en día una subestimación de la EPOC debido a la falta tanto de conocimiento como de diagnóstico de la enfermedad. Esta subestimación es variable entre los países dependiendo del conocimiento que exista sobre la enfermedad entre los profesionales de la salud, las autoridades sanitarias y la disponibilidad de medicación para su tratamiento (5).

#### 1.1.3.1. PREVALENCIA

Según estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2007, unos 210 millones de personas padecían la EPOC en todo el mundo. De ellas, 80 millones se encontraban afectados de una forma moderada o grave de la enfermedad (6).

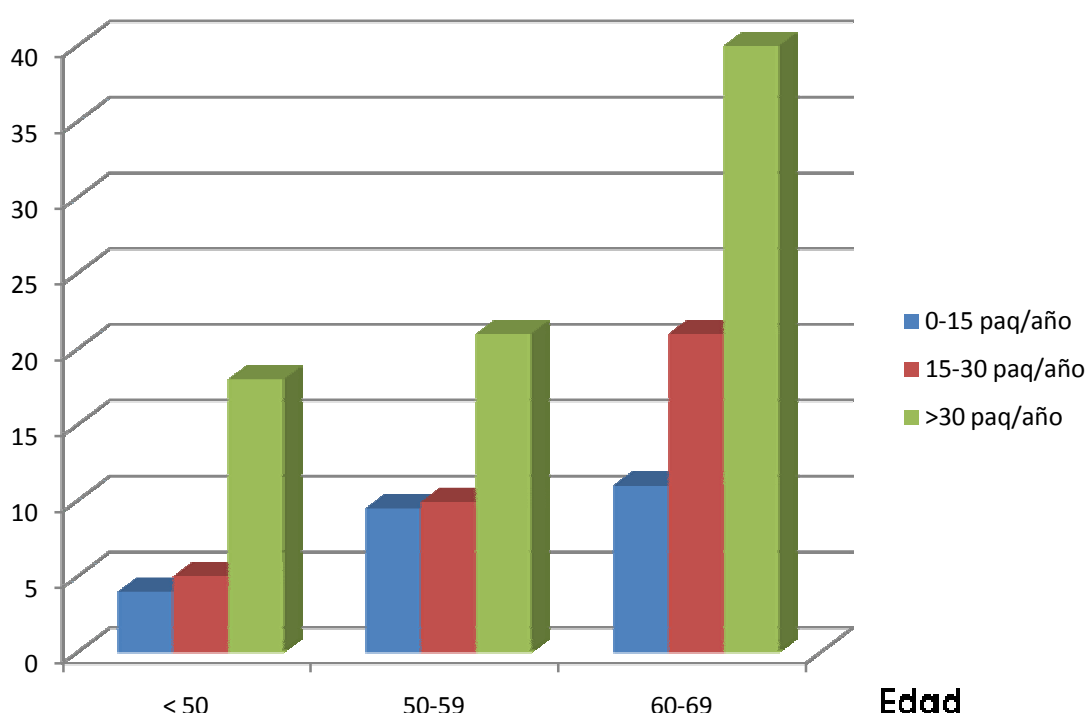
El estudio IBERPOC, uno de los más importantes realizados en España entre los años 1996 y 1997, identificó una prevalencia de la EPOC del 9,1% de la población adulta entre los 40 y 70 años (un 14,3% en hombres y un 3,9% en mujeres). Según el



hábito tabáquico, la prevalencia fue del 15% en fumadores, del 12,8% en exfumadores y del 4,1% en no fumadores (Fig. 1.1.1). Además, en el estudio IBERCOP también se demostraba que en un 78,2% de los casos confirmados por espirometría no existía un diagnóstico previo (7).

En el ámbito de Catalunya la prevalencia es similar (7%) a la del resto del Estado, con una incidencia mayor también en el género masculino (8).

### EPOC (%)



**Figura 1.1.1. Prevalencia de la EPOC en España por grupos de edad y consumo acumulado de tabaco. Estudio IBERPOC.** Adaptado de V. Sobradillo-Peña et al. Arch Bronconeumol 1999; 35:159-66.

#### 1.1.3.2. MORBILIDAD

Los datos sobre morbilidad surgen de las consultas médicas, de las visitas a los servicios de urgencias y de las hospitalizaciones. Aunque la información sobre la morbilidad es menor y menos fiable que la referente a la mortalidad, los datos

disponibles indican que la morbilidad debida a la EPOC aumenta con la edad y es mayor en hombres que en mujeres (9). Debido a que generalmente la enfermedad no se diagnostica ni recibe tratamiento en los estadios iniciales (EPOC leve y moderado) no queda registrada en las historias clínicas de estos pacientes. La morbilidad por EPOC puede estar asociada a otras comorbilidades como, por ejemplo, enfermedades músculo-esqueléticas y diabetes mellitus, que si bien no están directamente relacionadas con la EPOC, afectan negativamente al estado de salud del paciente y pueden interferir con el tratamiento de la enfermedad (10). En pacientes con enfermedad avanzada (EPOC grave y muy grave) la morbilidad puede ser atribuida erróneamente a otra patología.

#### 1.1.3.3. MORTALIDAD

Según la OMS, la EPOC todos los años provoca la muerte de al menos 2,9 millones de personas, siendo una de las causas más importantes de mortalidad en la mayoría de los países desarrollados. El Estudio del Impacto Global de las Enfermedades (11,12) ha estimado que la EPOC pasará de ser la quinta causa de muerte en 1990 a ser la tercera causa de mortalidad en 2020 a escala mundial. Este aumento en la mortalidad se debe a la epidemia de tabaquismo y a un cambio en las características demográficas en la mayoría de los países, debido a una mayor esperanza de vida de la población. Por su parte, la OMS prevé que en 2030 la EPOC será la responsable del 7,8% de todas las muertes y del 27% de las muertes relacionadas con el tabaco, sólo superada por el cáncer (33%) y por las enfermedades cardiovasculares (29%) (13). En este contexto cabe destacar que el riesgo de padecer cáncer de pulmón, la neoplasia que provoca una mayor mortalidad, y enfermedades cardiovasculares aumenta significativamente en quienes padecen EPOC.

Según los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística referentes a 2002, esta enfermedad supone la quinta causa de muerte entre los varones y la

séptima para las mujeres. Se estima que cada año mueren en España más de 18000 personas a causa de la EPOC.

#### 1.1.3.4. IMPACTO SOCIOECONÓMICO DE LA EPOC

La EPOC es una enfermedad de elevado coste económico. En los países desarrollados, las exacerbaciones de la enfermedad generan el mayor impacto sobre el sistema de salud. En la Unión Europea se ha estimado que un 6% del presupuesto total en salud corresponde a costes directos por enfermedades respiratorias, y el 56% de éste por EPOC (38.6 billones de euros) (14). Existe una relación directa entre la gravedad de la enfermedad y los costes sanitarios y la distribución de los costes cambia a medida que la enfermedad progresa.

Basándose en las estadísticas estatales y en los datos epidemiológicos, un análisis económico de la EPOC en España ha estimado que el coste total de esta enfermedad es de 841,42 millones de euros. El coste directo por paciente y año alcanza los 1876 euros de promedio, correspondiendo a la hospitalización el 43,8%, a los medicamentos el 40,8% y a las visitas y pruebas diagnósticas el 15,4% del total de los costes por paciente (15).

#### 1.1.3.5. FACTORES DE RIESGO

El humo del tabaco es el principal factor de riesgo para la EPOC, pero no es el único. Estudios epidemiológicos han puesto en evidencia que individuos no fumadores también pueden desarrollar obstrucción crónica al flujo de aire (16,17).

Entre los factores de riesgo cabe destacar también:

##### a) Genes:

El factor genético mejor documentado es el déficit hereditario de la enzima alfa-1-antitripsina (18). Se trata de una alteración recesiva poco frecuente, que puede presentarse en individuos del norte de Europa (19). Una variedad de genes han sido

implicados en la patogenia de la enfermedad, sin embargo, los resultados de los estudios sobre los genes asociados a la EPOC, a excepción del déficit de alfa-1-antitripsina, son inconsistentes (20).

b) Exposiciones:

Humo del tabaco: Los fumadores de cigarrillos presentan una prevalencia más alta de anomalías de la función pulmonar y síntomas respiratorios, una mayor proporción anual de reducción del FEV<sub>1</sub> y una tasa de muerte por EPOC superior a la de los no fumadores. No todos los fumadores desarrollan una EPOC clínicamente significativa, lo cual sugiere que los factores genéticos deben modificar el riesgo individual (21). Aunque múltiples estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la relación entre tabaco y EPOC, cabe destacar el trabajo de Fletcher (22), quien demostró el diferente comportamiento que ante el consumo de tabaco experimentaron los distintos grupos del estudio. Así, mientras un grupo de individuos no modifican la fisiológica disminución que su FEV<sub>1</sub> experimenta con el paso del tiempo, otro grupo de fumadores muestra la aparición y progresión de la enfermedad, correlacionándose con el número de cigarrillos consumidos. Así pues, se estableció el concepto de pacientes susceptibles al humo del tabaco (un 15% de las personas), aunque se desconoce cuál es la causa que lo determina y, lo que es más importante, se estableció la clara relación existente entre tabaquismo y EPOC. La exposición pasiva al humo del tabaco también puede contribuir a padecer síntomas respiratorios y EPOC (23), por el incremento de la carga total de partículas y gases inhalados (24,25). Fumar durante el embarazo también puede poner en riesgo al feto, afectando el crecimiento intrauterino y al desarrollo del pulmón y, posiblemente, condicionando el sistema inmunológico (26).

Polvos y sustancias químicas laborales: La exposición laboral puede incluir polvos orgánicos e inorgánicos, sustancias químicas y vapores. Según la ATS entre el 10

y el 20% de los síntomas o anomalías funcionales de la EPOC serían causados por la exposición laboral a algunas de estas sustancias (27).

Contaminación ambiental en espacios abiertos y cerrados: La contaminación en espacios cerrados o pobremente ventilados, a partir de combustibles utilizados para cocinar y calentar, que afecta en particular a mujeres en países en vías de desarrollo, ha sido implicada como factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC. La evidencia en este sentido crece (28-30) y se dispone de estudios de caso-control (30,31) que lo confirman. El alto grado de contaminación ambiental urbana también es nocivo para los individuos con enfermedades cardíacas o pulmonares pero el papel de esta contaminación ambiental como causa de EPOC es incierto.

c) Género:

Estudios muy recientes realizados en países desarrollados (32) demuestran que la prevalencia de la EPOC es casi igual en hombres que en mujeres, lo que probablemente refleje los cambios en los hábitos tabáquicos. Por otra parte, algunos estudios han sugerido que las mujeres son más susceptibles a los efectos del humo del tabaco (33,34).

d) Infecciones:

El antecedente de infecciones respiratorias graves en la infancia se ha asociado a una reducción de la función pulmonar y a un incremento de los síntomas respiratorios en la edad adulta (35). No obstante, las infecciones víricas pueden vincularse a otro factor, como el bajo peso al nacer, el cual se relaciona por sí mismo con el desarrollo de la EPOC.

e) Situación socioeconómica:

Distintas evidencias demuestran que el riesgo de desarrollar la EPOC se encuentra inversamente relacionado con la situación socioeconómica (36). Sin embargo, no se ha aclarado si esta situación refleja la exposición a contaminantes

ambientales, el hacinamiento, la mala alimentación u otros factores relacionados con la situación socioeconómica.

#### **1.1.4. ETIOPATOGENIA DE LA EPOC**

Las alteraciones anatomopatológicas características de la EPOC pueden encontrarse en las vías aéreas centrales y periféricas, en el parénquima y en la circulación pulmonar. Estas alteraciones anatomopatológicas son responsables de los cambios fisiológicos característicos de la enfermedad y de los síntomas que presentan los pacientes. Por ejemplo, el descenso del FEV<sub>1</sub> es debido principalmente a la inflamación y estrechamiento de las vía aéreas periféricas, mientras que la destrucción parenquimatosa en el enfisema reduce la capacidad del pulmón para el intercambio gaseoso, provocando hipoxemia e hipercapnia. La magnitud del proceso inflamatorio, de la fibrosis y los exudados intraluminales se correlacionan con la disminución del FEV<sub>1</sub> y de la relación FEV<sub>1</sub>/FVC que caracteriza funcionalmente a la EPOC. En general, al progresar la enfermedad la capacidad del pulmón para realizar el intercambio gaseoso disminuye y aparece la hipertensión pulmonar de grado leve o moderado, que se produce por vasoconstricción hipóxica de las arteriolas pulmonares.

Existe un proceso inflamatorio crónico con aumento de células inflamatorias específicas que conlleva ciclos repetidos de lesión y reparación de la pared de la vía aérea responsables del remodelado estructural. Generalmente, la inflamación y el remodelado aumentan con la severidad de la enfermedad y persisten al abandonar la exposición al tabaco. La inflamación pulmonar en los pacientes afectados de EPOC parece ser una respuesta ampliada de la respuesta inflamatoria normal del pulmón a irritantes como el humo del tabaco. No se conoce todavía con exactitud el mecanismo por el que se produce esta respuesta, pero podría estar determinada genéticamente.

Una revisión crítica sobre el tema (37) demuestra que todos los fumadores presentan inflamación en la vía aérea pero que sólo un porcentaje de los mismos (15-20%) cumple criterios espirométricos de EPOC y que la inflamación pulmonar persiste tras el abandono del hábito tabáquico (38). Por otra parte, se sabe que la mayoría de las células inflamatorias (leucocitos, macrófagos, células *natural killer* [NK]) y citocinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) están implicados en esta respuesta inflamatoria, pero su peso relativo y relación mutua son todavía desconocidos (39). La persistencia de la respuesta inflamatoria en la EPOC tras el abandono del hábito tabáquico sugiere la existencia de un proceso de auto-perpetuación de la enfermedad que impide la resolución de la respuesta inflamatoria tras el cese del estímulo que la originó (tabaco). Este tipo de mecanismo se ha relacionado con la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes (40), pero se desconoce si puede estar operativo en la EPOC. Tradicionalmente se ha reconocido que la respuesta inmune innata juega un papel importante en la patogénesis de la EPOC, ya que los neutrófilos y los macrófagos son células efectoras importantes en estos pacientes (41). Sin embargo, el posible papel de la respuesta inmune adquirida ha sido ignorado, a pesar de que existen evidencias, indirectas, que lo sugieren. Entre ellas destacan las siguientes: a) los linfocitos CD4+ y CD8+ (células propias de la respuesta inmune adquirida) se acumulan en el pulmón de pacientes con EPOC y b) los linfocitos B (estirpe celular también característica de la respuesta inmune adquirida) del tejido linfoideo del bronquio (BALT) se encuentran aumentados en fumadores y en pacientes con EPOC (42).

Una respuesta inmune anómala puede ser debida a un defecto en la selección, regulación o muerte de células inmunológicas (linfocitos T o B), o a la generación de nuevos antígenos, propios o extraños (43). Ambas posibilidades podrían darse en la EPOC a través de diferentes mecanismos. El tabaco, por ejemplo, modula la proliferación y muerte de linfocitos (44), pudiendo generar así nuevos epitopos, ya sea por la oxidación de proteínas (45) o, indirectamente, a través de la alteración de la limpieza de células inflamatorias apoptóticas (46). De esta forma se estimula la

población de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas) en los pulmones (47), amplificando la capacidad de procesar nuevos antígenos. Además, la colonización bronquial bacteriana que pueden presentar los pacientes con EPOC (48) podría ser fuente de nuevos antígenos. También las infecciones víricas (49) y el estrés oxidativo (50) creado por circunstancias ambientales externas pueden contribuir al desarrollo de nuevos epítomos.

Existen, pues, muy diversos argumentos que permiten plantear de forma plausible la posibilidad de una alteración de la respuesta inmune en la EPOC.

## **1.2. EL SISTEMA INMUNE**

### **1.2.1. LA RESPUESTA INMUNE**

Los seres superiores defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones, esencialmente externas. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un sistema inmune. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y madura y se consolida en los primeros años de vida fuera del seno materno.

Entendemos por respuesta inmune todos aquellos eventos desarrollados por dicho sistema con el objetivo de defender la integridad biológica del individuo frente a cualquier agresión (estímulo antigénico). La respuesta inmune puede ser de tipo inespecífica o innata y específica o adquirida.

La respuesta inespecífica o innata es la primera barrera defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa. La respuesta específica o adquirida se desarrolla exclusivamente frente a la sustancia extraña que indujo su iniciación y en ella participan prioritariamente los linfocitos y las sustancias liberadas por los mismos, anticuerpos y citoquinas.



Todas las sustancias que poseen la capacidad de estimular al sistema inmune se conocen como antígenos y las partes del mismo que tienen capacidad inmunógena, se denominan epítomos.

#### RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA O INNATA

Consiste en una serie de elementos moleculares (proteínas reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva o el complemento, los interferones y otras citoquinas) y celulares (células fagocíticas mononucleares, polimorfonucleares neutrófilos y células *natural killer*) dotados de distintos grados de poder microbicida o microbiostático directo o indirecto. Todos ellos carecen de capacidad de reconocimiento específico y se hallan siempre presentes dispuestos a actuar.

#### RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA O ADQUIRIDA

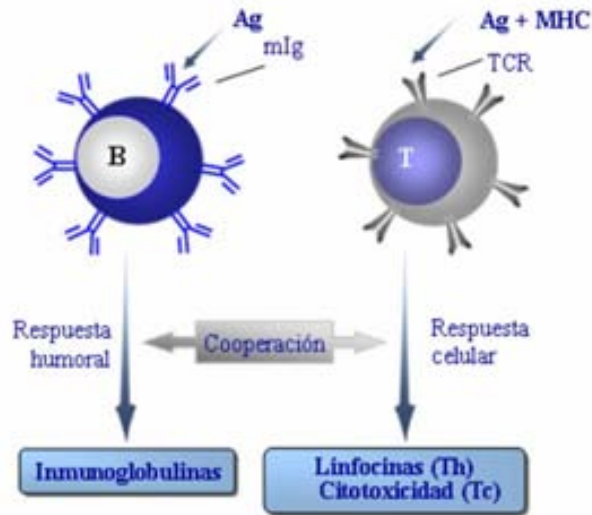
Este tipo de respuesta es mediada por linfocitos y otras células como células dendríticas y macrófagos y es efectiva ante aquellos antígenos frente a los cuales se ha iniciado y desarrollado.

Los linfocitos son de dos tipos: linfocitos B y linfocitos T. Los linfocitos T, a su vez, pueden ser linfocitos T colaboradores (Th o CD4+), linfocitos T citotóxicos (Tc o CD8+) y por algunos autores también se han propuesto linfocitos T supresores/reguladores (Ts o Treg).

La respuesta inmune específica se considera que puede ser de dos tipos: humoral, cuando los elementos implicados son los linfocitos B y la celular, cuando participan prioritariamente los linfocitos T, tanto colaboradores como citotóxicos.

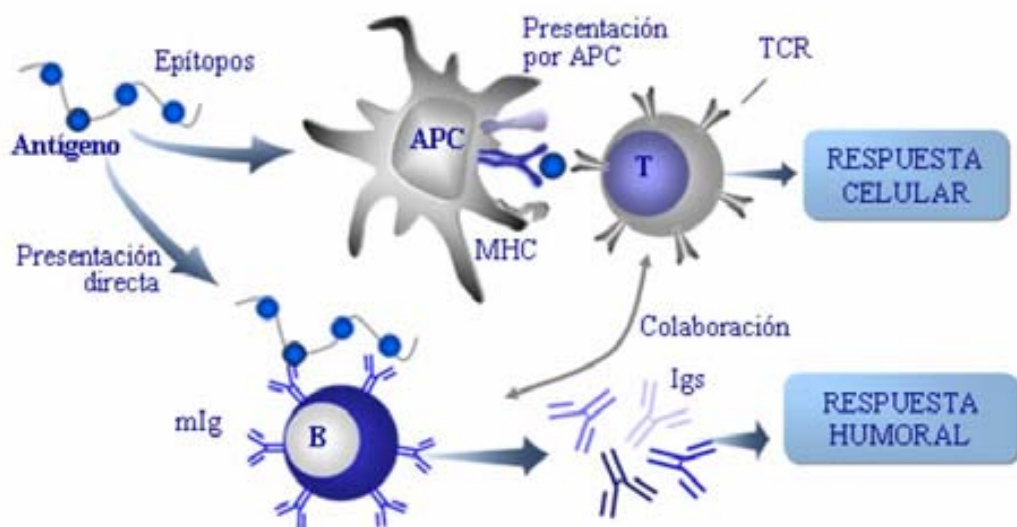
Los linfocitos B reconocen el antígeno mediante inmunoglobulinas de membrana (mIg) mientras que los linfocitos T lo reconocen mediante el receptor de linfocitos T (TCR). La activación de los linfocitos B conduce a la síntesis de inmunoglobulinas mientras que la activación de los linfocitos T colaboradores o

citotóxicos desencadena la producción de linfocinas o la lisis celular, respectivamente (Fig. 1.2.1).



**Figura 1.2.1. Reconocimiento del antígeno.** Adaptado de J. Peña y A. Cabello. Inmunología, 2003.

Para que los linfocitos T puedan reconocer al antígeno, éste debe ser presentado por las células presentadoras de antígeno (APC) y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de estas células en el seno de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Fig. 1.2.2).



**Figura 1.2.2. Presentación del antígeno.** Adaptado de J. Peña y A. Cabello. Inmunología, 2003.

### 1.2.2. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH) (51)

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) humano también es conocido con las siglas HLA (*Human Leukocyte Antigens*). Ocupa en el genoma humano unos 2-3 cm, que corresponden a unos 4 millones de pares de bases (un 0.8% del genoma) situadas en una región del brazo corto del cromosoma 6 cercana al centrómero (Fig. 1.2.3), conocida también como región HLA. En esta región cromosómica se pueden apreciar tres grandes zonas que determinan tres tipos de moléculas:

1.- Genes de clase I (CMH-I): codifican glicoproteínas de membrana que aparecen en prácticamente todas las células nucleadas (a excepción de las células de la córnea), que sirven para presentar antígenos peptídicos de células propias alteradas a los linfocitos T citotóxicos (Tc o CD8+). Las moléculas de clase I presentan péptidos antigénicos -de origen citoplasmático, de 8 a 11 residuos y generados por el proteasoma- a linfocitos T citotóxicos o CD8+ (Fig. 1.2.4).

2.- Genes de clase II (CMH-II): codifican glicoproteínas de membrana de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B), que sirven para presentar antígenos peptídicos a linfocitos T colaboradores (Th o CD4+). Las moléculas de clase II presentan péptidos antigénicos -de origen extracelular, de 10 a 24 residuos y adquiridos por endocitosis- a linfocitos T colaboradores o CD4+ (Fig. 1.2.4).

3.- Genes de clase III (CMH-III): no todos ellos tienen que ver, aparentemente, con el sistema inmune pero entre los que sí tienen papeles inmunológicos cabe citar los genes de las proteínas del complemento, de las citocinas, el del factor de necrosis tumoral (TNF) y las *heat shock protein* o proteínas de choque térmico de origen humano (hsp70).

Las primeras moléculas del CMH definidas por técnicas serológicas fueron las moléculas CMH de clase I humanas: HLA-A, HLA-B y HLA-C.

Las moléculas del CMH de clase I (Figura 1.2.5) son heterodímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas asociadas sin enlaces covalentes: una cadena  $\alpha$  o cadena pesada de 44 a 47 KDa codificada por el CMH y una subunidad de 12-KDa no codificada dentro del CMH denominada  $\beta$ 2-microglobulina. La cadena  $\alpha$  es una glicoproteína de tipo I constituida por tres dominios extracelulares (dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3), una región transmembranal y otra citoplasmática. Los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 forman la región de unión al péptido consistente en una plataforma de ocho láminas  $\beta$  antiparalelas en la que se apoyan dos  $\alpha$ -hélice paralelas. Esta estructura une péptidos de 8 a 11 aminoácidos en una conformación flexible y extendida. Péptidos de mayor tamaño no pueden alojarse debido a que los extremos de la hendidura se cierran. Estos antígenos proceden de proteínas de origen citoplasmático que han sido degradadas por un complejo proteolítico conocido como proteasoma. Las moléculas de clase I se expresan de manera constitutiva en todas las células nucleadas. Esta expresión se aumenta por la acción de ciertas citoquinas producidas durante la respuesta inmune antiviral, sobre todo con los interferones (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ). Los interferones activan factores de transcripción que se unen a secuencias reguladoras

de los promotores de los genes del CMH. Por tanto, incrementan la tasa de transcripción y en definitiva la expresión de los genes del CMH.

En los últimos años se han descubierto genes relacionados con los HLA de clase I a los que se ha denominado, en conjunto, genes HLA de clase I "no clásicos". Hasta el momento se han descrito 9 familias "no clásicas" que contabilizan un total de 18 genes funcionales. En todas las familias, excepto en MR1, se conoce la función y la estructura tridimensional de al menos un componente de la familia. Aunque existen diferencias en la secuencia aminoacídica, las moléculas HLA de clase I "no clásicas" presentan una estructura tridimensional similar a las clásicas, en particular en los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Sorprendentemente, estas moléculas tan parecidas en la forma desempeñan diversas funciones, no siempre relacionadas con el sistema inmune.

Recientemente se ha propuesto otra clasificación para esta familia multigénica según la cual los genes HLA de clase I "clásicos" (HLA-A, -B y -C) se agruparían como HLA de clase Ia. Los genes HLA de clase I "no clásicos" se dividirían en tres subfamilias: los que se encuentran dentro de la región cromosómica del CMH y que muestran alta similitud con los clásicos (HLA-E, -F y -G) se agruparían como HLA de clase Ib; los que se encuentran dentro de la región cromosómica del CMH y que muestran baja similitud con los clásicos (HFE y MIC) como HLA de clase Ic; y los situados fuera de la región cromosómica del CMH y baja similitud con los clásicos (CD1, EPCR, FcRN, MR1, ULBP y ZAG) como HLA de clase Id.

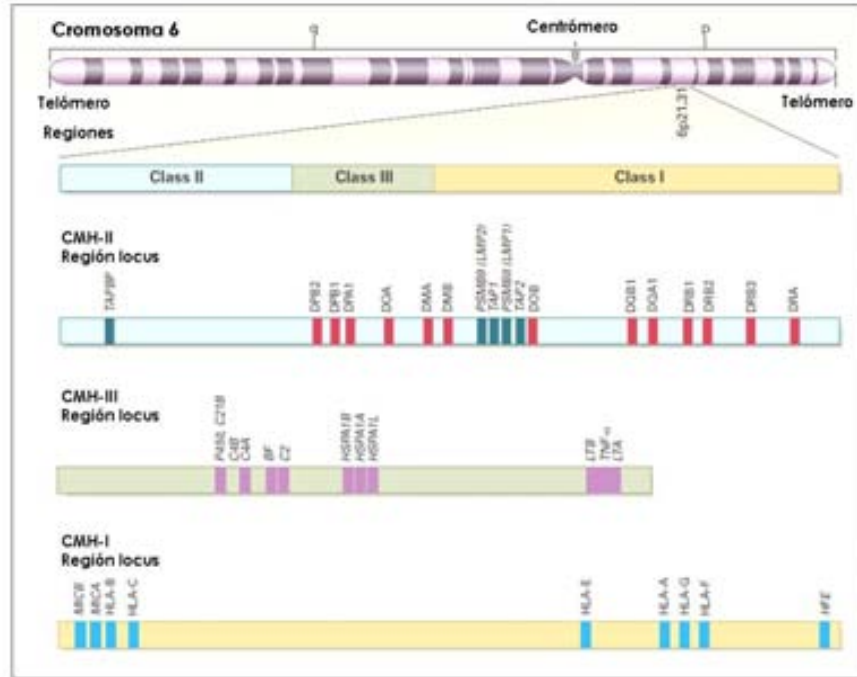


Figura 1.2.3. Cromosoma 6 y regiones del CMH. Adaptado de Jan Klein & Akie Sato. The HLA system. N Engl J Med 2000; 343(10):702-9.

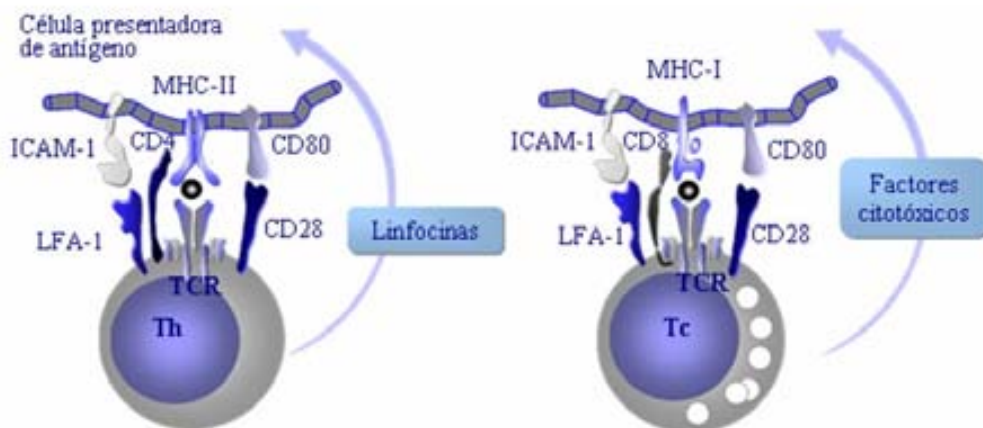
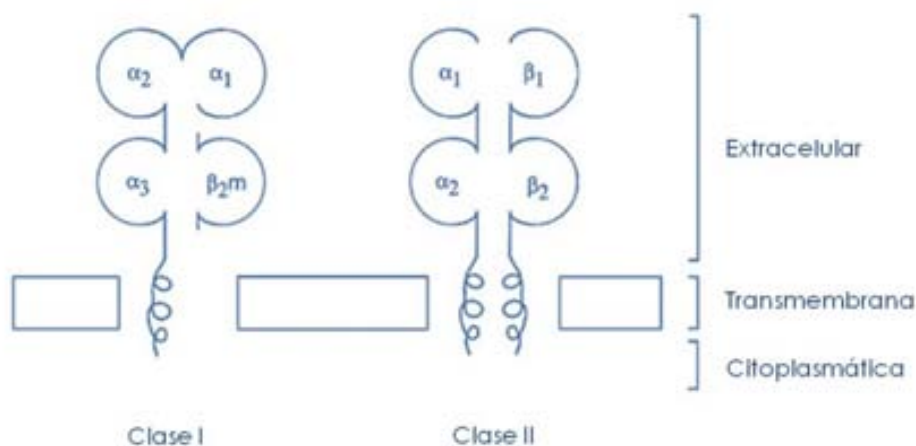


Figura 1.2.4. Activación de linfocitos Th o colaboradores y Tc o citotóxicos. Adaptado de J. Peña y A. Cabello. Inmunología, 2003.



**Figuras 1.2.5. Estructura molecular del CMH clase I y II.** Adaptado de Annual Review of Genetics. Volumen 32. 1998.

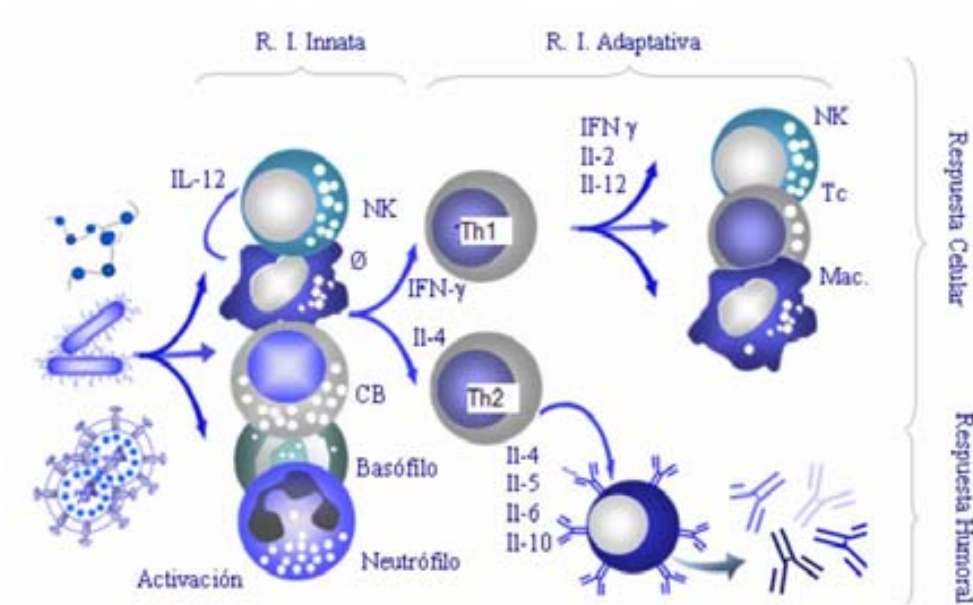
Asociados a las dos cadenas polipeptídicas polimórficas que constituyen el receptor de linfocitos T (TCR) se encuentra un grupo de moléculas monomórficas de membrana llamado colectivamente CD3, formando así el complejo TCR-CD3 y que es imprescindible para la transmisión de la señal del reconocimiento antigénico al interior de la célula. En consecuencia, se desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el citoplasma del linfocito T, dando así lugar al proceso de activación, proliferación y diferenciación celular. Estos mecanismos implican la participación de una serie de sustancias intracitoplasmáticas conocidas como segundos mensajeros. Como consecuencia de todos estos eventos se producirá finalmente la transcripción de los genes implicados en la síntesis de la proteína y factor responsable de una determinada función. La activación de los linfocitos T CD4+ es el núcleo central de la respuesta celular que a su vez actúa sobre macrófagos, células NK y linfocitos T CD8+ que adquieren entonces la capacidad de lisar las células que portan el antígeno que indujo su activación.

En la respuesta inmune humoral intervienen los linfocitos B que reconocen al antígeno a través de las inmunoglobulinas de membrana. Sin embargo, este estímulo

no es suficiente para que se inicie y desarrolle la respuesta inmune humoral. Para ello es necesario que los linfocitos B, además del estímulo antigénico, reciban el estímulo de ciertas citocinas producidas por los linfocitos T colaboradores.

Sólo cuando confluyen estos estímulos, el antigénico y el mediado por las citoquinas, se produce la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B hasta la formación de células memoria y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, que serán el elemento efector final de la respuesta humoral.

En el siguiente esquema se resume la respuesta inmune (Fig 1.2.6):



**Figura 1.2.6. Respuesta inmune.** Adaptado de J. Peña y A. Cabello. Inmunología, 2003.



## 1.3. MICA Y SU RECEPTOR NKG2D

### 1.3.1. LAS MOLÉCULAS MICA

En el año 1994, Bahram y colaboradores (52) describieron una nueva familia de secuencias dentro del CMH de clase I que tienen como particularidad compartir sólo un 27% de homología con las demás moléculas del CMH de clase I (53). El acrónimo para estos genes es "MIC", adjudicado por el *Human Gene Mapping Workshop*, que corresponde al acrónimo del inglés "MHC class I chain-related genes". Se han identificado hasta la fecha cinco secuencias de genes MIC (*MIC-A*, *MIC-B*, *MIC-C*, *MIC-D* y *MIC-E*). Las moléculas MICA y MICB son expresadas en la superficie celular, mientras que *MICC*, *MICD* y *MICE* son pseudogenes.

El gen *MICA* se encuentra localizado en el cromosoma 6, a 46,4 Kb, en sentido centromérico al gen del HLA-B, entre éste y el TNF-alfa, y es el más divergente de los genes de clase I. Característicamente, el gen *MICA* se distingue por una organización inusual en intrones y exones, y por su expresión preferente en células epiteliales (intestinales) y fibroblastos, pero no en células del sistema linfohematopoyético.

Mientras que la expresión de moléculas de clase I del CMH es indicativa de integridad celular, las moléculas MICA y MICB se expresan en situaciones de estrés celular y evocan a una respuesta inmunitaria, incluso a pesar que las moléculas clase I estén intactas (54). Los genes *MICA*, y posiblemente también los otros genes MIC, han sido seleccionados para funciones especializadas que pueden ser innatas o adquiridas dado que en sí mismos son genes de clase I. El papel inmunológico parece estar relacionado con el hecho de que las células infectadas o transformadas actúan como estímulo de la respuesta antiviral y antitumoral innata si expresan MICA o MICB (55). Esta activación se produce a través del receptor activador NKG2D, una glicoproteína de membrana tipo II con un peso molecular aproximado de 43 KDa, con un cuerpo polipeptídico de 28 KDa y que se expresa en la mayoría de células NK, linfocitos T CD4+ y CD8+ (56).

Las investigaciones *in vitro* demostraron, en un principio, que la expresión de genes *MICA* se daba exclusivamente en las células epiteliales (57). Sin embargo, algunas líneas epiteliales no expresan estas moléculas a pesar de contener el ARNm-*MICA*, lo que sugiere la existencia de un control post-transcripcional para dichas moléculas. En este sentido, estudios de inmunohistoquímica han confirmado la ausencia de expresión de *MICA* en células B, células T, monocitos, células mononucleares circulantes y timocitos (58).

### 1.3.2. POLIMORFISMO DE LOS GENES *MIC*

Los genes humanos que codifican las moléculas *MIC* albergan el mayor número de polimorfismos después de los genes de las moléculas HLA. Al menos 60 y 25 alelos han sido identificados para *MICA* y *MICB*, respectivamente (59,60), y los múltiples alelos presentan diferentes afinidades para *NKG2D* medido por la interacción de *NKG2D* soluble recombinante con la superficie de las células transformadas con los distintos alelos de *MICA* (56). El número de alelos que han sido identificados (en el año 2003 por el *HLA-Nomenclature Committee Report*) es de 56. El método que más se utiliza en la actualidad para tipificar los alelos *MICA* es el de la tipificación basada en la secuenciación o SBT (del inglés, *Sequencing-Based Typing*) (61), aunque más recientemente se ha introducido la tipificación de alta resolución mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebador de secuencia específico o PCR-SSP (del inglés, *polymerase chain reaction-sequence-specific primer*) (62). Los alelos *MICA* más frecuentes son el *MICA*\*008 y *MICA*\*010 mientras que los alelos *MICA*\*005, \*013 y \*014 parecen no expresarse (63). El polimorfismo de las moléculas *MICA* está relacionado con cambios en el aminoácido 129 (de metionina cambia a valina) del dominio  $\alpha 2$ .

El significado funcional del polimorfismo de *MIC* todavía se desconoce, aunque existen algunas evidencias de que una presión selectiva sería la responsable de esta diversidad (64). Se han descrito posibles asociaciones entre enfermedades y ciertos

alelos de MICA, incluidas algunas de origen genético como la enfermedad de Crohn, la diabetes mellitus tipo I, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la psoriasis y la enfermedad de Behcet (59), aunque algunas de estas asociaciones podrían explicarse por un desequilibrio en la expresión de los genes del *HLA* u otros genes contiguos.

En el intestino, por ejemplo, las moléculas MICA actúan como un elemento de restricción para las células T- $\gamma\delta$  (60). Entre las enfermedades intestinales inflamatorias, la enfermedad celíaca se caracteriza por una fuerte asociación con el HLA-DQ2. Se cree que la expresión de genes *MIC* en enterocitos bajo una situación de estrés y su función como ligando de células T CD8- $\alpha\beta$  intraepiteliales pueden tener un rol etiopatogénico en la enfermedad celíaca. De hecho, los genes *MIC* se asocian fuertemente a la presencia y gravedad de la enfermedad, específicamente los alelos MICB\*0106 y el haplotipo B8-MICA-A5.1-MICB0106-DR3-DQ2 (61).

Existe también abundante información que indica la potencial relevancia de los genes *MICA* en autoinmunidad y trasplante. En primer lugar, las células que expresan MICA/MICB son reconocidas por los linfocitos involucrados en el rechazo de trasplantes: células T- $\gamma\delta$ , células NK y linfocitos T CD8+. En segundo lugar, se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-MICA en individuos que han recibido trasplantes (62). Y en tercer lugar, se ha identificado que las moléculas MICA son la diana de la respuesta inmune humoral involucrada en el rechazo de trasplantes (63).

Recientemente se ha descrito que ciertos tumores epiteliales producen MICA soluble. En las células tumorales, MICA es digerido de la superficie por la acción de una proteasa, lo que da lugar a la formación de moléculas solubles de MICA. La digestión de MICA de la superficie de la célula dificulta el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmune y, además, la forma soluble de MICA es un potente inmunosupresor que inhibe la expresión de NKG2D en la superficie de los linfocitos T y de las células NK. La asociación de MICA soluble con NKG2D conduce a la

degradación de este receptor afectando negativamente a la capacidad antitumoral de las células NK (64).

### 1.3.3. EL RECEPTOR NKG2D

Las funciones de los leucocitos están reguladas por el equilibrio establecido entre señales inhibitoras y activadoras, que contribuyen a mantener la homeostasis del sistema inmunitario. Los receptores y co-receptores estimuladores determinan la respuesta frente a antígenos extraños o patógenos mientras que los receptores inhibitoras bloquean la cascada de señalización iniciada por los activadores, contribuyendo a limitarla y previniendo una respuesta contra antígenos propios. Se han ido identificando varias familias de receptores de membrana, de las superfamilias de las inmunoglobulinas (Ig) o de las lectinas de tipo C.

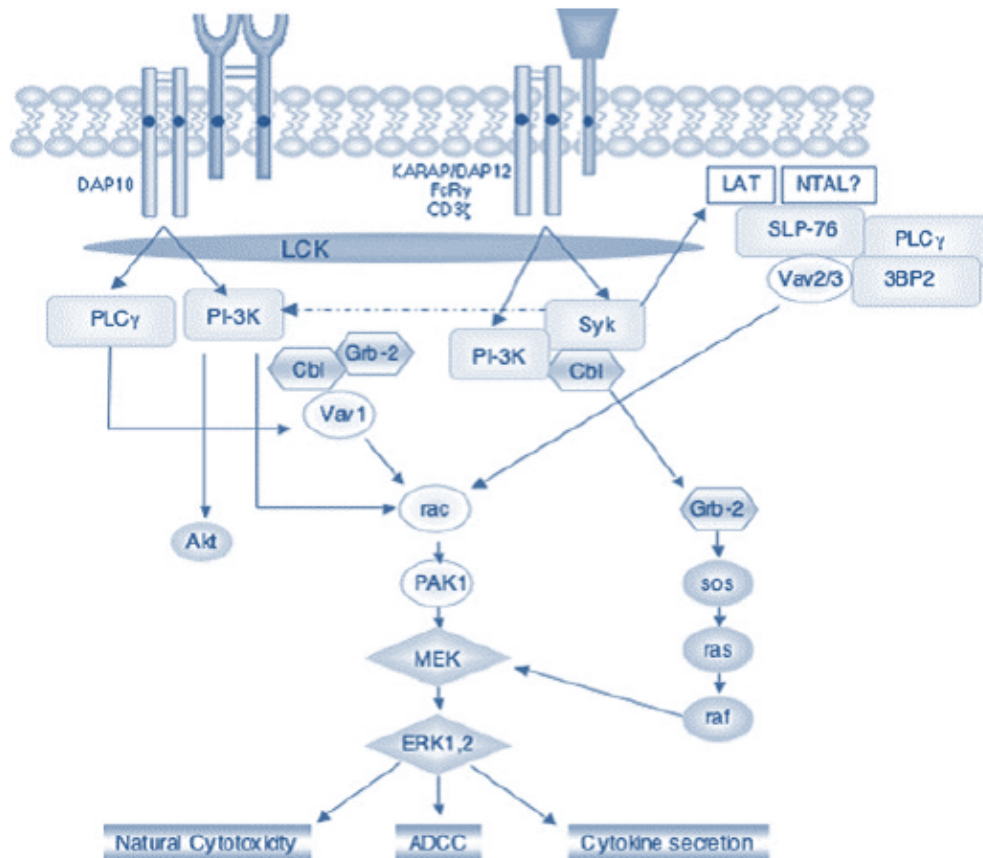
La mayoría de estas familias de receptores incluyen tanto miembros con función activadora como inhibitora. Algunos receptores como ILT/LIR (*Ig-like transcripts* o *leucocyte Ig-like receptors*), PIR-B (*Paired Ig-like receptors-B*), CD66a y LAIR (*inhibitory leukocyte-associated Ig-like receptor-1*) se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes linajes de leucocitos, mientras que otros como KIR (*killer Ig-like receptors*), CD94/NKG2, FcγRIIB, CD22, CD72 y KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor G1*) tienen una distribución más restringida. Gran parte de los genes del grupo de receptores tipo Ig se localizan en el cromosoma 19 humano (19q13.1-19q13.4) y en el cromosoma 7 del ratón.

Las células citotóxicas expresan un conjunto de receptores activadores que incluyen, entre otros, a los *Natural Killer Group 2D* (NKG2D)(65). NKG2D es un receptor activador que se encuentra expresado en la membrana de las células NK y linfocitos T CD4+ y CD8+. La estimulación de las células NK a través de los receptores activadores se opone a la señal de los receptores inhibitoras como los receptores KIR, NKR-P1 y CD94/NKG2(A/B), que también se expresan en las células citotóxicas NK y reconocen

las moléculas propias del CMH de clase I expresadas en las células sanas. Los receptores inhibidores CD94/NKG2A y CD94/NKG2B reconocen las moléculas del HLA-E, que forman parte del CMH de clase I, y que se pueden considerar “marcadores” de bienestar intracelular (66-68). Dicha interacción evita la activación de la célula efectora y la consiguiente lisis de la célula que expresa HLA-E. La falta de expresión de las moléculas del CMH de clase I en condiciones patológicas anula la señal inhibidora a las células citotóxicas efectoras. De acuerdo con la hipótesis del *missing self*, un fracaso en la expresión de estos indicadores de bienestar celular permite que las señales inhibitoras hacia las células citotóxicas sean anuladas por la acción de los receptores activadores, los cuales promueven la lisis de células diana por células efectoras (69,70). Asimismo, las células tumorales y aquellas infectadas por virus no únicamente disminuyen o pierden la expresión de las moléculas clase I del CMH, sino que pueden inducir la expresión de otras moléculas propias que actúan como marcadores de estrés celular. Un grupo de estas moléculas es reconocido por el receptor activador NKG2D, considerado un receptor activador dominante. La activación de NKG2D induce lisis de las células estresadas que expresan ligandos para NKG2D, a pesar de existir unos niveles normales de moléculas del CMH de clase I (71,72). El consenso actual es que la activación de las células NK y su citotoxicidad es el resultado de la integración de las señales producidas por las interacciones del *missing self* y del *induced self* y un desequilibrio en la señalización entre los receptores inhibidores y activadores (73). NKG2D es una molécula del grupo de las lectinas tipo C y constituye una glicoproteína transmembranal homodimérica tipo II codificada en el cromosoma humano 12, dentro del complejo del gen *NK*, y en una posición concreta del cromosoma 6 en la rata (74).

#### **1.3.4. SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE NKG2D**

Algunos receptores activadores de las células NK se asocian con una molécula adaptadora transmembrana, DAP12, que posee un inmunoreceptor basado en la *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) (65). Existen dos isoformas de NKG2D en el ratón que difieren en la longitud de su porción (cola) citoplasmática intracelular. La forma más corta se asocia a ITAM-DAP12, que conduce la señal activadora de NKG2D a través del reclutamiento de las syk-tirosin-quinasas i ZAP70. Asimismo, la porción citoplasmática de la forma más larga aparece para evitar la interacción con este adaptador (74,75). Las dos formas de NKG2D en ratones pueden también asociarse con otra molécula adaptadora, DAP10, que carece de ITAM pero sí alberga un motivo YxNM para la unión del dominio SH2 (76). La unión de NKG2D conlleva la fosforilación de DAP10 por acción de las quinasas de la familia Src y el reclutamiento de la subunidad p85 de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y Grb2, y en última instancia promueve el flujo de calcio y la citotoxicidad (75). La forma corta de NKG2D en ratones únicamente se expresa en células NK activadas, mientras que la forma larga se expresa constitutivamente. El NKG2D humano no tiene forma corta y únicamente se asocia a DAP10. Tanto en humanos como en ratones, la señalización de NKG2D a través de DAP10 es suficiente para mediar citotoxicidad (75) (Figura 1.3.1).



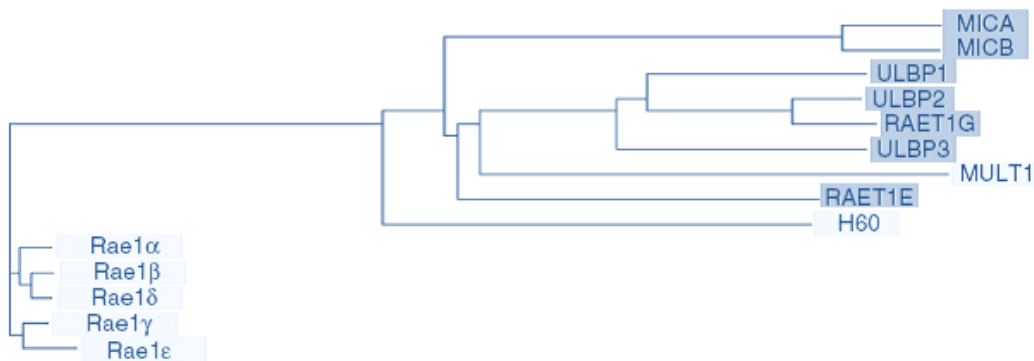
**Figura 1.3.1. Señalización a través de NKG2D.** Adaptado de S. Chiesa et al. *Molecular Immunology* 2005; 42:477-484.

### 1.3.5. PAPEL DEL NKG2D EN LA ACTIVACIÓN Y CO-ESTIMULACIÓN

En las células NK activadas, NKG2D actúa como un primer receptor activador, por lo que él mismo es suficiente para activar la citotoxicidad mediada por células NK. En contraposición, NKG2D parece actuar como receptor co-estimulador en los linfocitos T CD8+, requiriendo una señal mediada por TCR para la activación completa de estas células efectoras (74). Existe controversia sobre si NKG2D es capaz de mediar activación en ausencia de otros estímulos en los linfocitos T (77-80). La actual función de NKG2D viene determinada por factores adicionales, tales como la activación de la célula efectora o el microambiente celular, por ejemplo en el caso de la activación de la célula efectora principal por la exposición a citoquinas (74).

### 1.3.6. LIGANDOS DE NKG2D

Una característica del sistema NKG2D es que existen múltiples ligandos para este receptor, que comparten una lejana homología con las proteínas del CMH de clase I. Los primeros ligandos identificados fueron los *MHC class I chain related proteins* (MIC) A y B, que se encuentran codificados en el CMH humano (6p21.3) (64). Su secuencia se asemeja a la de las proteínas clase I del CMH en sólo un 27%, y aunque presentan tres dominios:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , éstos no se asocian con beta-2-microglobulina ni al péptido (64,81). Una segunda familia de ligandos de NKG2D, la *UL16 binding protein* (ULBP), se codifica fuera de la región del CMH (6q24.2–25\_3) (82). Los ULBPs también son conocidos como la familia de primeros transcritores del ácido retinoico 1 (RAET1), ya que muestran homología con la secuencia de las proteínas tempranas del ácido retinoico 1 de ratón (Rae1 $\alpha$ -e). Existen en total diez miembros de la familia de genes *RAET1* en humanos, de los cuáles únicamente cinco se expresan y codifican proteínas funcionales que son capaces de ligar NKG2D (82,83). Las relaciones evolutivas entre los ligandos se encuentran esquematizadas en la Figura 1.3.2.



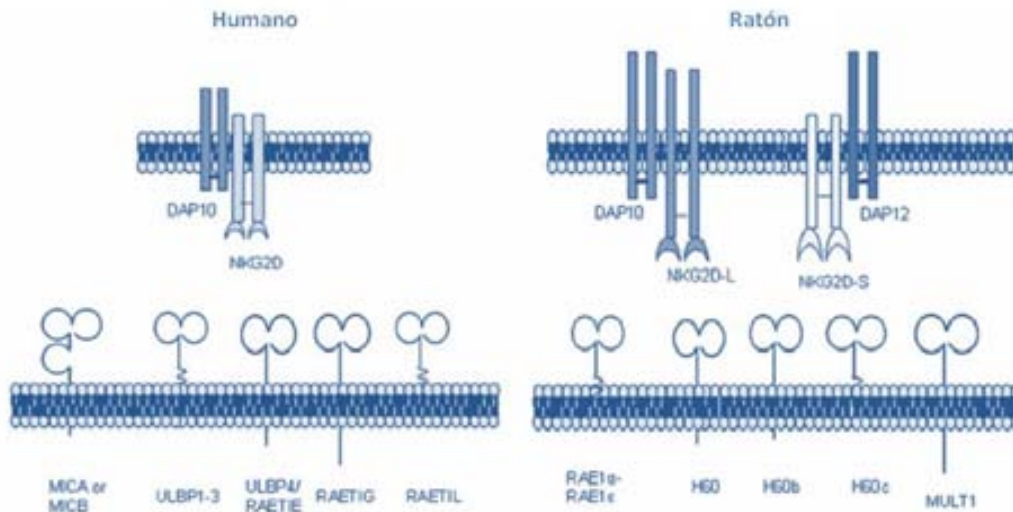
**Figura 1.3.2. Relación evolutiva de los ligandos de NKG2D.** Adaptado de Anita R. Mistry y Chris A. O'Callaghan. *Immunology* 2007; 121:439-447.

### 1.3.7. ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE LAS INTERACCIONES CON NKG2D

Una cuestión clave es identificar si los diferentes ligandos son equivalentes en su capacidad para activar NKG2D. Estudios estructurales y vinculantes se han llevado a



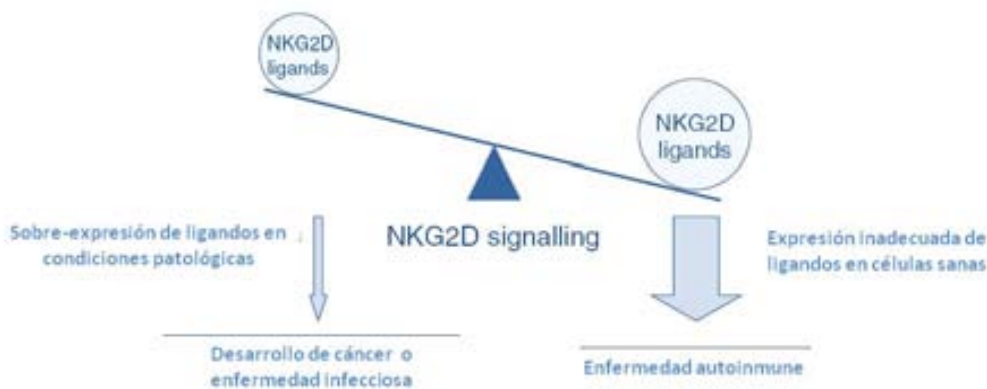
cabo en algunas de las interacciones con los ligandos (84-88). Los diferentes ligandos se unen a una superficie relativamente similar en la misma región de NKG2D, pero existen diferencias significativas en cuanto a su afinidad y sus implicaciones funcionales (86) (Figura 1.3.3).



**Figura 1.3.3. Ligandos de NKG2D en humano y ratón.** Adaptado de Robert A Eagle et al. *Curr Immunol Rev* 2009; 5:22-34.

### 1.3.8. PAPEL DEL NKG2D EN LA PATOGÉNESIS DE TUMORES Y OTRAS ENFERMEDADES

La señalización de NKG2D es de particular importancia debido a que la desregulación de este sistema puede conllevar consecuencias perjudiciales. El hecho de que en condiciones patológicas no puedan activarse las células citotóxicas por este receptor puede desencadenar la cancerogénesis o la diseminación de infecciones intracelulares. Por el contrario, una señalización inadecuada a través de NKG2D en células sanas puede tener como resultado una respuesta autoinmune. La mayoría de los datos que relacionan el sistema NKG2D con enfermedades autoinmunes se refieren a las moléculas MIC (Figura 1.3.4).



**Figura 1.3.4. Papel del NKG2D en la patogénesis de tumores y otras enfermedades.**

Adaptado de Anita R. Mistry y Chris A. O'Callaghan. *Immunology* 2007; 121:439-447.

La expresión aberrante de ligandos de NKG2D, que inapropiadamente activan NKG2D, se ha relacionado con la artritis reumatoide, la enfermedad celíaca y la diabetes mellitus tipo I (89). NKG2D juega un papel crítico en la eliminación de células tumorales por parte de las células citotóxicas efectoras (71,72,90-96). Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión del ligando de NKG2D es suficiente para activar la citotoxicidad por una célula efectora que exprese NKG2D (79,95,97-100). Además, la formación de tumores puede darse a través de la vía de señalización de NKG2D. Por otra parte, NKG2D es importante en la vigilancia tumoral para prevenir la iniciación tumoral y también lo es en el rechazo inmunológico de las células tumorales para prevenir la progresión tumoral. La trascendencia de la señalización de NKG2D en la potencial protección ante las infecciones y la cancerogénesis se pone de manifiesto por el desarrollo en los virus y células tumorales de ciertos mecanismos para evadir su detección por este sistema. NKG2D tiene un mecanismo de regulación por disminución (*down regulation*) por las células efectoras después de una exposición crónica a sus ligandos en células tumorales, lo que resulta en una citotoxicidad deficiente por parte de las células NK (101-103). La expresión de ligandos NKG2D en la superficie celular también posee una regulación por disminución por la liberación de agentes proteolíticos a partir de las metaloproteinasas que secretan las células tumorales

(64,104-106). Esto conlleva la liberación de formas solubles de los ectodominios de estos ligandos, que han sido detectados en los sueros de pacientes con distintos cánceres. Este mecanismo no sólo se encarga de la regulación decreciente de los ligandos sobre células tumorales diana, sino que la liberación por parte de las células tumorales de MICA soluble también provoca la internalización y la degradación lisosomal de NKG2D y, por tanto, una reducción en los niveles de NKG2D en las células NK y en los linfocitos T CD8+ (64). Además, los factores de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ) producidos por las células tumorales y por las células T reguladoras CD4+ y CD25+ de humano y ratón regulan por disminución el NKG2D y sus ligandos en los efectores citotóxicos y en las células tumorales, respectivamente (74).

Los virus también han desarrollado mecanismos para evitar poner en sobre aviso al sistema inmune a través de NKG2D. Por ejemplo, la glicoproteína del citomegalovirus humano UL16 se une a ULBP1, ULBP2 y MICB y retiene a estas moléculas intracelularmente, reduciendo así los niveles de expresión de la superficie celular y la susceptibilidad a la citotoxicidad de las células NK (107-110).

La mayoría de los tejidos sanos no expresan ligandos de NKG2D (111-114) pero existen excepciones a esta regla general. Niveles altos de MICA, ULBP1 y ULBP3, y bajos niveles de ULBP2, también han sido detectados en células del estroma (115), así como otros ligandos de NKG2D, en particular ULBP3, que también se ha demostrado su expresión en células madre mesenquimales de humano (116). Además, Rae1 de ratón y H60 se expresan en células BM (principalmente en los progenitores de mieloides) de ratones BALB/c tras la repoblación en un ratón irradiado (117,118). MICA y MICB se expresan en las células epiteliales intestinales normales (112) y se cree que es resultado de la estimulación por parte de la flora bacteriana del intestino. Analizando el ARNm, existen algunas evidencias de que ULBP3 se expresa en otros tejidos sanos (90,119). En este sentido, ARNm de MULT1 se detecta en tejido normal (85). Asimismo, la expresión de los ligandos en la membrana celular no se ha determinado en estos estudios, y en algunos de ellos la expresión de ARNm de ULBP no siempre se correlaciona con los

niveles de expresión en sangre periférica (114) y en líneas celulares tumorales (90), lo que sugiere que la regulación de la expresión de ULBP tiene lugar a un nivel distinto al de la transcripción.

### **1.3.9. SOBREENPRESIÓN DE LIGANDOS DE NKG2D EN CÉLULAS INMUNES ACTIVADAS**

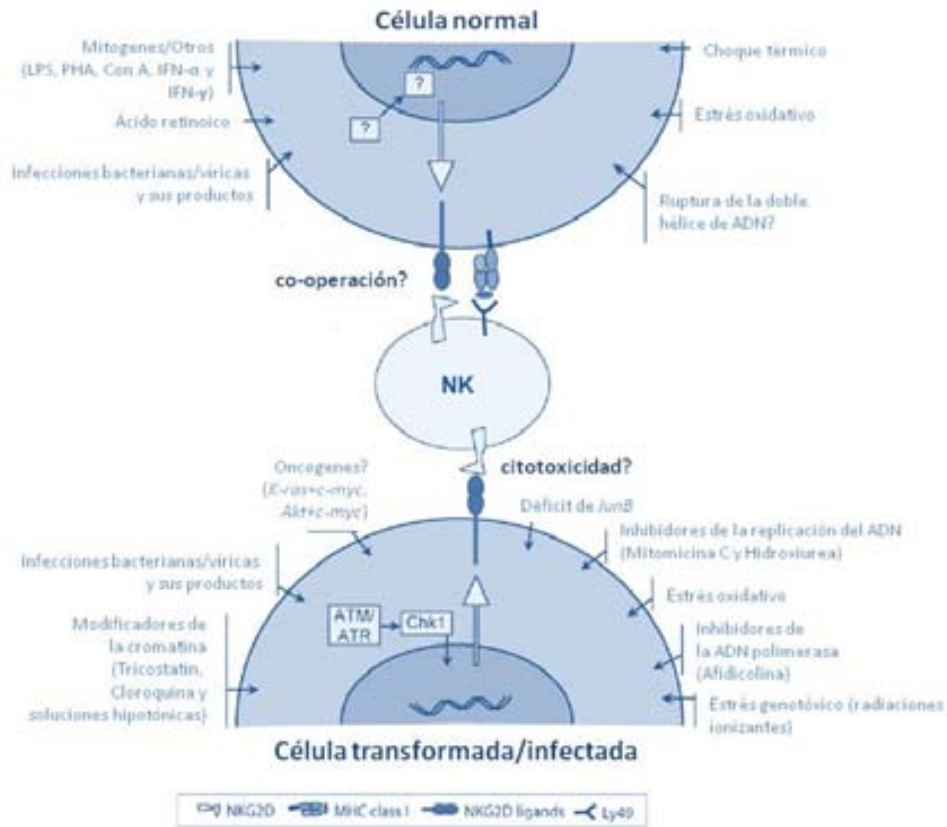
La expresión del ligando de NKG2D se induce cuando las células inmunes están activadas, de una forma similar a cuando los linfocitos B son tratados con concanavalin A (ConA) o lipopolisacárido (LPS) (100) y cuando los linfocitos T son estimulados por una variedad de estímulos como la fitohemaglutinina (PHA), ConA, o anti-CD3 o el anticuerpo monoclonal anti-CD28 y forbol-12-miristato 13-acetato (98,120). MICA y MICB se expresan en las células dendríticas después de ser estimuladas con interferon (IFN)- $\alpha$  (121) y ULBP1 se sobreexpresa en la superficie de los monocitos normales y blastos leucémicos en respuesta a factores de crecimiento y al tratamiento con IFN- $\gamma$  (114). Elevadas dosis de lipopolisacárido inducen la transcripción y expresión en la membrana celular de ULBP1-3 y la expresión en la superficie celular de MICA en macrófagos humanos, quienes activan la citotoxicidad mediada por células NK (122).

### **1.3.10. SOBREENPRESIÓN DE LIGANDOS DE NKG2D EN CÉLULAS INFECTADAS**

La expresión del ligando de NKG2D es detectado fácilmente en células infectadas por bacterias (123,124) o virus (107,110). La expresión de MICA se encuentra incrementada en líneas celulares epiteliales que han sido infectadas por *Escherichia coli* (124), en células dendríticas y epiteliales después de infectarse por *Mycobacterium tuberculosis* (125) y en fibroblastos y células endoteliales infectadas por citomegalovirus (126).

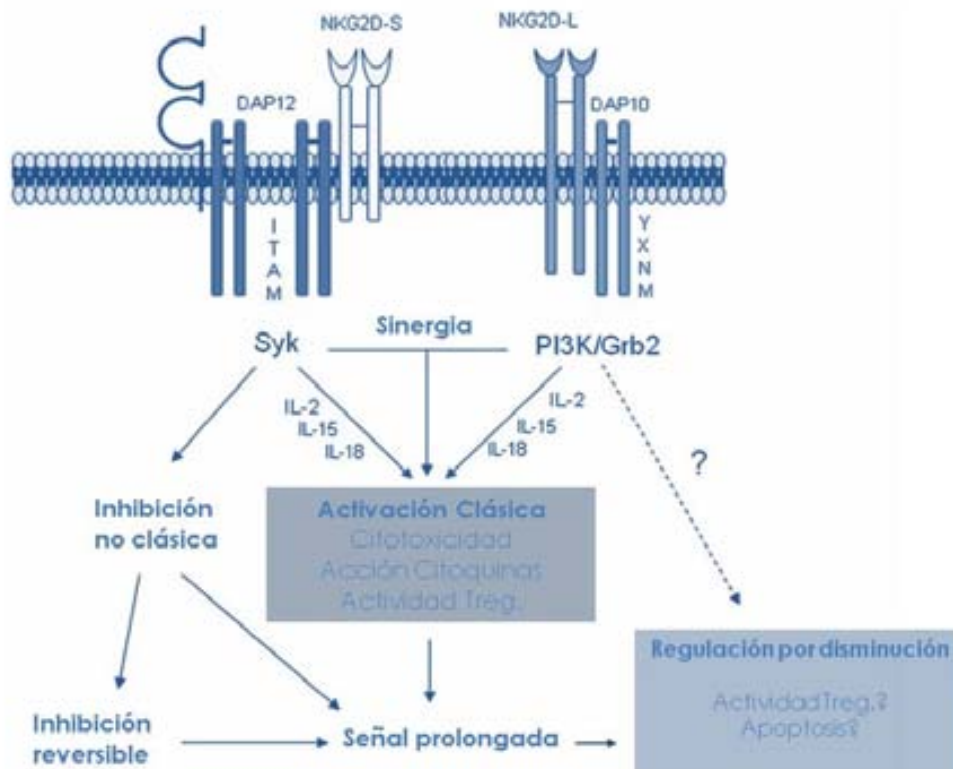
### 1.3.11. ESTÍMULOS CONOCIDOS Y MECANISMOS MOLECULARES QUE ESTIMULAN LA EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NKG2D

Los promotores de MICA y MICB contienen elementos transcripcionales parecidos a los que se encuentran en los promotores de las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), como la HSP70 (112). El estrés oxidativo también incrementa la expresión de MICA y los niveles de transcripción de MICB en líneas celulares de carcinoma de colon (127). Recientemente, una amplia variedad de estímulos que causan estrés genotóxico o que resultan de la inhibición de la replicación del ADN, incluyendo los tratamientos con radiaciones ionizantes, cisplatino, mitomicina C o hidroxiurea, mostraron que incrementaban significativamente los ligandos de NKG2D en células epiteliales de ovario de ratón transformadas y en fibroblastos normales de adultos (128). El papel de las quinasas ATM/ATR (*Ataxia-telangiectasia Mutated/ATM-and Rad3-Related*) como mediadores en la fosforilación de la quinasa de *checkpoint* o punto de control (chk1) como inductor de la expresión de ligandos de NKG2D se describió por primera vez en respuesta al ADN dañado (128). ATM/ATR y chk1 se encuentran implicados en la expresión de ligandos de NKG2D en las células T activadas. El mecanismo preciso mediante el cual chk1 induce la expresión del gen del ligando de NKG2D se desconoce. ATM/ATR y chk1 se sabe que regulan la división celular. (Figuras 1.3.5).



**Figura 1.3.5. Múltiples estimulantes de la expresión de ligandos de NKG2D.** Adaptado de A. Samarakoon et al. *Molecular Immunology* 2009; 46:1011-1019.

Se sabe todavía poco sobre los mecanismos moleculares que desencadenan la expresión génica del ligando NKG2D. La vía de respuesta al daño del ADN se activa frecuentemente en células infectadas por virus y en las células tumorales. Además, la inducción de la expresión de MICA como respuesta a la activación de los linfocitos T parece tener relación con la fosforilación del ATM/ATR. Asimismo, es posible que esta vía pueda jugar un papel esencial a nivel del ligando de NKG2D en la inducción de cancerogénesis, infección y activación de linfocitos T, de la misma forma que en otras situaciones de estrés celular causadas por daño e inhibición en la replicación del ADN (112,128,129,130,131,132).



**Figura 1.3.5. Vías de señalización de NKG2D que pueden inducir una respuesta inmune.** Adaptado de Robert A. Eagle et al. *Curr Immunol Rev* 2009; 5:22-34.

### 1.3.12. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA EPOC Y POTENCIAL PAPEL DE LA INTERACCIÓN MICA-NKG2D

Está aceptado que la respuesta inflamatoria observada en los pulmones de los pacientes afectados de EPOC se relaciona con la destrucción tisular y es responsable de la progresión de la enfermedad.

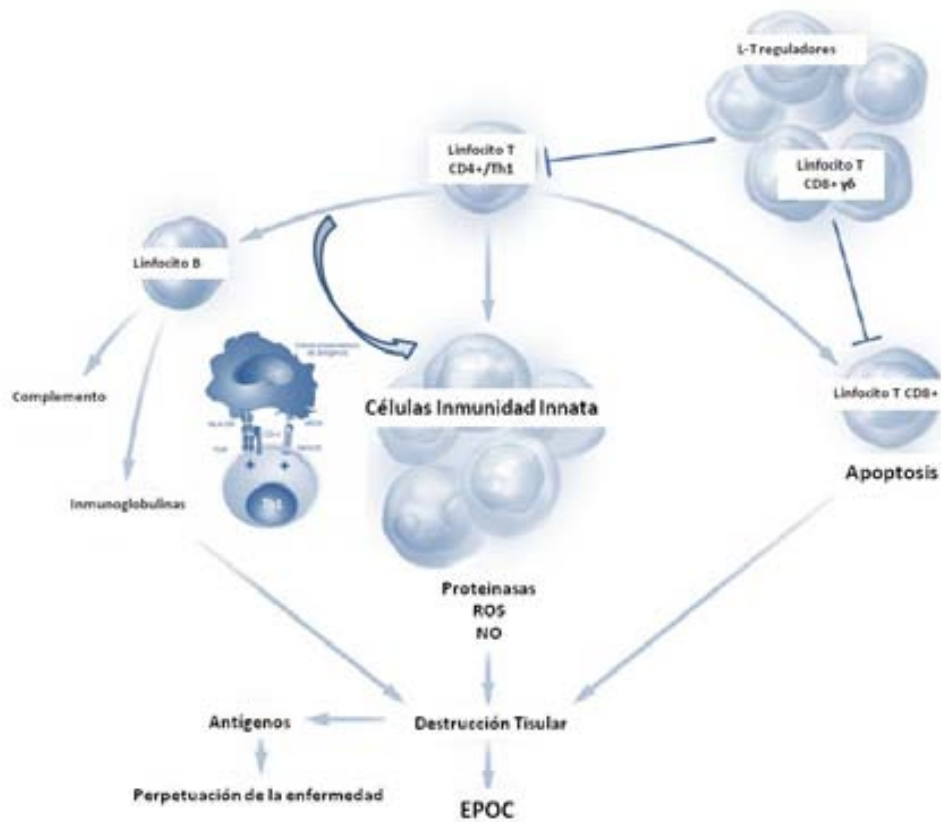
Las células del epitelio bronquial representan la primera línea de defensa de la respuesta inmune innata en el pulmón. La exposición al humo del tabaco incrementa la expresión de citoquinas como la IL-8 y CCL20 que promueven la infiltración de neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T en el pulmón. Los macrófagos alveolares son los responsables de la secreción de metaloproteinasas de la matriz, como MMP-9/12, que contribuyen a la destrucción tisular observada en el enfisema y promueven

la infiltración por neutrófilos a través de la síntesis de IL-8 y por linfocitos T mediante citoquinas específicas como CXCL9, CXCL10 y CXCL11.

La presencia de linfocitos T activados, especialmente linfocitos T CD8+, en el pulmón es uno de los responsables de la inflamación crónica existente en la EPOC y se correlaciona con el grado de limitación al flujo aéreo y la progresión de la enfermedad (133). Recientemente se ha demostrado que el déficit de linfocitos T reguladores presente en los pulmones de pacientes con enfisema es el responsable de una deficiente regulación de la acción de los linfocitos T CD8+ contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

Nosotros planteamos la posibilidad que la expresión de ligandos de NKG2D, tales como MICA, que se expresarían en respuesta al estrés celular ocasionado por el humo del tabaco podrían ser uno más de los activadores de la respuesta inmune y de la consiguiente cascada inflamatoria presente en los pacientes afectados de EPOC.





**Figura 1.3.6. La respuesta adaptativa inmune en la EPOC y el papel de MICA-NKG2D.**  
 Adaptado de Manuel G. Cosío et al. N Engl J Med 2009; 360:2445-2454.

## Hipótesis de Trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en suponer que la exposición a irritantes inhalados (por ejemplo, el humo del tabaco) induce estrés en las células epiteliales, lo que puede explicar que:

- a) El humo del tabaco sea el responsable de la expresión de MICA en fumadores susceptibles,
- b) y la expresión de MICA se puede asociar a una susceptibilidad para desarrollar enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

## 2. Objetivos

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Demostrar que el humo del tabaco induce la expresión del ligando de NKG2D en un modelo animal (RAET1 en ratón).
- Determinar si la unión NKG2D-ligando induce la destrucción del epitelio alveolar en el ratón.
- Estudiar el grado de expresión del receptor NKG2D y de su ligando MICA en el epitelio alveolar y bronquial en los pacientes afectados de EPOC.
- Evaluar la relación entre la expresión de MICA en pacientes afectados de EPOC y el tabaquismo.

## 3. Material y Métodos

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral, se utilizaron diversas técnicas inmunohistocitoquímicas con diferentes antisueros específicos frente a secuencias peptídicas de varios ligandos del receptor NKG2D. Cuando las técnicas se llevaron a cabo en ratones se utilizaron anticuerpos anti-RAET1 y cuando se realizaron en humanos se usaron anticuerpos anti-MICA. También se efectuaron controles de especificidad de los anticuerpos mencionados mediante técnicas inmunocitoquímicas y de *Western blot*. Por otra parte, se desarrollaron técnicas de diagnóstico en humanos que incluyeron espirometría y pletismografía, determinación de la capacidad de transferencia de CO, gasometría arterial, tomografía computarizada (TC) de tórax, fibrobroncoscopia con realización de biopsias bronquiales y, en algunos casos, obtención de tejido pulmonar a partir de toracotomías. Finalmente, se realizó la cuantificación y el correspondiente análisis estadístico de los datos obtenidos de todos los experimentos desarrollados.

### 3.1 Material

Los animales utilizados en este estudio han sido ratones BALB/CJ (*The Jackson Laboratory*) y ratones C57BL/6J (*The Jackson Laboratory*). Todos ellos hembras adultas de entre 8 y 12 semanas de edad y de un peso aproximado de 250-275 gramos, que se encontraban aisladas en jaulas ventiladas en un laboratorio acreditado por la *American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care* para el cuidado de animales de experimentación. Los protocolos de actuación durante el estudio se redactaron a partir de las guías del *National Institute of Health* y se aprobaron por el *Institucional Animal Care and Use Committee* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cincinnati, donde se realizaron estos experimentos.

Los ratones **BALB/CJ** se expusieron mediante un sistema de exposición de cuerpo entero *Teague TE-10Z (Teague Enterprises)* (Fotografía 3.1) a aire ambiente filtrado o aire mezclado con el humo de la combustión del tabaco (150 mg/m<sup>3</sup>) proveniente de cigarrillos utilizados habitualmente para la investigación (2R4F; *University of Kentucky Tobacco Research and Development Center*) drante 4 horas al día, 5 días a la semana, y durante un periodo de 6 meses.



**Fotografía 3.1.** Sistema de exposición de cuerpo entero a humo de tabaco para ratones *Teague TE-10Z (Teague Enterprises)*.

Sistema validado por múltiples estudios para provocar enfisema pulmonar en animales de experimentación.

Con el propósito de disponer de un modelo murino adicional con unas características histológicas y funcionales que simularan a la EPOC en humanos, se utilizó el modelo de enfisema inducido por inhalación de acroleína. Para ello, se expusieron a los ratones **C57BL/6J** a aire filtrado (grupo control, n=7) o a acroleína (2,0 ppm, grupo tratado, n=7) durante 6 horas al día, 5 días a la semana, y durante un periodo de 12 semanas consecutivas. El vapor de acroleína se obtuvo mediante nitrogenación (3–15 mL/min) a través de un reservorio de 3 mL de acroleína líquida (SigmaAldrich, St. Louis, MO). Esta mezcla se diluyó con aire filtrado de partículas (400 mL/min) y se introdujo en una cámara de acero inoxidable de 0,32 m<sup>3</sup>. Una fracción de cada muestra se mezcló con 50 mM de hexilresorcinol (Sigma, St. Louis, MO), 2,1 mM de cloruro de mercurio (Aldrich, Milwaukee, WI) y 29,7 M de ácido tricloroacético (Fisher, Fair Lawn, NJ). Las muestras obtenidas se compararon con patrones de referencia en volúmenes idénticos, se calentaron (65°C durante 15 min) y a continuación se sometieron a temperaturas más bajas (22°C durante 15 min). La lectura se realizó mediante un

espectrofotómetro (Beckman DU-64) en términos de absorbancia a una longitud de onda de 650 nm.

Los procedimientos experimentales empleados en todas estas cepas de ratones se ajustaron al Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, (B.O.E. del 21-10-2005) sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Todos ellos se trataron según las pautas establecidas por el *National Institute of Health* y su manipulación fue aprobada por el *Institucional Animal Care and Use Committee* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cincinnati.

## 3.2 Pacientes

Disponemos de dos grupos de pacientes en función del origen de las muestras:

1. a partir de estudio endoscópico respiratorio o 2. a partir de toracotomía.

Todos los pacientes que se sometieron a **fibrobroncoscopia** con posterior obtención de biopsias bronquiales (n=93) se encontraron clínicamente estables durante un periodo de tiempo, anterior a la realización de la exploración, igual o superior a tres meses. Algunos de estos pacientes habían recibido de forma regular tratamiento con broncodilatadores (n=21) y/o esteroides inhalados (n=7). Se excluyeron aquellos pacientes que habían presentado exacerbación de la EPOC durante los tres meses que precedieron a la exploración, aquéllos con sospecha clínica de asma bronquial, o bien que habían recibido tratamiento con esteroides sistémicos durante los tres últimos meses, y finalmente también aquéllos a quien se les detectó un tumor en la tráquea o en los bronquios principales durante la realización de la fibrobroncoscopia. El *Comitè Ètic d'Investigació Clínica* del *Institut Municipal d'Investigació Mèdica* (IMIM) aprobó la obtención de biopsias bronquiales (n=3) a estos pacientes incluidos en el estudio y que se sometían a una fibrobroncoscopia

diagnóstica con otros fines. Los pacientes fueron debidamente informados y firmaron un consentimiento informado.

El tabaquismo de todos los pacientes incluidos en el estudio se determinó mediante un cuestionario específico y se cotejó mediante la determinación de carboxihemoglobina en sangre.

La función pulmonar de estos pacientes se evaluó mediante espirometría forzada (Datospir-900; SIBEL), pletismografía (Masterlab; Jaeger) para determinar los volúmenes pulmonares estáticos, resistencia de la vía aérea y difusión del monóxido de Carbono ( $TL_{CO}$ ). Se utilizaron como valores de referencia los de la población mediterránea (134).

A los pacientes que se sometieron a **toracotomía** (n=18) en el Hospital Universitario de Cincinnati, se les evaluó la función pulmonar utilizando Vmax Encore (Viasys Healthcare) siguiendo las directrices de la Sociedad Torácica Americana (135). Los valores de referencia para esta población fueron los descritos por Morris (136). La *Institutional Review Board* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cincinnati autorizó los protocolos para la obtención de muestras quirúrgicas en los pacientes con patología benigna o maligna a los que se realizaron toracotomía y que aceptaron participar en el estudio.

Las características clínicas de los pacientes de estas dos instituciones fueron similares en número de paquetes-año, parámetros de función pulmonar e incidencia de tumores, como se puede observar en las siguientes tablas (tabla 3.1 y tabla 3.2), donde se muestran las características clínicas y demográficas de los dos subgrupos de pacientes.

		Total	NO EPOC	EPOC	P
<b>Pacientes</b>	n (%)	93 (100)	26 (28)	67 (72)	
<b>Características generales:</b>					
Género	H:M	73:9	12:14	63:4	0.000
Edad (años)	X (DE)	66 (11)	65 (13)	67 (10)	0.389
<b>Tabaquismo:</b>					
No fumadores	n (%)	21 (23)	15 (58)	06 (9)	0.000
Ex fumadores	n (%)	30 (32)	04 (15)	26 (39)	
Fumadores activos	n (%)	42 (45)	07 (27)	35 (52)	
<b>Síntomas de BC:</b>					
No	n (%)	47 (51)	21 (81)	26 (34)	0.000
Sí	n (%)	46 (49)	05 (19)	41 (66)	
<b>Función pulmonar:</b>					
%FEV1, % pred.	m (DE)	67 (23)	96 (12)	56 (16)	0.000
FVC, % pred.	m (DE)	73 (20)	94 (11)	64 (16)	0.000
FEV1/FVC, %	m (DE)	65 (12)	74 (7)	62 (12)	0.000
TLC, % pred.	m (DE)	95 (19)	100 (16)	94 (21)	0.214
RV, % pred.	m (DE)	130 (44)	111 (27)	137 (47)	0.024
TL <sub>CO</sub> , % pred.	m (DE)	78 (22)	94 (18)	71 (19)	0.000
TL <sub>CO</sub> /VA, % pred.	m (DE)	88 (19)	96 (18)	84 (18)	0.016
<b>Neoplasia pulmonar:</b>					
No	n (%)	31 (32)	25 (48)	06 (26)	0.004
Sí	n (%)	62 (68)	31 (52)	31 (74)	
<b>Expresión bronquial de MICA:</b>					
No	n (%)	26 (28)	21 (38)	05 (14)	0.012
Sí	n (%)	67 (72)	35 (62)	32 (86)	

(EPOC): Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; (BC): Bronquitis Crónica; (FEV1): Volumen Espirado Forzado en el primer segundo; (FVC): Capacidad Vital Forzada; (TLC): Capacidad Pulmonar Total; (RV): Volumen Residual; (TL<sub>CO</sub>): Capacidad de Transferencia del CO;



		<b>Total</b>
<b>Pacientes</b>	n	18
<b>Características generales:</b>		
Género	H:M	8:10
Edad (años)	m (DE)	56 (9)
<b>EPOC:</b>		
Sí	n (%)	13 (72)
No	n (%)	5 (28)
<b>Tabaquismo, paq.año:</b>		
No EPOC	x (%)	0 (0)
EPOC	x (%)	56 (29)
<b>Función pulmonar:</b>		
%FEV1, % pred.	m (DE)	76 (20)
FVC, % pred.	m (DE)	80 (16)
FEV1/FVC, %	m (DE)	74 (18.4)
TLC, % pred.	m (DE)	99 (16.6)
TLco, % pred.	m (DE)	70 (15)
<b>Neoplasia pulmonar:</b>		
No	n (%)	6 (34)
Sí	n (%)	12 (66)
<b>Neoplasia pulmonar:</b>		
No evidencia	Sí:No	2:3
Confirmada	Sí:No	10:3

(EPOC): Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; (FEV1): Volumen Espirado Forzado en el primer segundo; (FVC): Capacidad Vital Forzada; (TLC): Capacidad Pulmonar Total; (TLco): Capacidad de Transferencia del CO;

**Tablas 3.1. y 3.2.** Características clínicas y demográficas de los pacientes sometidos a fibrobroncoscopia y a toracotomía, respectivamente.

### 3.3 Anticuerpos primarios y secundarios

En este estudio se han empleado los siguientes anticuerpos comerciales:

#### **Anticuerpos primarios**

- Anti-Human MICA Monoclonal Antibody (clon AMO1).  
Immatics Biotechnologies. Tübingen, Alemania.

El anticuerpo monoclonal MICA reconoce MICA\*01 y MICA\*04, y no presenta reacción cruzada con MICB\*02. Se trata de una IgG1 de ratón.

- Anti-RAET1 Monoclonal Antibody (clon AF1136).  
R&D Systems. Minneapolis. EEUU.
- Anti Pro-SCP Monoclonal Antibody.
- Anti-Casp3 Monoclonal Antibody.

#### **Anticuerpos secundarios**

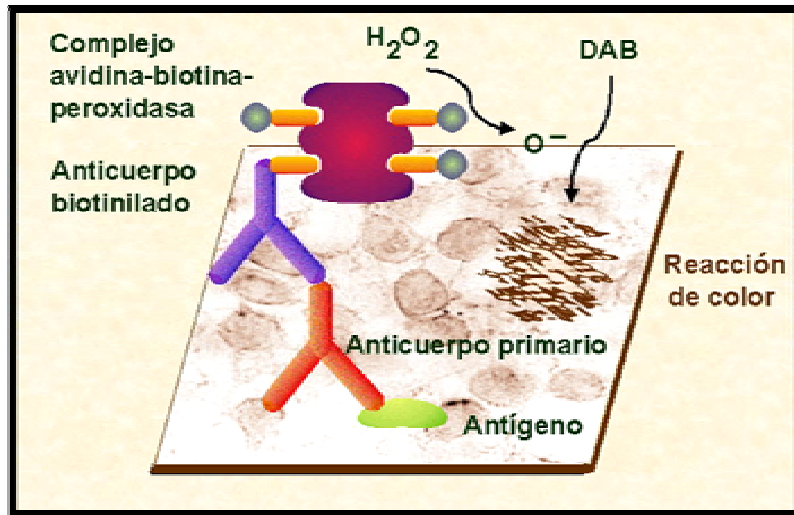
- Inmunoglobulina unida a un polímero de dextrano marcado con peroxidasa.  
DAKO EnVision. DAKO Corporation, California, EE.UU.

## 3.4 Fundamento de las técnicas

### 3.4.1 Fundamento del método de la avidina-biotina peroxidasa

El método de la avidina-biotina peroxidasa se fundamenta en la gran afinidad que presentan las moléculas de avidina y biotina entre sí. La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular (68 kilodaltons) compuesta por cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión a la vitamina biotina de bajo peso molecular (244 daltons). Además, la avidina se puede utilizar como molécula puente entre diferentes moléculas biotiniladas, como son, en este caso, el anticuerpo y la peroxidasa. La biotinilización es un proceso bioquímico en el cual se conjuga la biotina a diferentes moléculas. Además, el pequeño tamaño de la biotina hace que este proceso no modifique las propiedades inmunológicas, enzimáticas o físicas de las moléculas marcadoras. Se estima que el número de moléculas de biotina que se pueden unir a un anticuerpo es del orden de 150, lo que permite incubar el anticuerpo primario a concentraciones muy bajas.

Este método inmunocitoquímico consiste en la incubación del tejido con un anticuerpo primario frente a la proteína que se quiere detectar. Sobre este antisuero se aplica un anticuerpo secundario biotinilado producido frente al animal en el que se ha sintetizado el anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario se unirá a través de su biotina a un complejo formado por avidina conjugada a peroxidasa biotinilada, que posee un lugar de unión libre para la biotina. El cromógeno empleado es la 3,3'-diaminobencidina (DAB), que se oxida en un medio que contiene peróxido de hidrógeno y la peroxidasa del complejo avidina-biotina. La peroxidasa cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno, de forma que el oxígeno liberado oxida la DAB. Este óxido de diaminobencidina es insoluble y da un precipitado de color marrón rojizo al microscopio de luz (Figura 3.4.1).



**Figura 3.4.1.** Esquema que muestra las etapas de la técnica inmunocitoquímica de la avidina-biotina-peroxidasa.

### 3.4.2 Fundamento de la inmunohistoquímica para RAET1, Pro-SCP y Casp3

La inmunohistoquímica para RAET1 (*Retinoic Acid Early Transcript 1*) se realizó sobre tejido pulmonar conservado inicialmente en formol y posteriormente fijado en parafina, utilizando un anticuerpo monoclonal sintetizado en cabra (clon AF1136; R&D Systems). La proteína Pro-SCP se detectó utilizando un anticuerpo policlonal sintetizado en conejo (Chemicon). Para poder visualizar tanto el marcaje de RAET1 como de Pro-SCP se utilizaron kits de anticuerpos secundarios unidos a fosfatasa alcalina (Vectastain ABC-AP kit; Vector Laboratories) según las recomendaciones del fabricante. La proteína Casp3 activada se detectó mediante un anticuerpo monoclonal sintetizado en conejo (R&D Systems) en cortes de 5 µm de grosor del parafinado de tejido pulmonar de ratón.

Las células inmunopositivas para RAET1 i Casp3 fueron consideradas como el número de células positivas elegidas al azar en una área de alta resolución (aumentos

x400) de cinco campos por sección de tres secciones por ratón (n=7 ratones por grupo).

### 3.4.3 Fundamento de la inmunohistoquímica para MICA

La inmunoreactividad de MICA se estudió utilizando un anticuerpo monoclonal anti-mica humano MICA- $\beta$ 1 (clon AMO1; Immatics Biotechnologies). Las técnicas de inmunofluorescencia y de inmunoperoxidasa se realizaron de forma similar en cortes consecutivos utilizando anticuerpos secundarios (*anti-mouse*) unidos a diaminobencidina y peroxidasa (BD Biosciences – Pharmingen).

La metodología que se utilizó para evaluar la expresión (presente o ausente) y su intensidad (nula, leve, moderada o intensa) se basó en técnicas de inmunohistoquímica, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti-MICA humano. Todo el procesamiento inmunohistoquímico se realizó en un diseño ciego por parte del técnico.

Las muestras se procesaron en grupos (*lotes*) de 20 en cada ocasión. Las secciones tisulares con un grosor de 6  $\mu$ m que previamente se habían fijado en laminillas preparadas con APES, se procedía a su desparafinación y desenmascaramiento antigénico para posteriormente ser sometidas a la técnica de exposición al anticuerpo monoclonal. Se realizaron, a continuación, los lavados con solución tampón fosfato-salino y solución de peróxido de hidrógeno (15cc / 250 mL H<sub>2</sub>O). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se realizaron nuevos lavados con solución TFS. Finalmente, para el revelado de la reacción se utilizó un anticuerpo secundario (*anti-mouse*), con diaminobencidina y peroxidasa. El revelado se logró mediante la tinción con hematoxilina de Mayer.

Todas las muestras se procesaron por duplicado y se incluía un control negativo interno (isotipo control). En éste se realizó el mismo proceso pero no se añadió el anticuerpo primario, en cuyo lugar se incubó durante el tiempo necesario con tampón

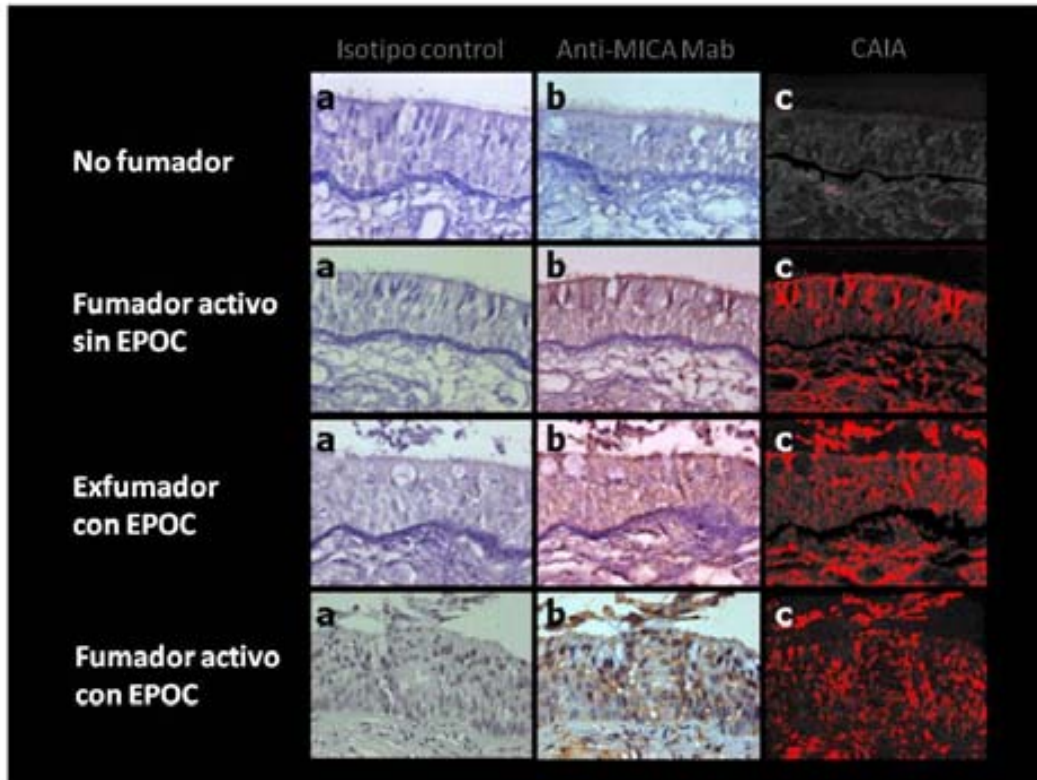
fosfato-salino como solución control. Las laminillas se almacenaron en un archivador específico, rotuladas por paciente y lote de procesamiento.

Disponemos de un control positivo que corresponde a células HeLa, que constituyen una línea de células epiteliales humanas procedentes del carcinoma de cérvix, y que además fueron las primeras células humanas de las cuales se obtuvo una línea celular permanente.

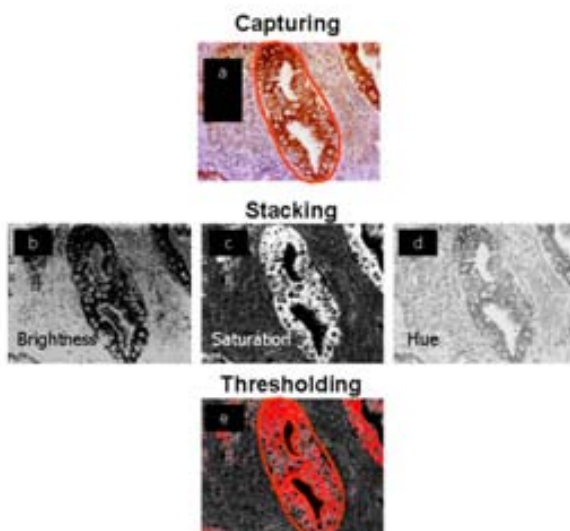
### **Análisis cuantitativo de la expresión de MICA.**

La expresión de MICA se evaluó en dos compartimentos: el epitelial y el mesenquimal. Se utilizó un baremo doble: el primero categorizaba la expresión como presente o ausente en cada compartimento y el segundo baremo la cuantificaba en cuatro niveles, de 0 a 3, según la expresión fuese nula (0), leve (1), moderada (2) o intensa (3). La lectura se realizó por tres observadores y en un diseño ciego: MOL, ASF y BCG. La media aritmética de las tres mediciones se utilizó en el análisis estadístico posterior. Se calculó el grado de correlación y la concordancia en la lectura interobservador.

Para la cuantificación objetiva se utilizó un software específico conocido como CAIA (*ImageJ 1.37, Wayne Rasband National Institute of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>*). Este método convierte el RGB (rojo, verde y azul) en HSI (color, saturación e intensidad). La inmunorreactividad se cuantificó utilizando el color (longitud de onda) y la saturación de la reacción en las células epiteliales. Se considera inmunorreactividad positiva cuando el 40% o más del área epitelial muestra una coloración roja/marronácea (Figuras 3.4.2 y 3.4.3).



**Figura 3.4.2.** Esquema que muestra la expresión de MICA en biopsias bronquiales de pacientes no fumadores, fumadores activos y exfumadores con y sin EPOC. Las imágenes muestran secciones teñidas del isotipo control (a), secciones con tinción para Anti-MICA positivas (b) y secciones con tinción para MICA positiva y modificadas mediante un software específico (CAIA) (c).



**Figura 3.4.3.** Esquema que muestra la cuantificación de MICA en biopsias bronquiales mediante el software CAIA:

- (a) Captura de la imagen
- (b) Brillo
- (c) Saturación
- (d) Intensidad
- (e) Umbral

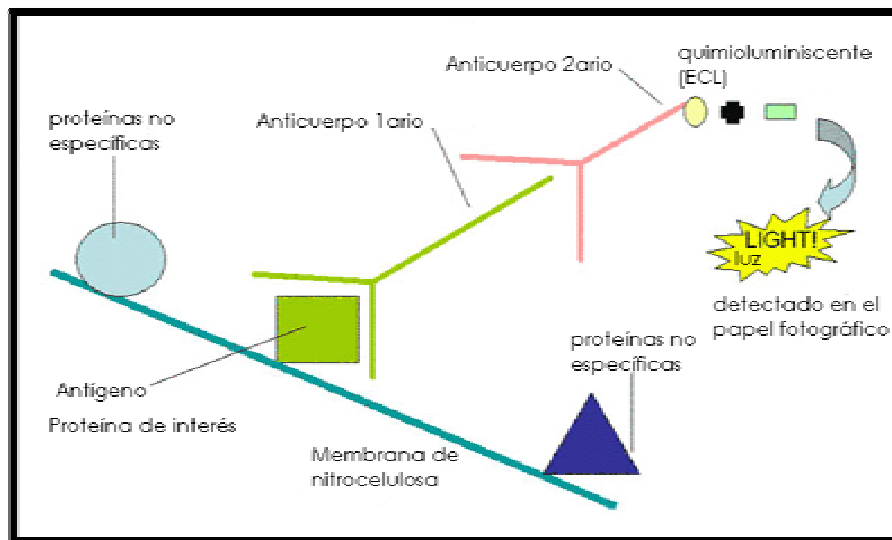
### 3.4.4 Fundamento de la técnica de *Western blot*

Este método fue descrito por Harry Towbin y es análogo al desarrollado por el Prof. Edwin Southern (*Southern blotting*). El procedimiento se fundamenta en la diferente velocidad de migración que presentan las proteínas a lo largo de un gel de poliacrilamida, debido a su diferente peso molecular. A continuación, las proteínas se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa, para lo cual se apila sucesivamente sobre una esponja plana, papel de filtro empapado en tampón de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, de nuevo papel de filtro y finalmente otra esponja plana. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cubeta en la que se encuentra una solución salina (tampón de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). El gel tiene que estar orientado hacia el ánodo (polo negativo) y la membrana hacia el cátodo (polo positivo). La carga neta de las proteínas para estos geles de *SDS-PAGE* (de inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) es positiva debida a la carga del SDS.

Una vez en la membrana de nitrocelulosa, las proteínas pueden ser identificadas y visualizadas. Nosotros empleamos un sistema de inmunodetección indirecta mediante el cual el anticuerpo primario se une a la proteína de interés y un segundo anticuerpo, marcado con un enzima, localiza los complejos antígeno-anticuerpo. Este anticuerpo secundario se halla marcado con peroxidasa y es detectado sobre una película radiográfica por una reacción de quimioluminiscencia (Figura 3.4.5).

La técnica de *Western blot* es empleada en nuestro laboratorio de forma rutinaria para hacer controles de especificidad de los anticuerpos comerciales utilizados en nuestros experimentos. De esta forma, conocemos el peso molecular de la proteína/s que detecta el antisuero de interés, y si se corresponde con el peso molecular previsto para la proteína frente a la cual el antisuero ha sido sintetizado.





**Figura 3.4.5.** Esquema que muestra las etapas de la técnica de *Western blot* sobre la membrana de nitrocelulosa.

En nuestro caso, las membranas celulares se incubaron durante toda una noche con anti-MICA (AF1300; R&D Systems) o anti-granzima B (clon 216315; R&D Systems) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario IgG-HRP-conjugado y se detectó mediante quimioluminiscencia (ECL Reagents; Amersham). Las membranas se lavaron y reanalizaron con anti-GAPDH o anticuerpos anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Las bandas de MICA y  $\beta$ -actina se cuantificaron mediante escaneado densitométrico utilizando un software especial ImageQuant (version 5.2; Molecular Dynamics).

### 3.4.5 Fundamento de la microscopía láser confocal y de la citometría de flujo

El **microscopio láser confocal** es fundamentalmente un microscopio óptico que incluye como fuente de luz un láser y un sistema electrónico que ayuda a la captura de las imágenes. Gracias a ello se consigue, por un lado, un aumento en la resolución y, por otro, la obtención de imágenes de secciones ópticas extremadamente finas,

eliminando así la interferencia que produce la luz procedente de los diferentes campos ópticos de todo el grosor de la muestra, consiguiendo que el enfoque se realice sobre un único plano (confocal). Por todo ello, y debido a que las imágenes obtenidas son imágenes digitales tridimensionales, es posible estudiar la ultraestructura celular. En nuestro caso, utilizamos un microscopio láser confocal espectral Leica TCS SP2 acoplado a un microscopio invertido (Leica DM IRBE).

La **citometría de flujo** es una técnica de análisis celular que consiste en medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células a medida que son atravesadas por un rayo de luz generado por un láser. Esta técnica es capaz de distinguir entre varias poblaciones celulares diferentes y detectar una población celular en una muestra en la que predominan mayoritariamente otras poblaciones celulares. Si utilizamos anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes se puede evaluar qué células poseen antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales utilizados. La citometría de flujo se realizó en nuestros experimentos mediante un citofluorómetro FACScan (BD Biosciences) y para la adquisición y el análisis de los datos se utilizó el software CellQuest (versión 5.2; BD Biosciences).

#### 3.4.6 Fundamento de los cultivos celulares de los alvéolos de ratón

La perfusión de los pulmones del ratón se realizó con 10 mL de una solución salina al 0,9% mediante inyección intravenosa a través del ventrículo derecho. También se instilaron 3 mL de Dispasa (Fisher) a través de una cánula por la tráquea, seguidos de 1 mL de agarosa fundida al 1% (Promega). Después de una incubación de dos minutos del animal en hielo para polimerizar la agarosa, se le extrajeron los pulmones y se incubaron por separado en 1 mL de Dispasa durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los pulmones se colocaron en placas de cultivo de 60 mm que contenían 7 mL de DMEM (Mediatech), 20 mL de HEPES (Fisher), 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (Invitrogen) y 100 U/mL de DNAsa I (Sigma-

Aldrich). Los pulmones se retiraron con cuidado de la suspensión celular, se agitaron durante 10 minutos y se dejaron en hielo. La suspensión celular se filtró sucesivamente a través de una gasa de nylon de 100  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$  y se centrifugó durante 8 minutos a 130 g. Posteriormente a la centrifugación, las células se resuspendieron en un medio DMEM completo (con 20 mM HEPES, 10% FBS, y 100 U/mL penicilina-estreptomicina). A continuación, se incubaron durante 2 horas las células en placas recubiertas con anticuerpos, 45  $\mu\text{g/mL}$  de CD45 frente a ratón y 16  $\mu\text{g/mL}$  de CD32 frente a ratón, en un incubador para cultivos tisulares (5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C). Las células que no se adherían se retiraron de las placas de anticuerpos, se lavaron con DMEM completo, se centrifugaron y se resuspendieron en medio DMEM completo. Posteriormente, las células se colocaron en placas de 6 pocillos recubiertas con una mezcla de 80% de Matrigel (BD Bioscience) y 20% de DMEM completo. Las células se conservaron en un medio DMEM enriquecido.

### 3.4.7 Fundamento de la exposición al humo del tabaco

La exposición al humo del tabaco se genera burbujando humo del cigarrillo de referencia en 10 mL de PBS a través de un recolector de partículas de polvo de 50 mL a una velocidad de 350 mL/min. El extracto que se obtiene, considerado un 100% de extracto de humo del tabaco, se pasa a través de un filtro de 0,22 mm. Se ajusta el pH de la muestra obtenida a 7,4 con NaOH antes de añadirlo a los cultivos de células epiteliales. El tratamiento del extracto de humo del tabaco se realizó en placas de 6 pocillos, y los experimentos se desarrollaron con una confluencia celular de aproximadamente el 80%. A continuación, las células se depositaron en un medio nuevo para que se equilibraran durante 2 horas ( $\text{CO}_2$  al 5% a 37°C), y se expusieron al extracto de humo del tabaco o a TFS durante 24 horas. Se eliminó el Matrigel de las células con Matrisperse (BD Bioscience), solución de recuperación no enzimática, siguiendo las indicaciones del fabricante, para garantizar el mínimo daño a los ligandos de la membrana celular. La expresión de la proteína RAET1 de las membranas

de las células epiteliales se determinó mediante el marcaje con el antisuero monoclonal RAET1  $\alpha$ -RAET1  $\epsilon$  (clon 186107; R&D Systems).

### 3.4.8 Fundamento de la preparación de los linfocitos de ratón y ensayos de citotoxicidad

Los linfocitos se aislaron del bazo del ratón y se purificaron usando un sistema de separación magnético siguiendo el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotech). Dicho protocolo utiliza una estrategia de selección negativa para retener magnéticamente los anticuerpos dirigidos frente a granulocitos. Se recuperan por lo general un 40% de linfocitos por bazo. Aproximadamente un 20% de los linfocitos del bazo expresan NKG2D tras el aislamiento, y siguen este ritmo hasta los 12 días si se mantienen en RPMI-1640, un medio de cultivo celular que contiene 100 U/mL de IL-2 humana recombinante. Todos los estudios de cultivos se llevaron a cabo con células recién aisladas en un medio RPMI-1640 que contiene 1000 U/mL de IL-2 humana recombinante y células epiteliales alveolares de ratón con extracto de humo de tabaco al 3% o PBS durante 24 horas. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron utilizando CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) según las instrucciones del fabricante.

### 3.4.9 Fundamento de los ratones transgénicos RAET1-Tg

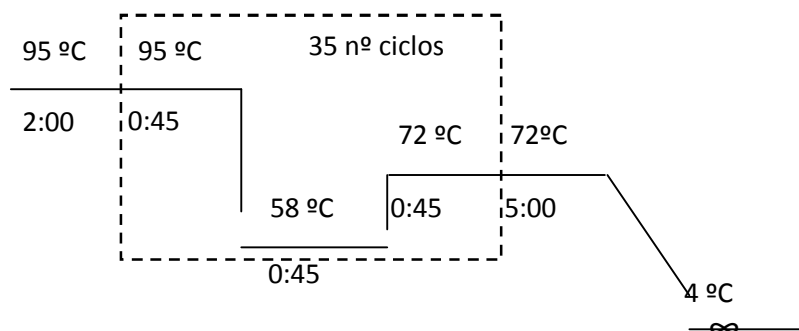
Un ratón transgénico es un animal al que se le ha modificado su ADN y por tanto su información genética. Estas modificaciones consisten bien en la introducción o bien en la eliminación de un gen (fragmento de ADN que codifica la información para producir una proteína). Mientras que insertando un gen de otro organismo en el genoma del ratón podemos obtener ratones transgénicos que producen proteínas que antes los ratones no eran capaces, eliminando un gen podemos averiguar en este nuevo animal transgénico qué función desempeñaba la proteína codificada por dicho gen. Existen diferentes

métodos para la obtención de un ratón transgénico: una de las técnicas más conocidas en el campo de la biomedicina y de la biología del desarrollo es la microinyección. Un gen de un organismo puede insertarse en un vector, que sirve como vehículo, y así es introducido en una bacteria. Sucesivas divisiones de la bacteria darán como resultado una población (un clon) que lleva el vector con el gen que hemos introducido. Existen métodos sencillos para la extracción de estos vectores, el gen puede ser liberado de ellos empleando enzimas de restricción que catalizan la reacción del corte del ADN en diversos puntos de secuencias específicas de nucleótidos. Como consecuencia, se obtienen de este modo un gran número de copias del gen que se quiere insertar en el ratón. El ADN lineal que incluye el gen a estudiar es entonces inyectado en uno de los pronúcleos (generalmente el masculino, por ser de mayor tamaño) de un ovocito de ratón fecundado, en una fase previa a la fusión pronuclear. El paso posterior es la fusión de los pronúcleos en la que el fragmento de ADN inyectado puede integrarse al azar en el ADN del ratón. La inserción debe producirse en un fragmento de ADN del ratón que no impida la expresión del gen introducido. Por otro lado, la inserción del gen a estudiar no debe alterar la expresión de los genes propios del ratón que puedan enmascarar el efecto de la inserción. También es fundamental que la inserción del gen no tenga un efecto letal en el ratón. Una estrategia similar, pero orientada a bloquear la expresión de un gen concreto de forma específica se utiliza para obtener ratones *knock-out* que permiten estudiar el efecto que produce la eliminación de la expresión de un gen en una determinada especie.

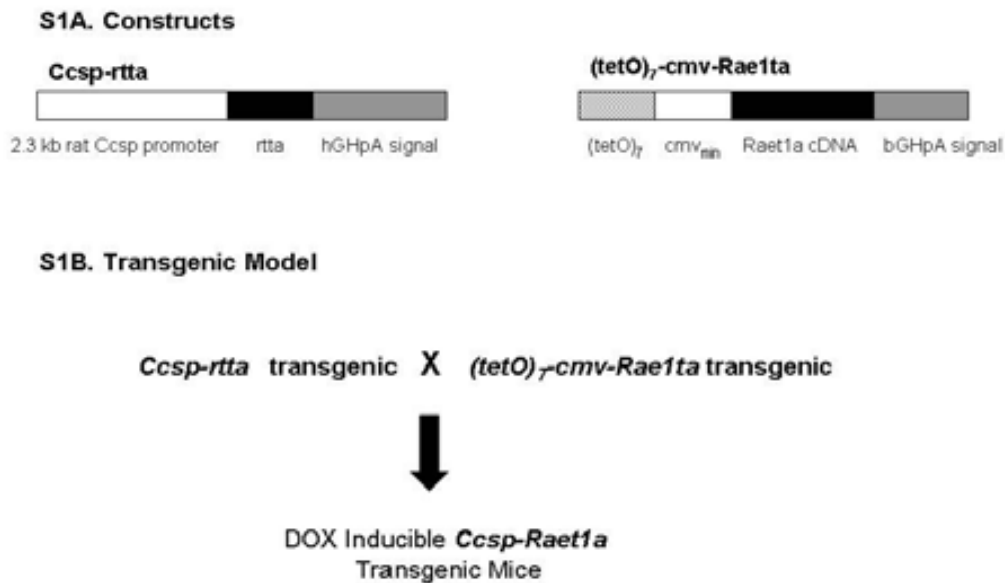
Para este estudio, se crearon ratones transgénicos *Ccsp-rtt* y ratones transgénicos *Ccsp-Raet1a* que expresan *Raet1a* tras la administración de un antibiótico: la doxiciclina. La doxiciclina se administraba a través de la dieta (TD.01306 dieta de ratón, 2018 mg de dieta y 625 mg de DOX; Harlan Teklad) empezando a la edad de 8-10 semanas.

Los ratones que albergan el gen transgénico  $(tetO)_7$ -CMV-*Raet1a* se crearon en la Universidad del Centro Médico de Cincinnati usando cADN de *RAET1* obtenido por clonación mediante PCR. Los ratones que son doblemente transgénicos *Ccsp-rtta* x

(tetO)7-CMV-Raet1a (a partir de ahora denominados ratones Raet1a-Tg) se identificaron utilizando *primers* de PCR específicos para cada transgénico como se detalla a continuación: el *primer forward* Ccsp-rtta es 5'-ACT GCC CAT TGC CCA AAC AC-3', y el *primer reverse* utilizado es 5'-AAA ATC TTG CCA GCT TTC CCC-3'; el *primer forward* del transgénico (tetO)7- CMV-Raet1a es 5'-TAG TTG CCA GCC ATC TGT TGT T-3', y el *primer reverse* es 5'-TCC TCC CCC TTG CTG TCC-3'. La amplificación de los productos de PCR para los transgénicos Ccsp-rtta y (tetO)7-CMV-Raet1a se realizó desnaturalizando a 95°C durante 2 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificación a 95°C durante 45s, 58°C durante 45s y 72°C durante 45s, finalizándose con una fase de extensión a 72°C durante 5 minutos (Figura 3.4.6.A). A los ratones Raet1a-Tg machos y hembras, de edades comprendidas entre 8 y 10 semanas, se les administró DOX en la dieta durante los 7 días previos a su uso experimental [TD.01306 rodent diet (2018, 625 DOX), Harlan Teklad, Madison, WI]. Los ratones FVB/NJ (hembras, edad 6-10 semanas) utilizados en estos estudios se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y permanecieron en el estabulario durante 1 semana o más antes de su uso. Todos los animals se alojaron en condiciones asépticas tal y como se indica en las guías institucionales, y todos los protocolos experimentales se revisaron y aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de la Universidad del Centro Médico de Cincinnati.



**Figura 3.4.6.A. Amplificación de los productos de PCR.** T<sup>a</sup>desnaturalización: 95°C; T<sup>a</sup>anillamiento: 58°C; T<sup>a</sup>extensión/elongación: 72°C; Producto de PCR (ADN amplificado); Se conserva a -20°C (son 25 µL).



**Figura 3.4.6.B.** Esquema que muestra la creación de ratones transgénicos *Rae1a* Tg en la Universidad del Centro Médico de Cincinnati.

*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

### 3.4.10 Fundamento de la depleción de linfocitos *in vivo*, ensayos de bioactividad de la caspasa y PCR cuantitativa en tiempo real

La población de linfocitos se depleccionó mediante la administración repetida intraperitoneal de anticuerpos (100-200  $\mu$ g/ratón, cada cuatro días y empezando ocho días antes a la administración de DOX) específicos contra las células NK (anti-asialo GM1; Wako Chemicals USA), células T- $\alpha\beta$  (clon H57-97), células T- $\gamma\delta$  (clon UC7-13D5), células CD4<sup>+</sup> (clon GK1.5) y células CD8<sup>+</sup> (clon 2.43). La depleción de linfocitos fue superior al 90% en todos los experimentos, confirmado mediante los análisis realizados en sangre periférica utilizando nuevamente la detección de anticuerpos contra las siguientes células: NK (anti-NKp46, clon 29A1.4; eBioscience), células T- $\alpha\beta$  (clon 145-2C11; BD Biosciences – Pharmingen), células T- $\gamma\delta$  (clon GL3; BD Biosciences – Pharmingen), células CD4<sup>+</sup> (clon LT34; BD Biosciences – Pharmingen) y células CD8<sup>+</sup> (clon 53-67; BD Biosciences – Pharmingen).

Para estimar la actividad de la Casp3/7 sobre el pulmón homogeneizado preparado en TFS se utilizaron unos kits comercializados siguiendo las instrucciones del fabricante (Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7 Assay; Promega).

El ARN se extrajo del pulmón del ratón mediante el kit de extracción del TRIzol (Applied Biosystems). Para cada gen examinado, la PCR-RT cuantitativa se realizó en un termociclador ABI 7300 utilizando TaqMan Gene Expression Assays Reagent (Invitrogen) validados y convertidos a continuación en cADN utilizando la High Capacity cDNA Reverse de acuerdo con los protocolos del fabricante (Applied Biosystems). La expresión de los genes se normalizó con gen endógeno de control *Hprt1*, y la cuantificación relativa de expresión del gen se calculó utilizando el método comparativo  $Ct^{(2^{-\Delta\Delta Ct})}$ .

#### **3.4.11 Fundamento de la obtención de lavado broncoalveolar (LBA) y recuento celular**

Después de la exposición, los ratones fueron anestesiados con 50 mg/Kg de pentobarbital sódico intraperitoneal y se extrajo toda la sangre a través de la aorta abdominal. Los pulmones se lavaron dos veces con 1 mL de HBSS. El lavado broncoalveolar (LBA) se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se separó y se conservó a 70°C. Al pellet celular se le añadió 1 mL de HBSS que contenía un 2% de TFS. El recuento celular total del contenido del lavado broncoalveolar se realizó mediante hemocitómetro y el recuento diferencial (>300 células) mediante tinciones de Diff-Quick (Baxter Diagnostics) en portas preparados con citospin (Cytospin3; Shandon Scientific).

#### **3.4.12 Fundamento de la caracterización de los linfocitos pulmonares**



Las suspensiones unicelulares de los pulmones perfundidos y digeridos se colocaron en una capa de un gradiente de Percoll de un solo paso (60% Percoll,  $\rho=1.084$ ; 1xHBSS; y 15 mM HEPES, pH 7.4) y se centrifugó a 2000 g durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante que contenía células mononucleares se retiró y se lavó en dos ocasiones con TFS que contenía un 2% de FCS. El precipitado celular entonces se lisó de eritrocitos y se resuspendió en TFS con 2% de FCS. Las células se marcaron con anticuerpos: Anticuerpos anti-CD3 (clon 145-2C11; BD Biosciences – Pharmingen), anti-TCR $\delta$  (clon GL3; BD Biosciences – Pharmingen), anti-CD4 (clon GK1.5; BD Biosciences – Pharmingen), anti-CD8 (clon 53-6.7; BD Biosciences – Pharmingen), anti-NK1.1 (clon PK136; BD Biosciences – Pharmingen), y anti-NKG2D (clon CX5; eBiosciences).

### 3.4.13 Fundamento del funcionalismo pulmonar

En los pacientes a los cuales se les realizó fibrobroncoscopia para la obtención de biopsias bronquiales, previamente se les evaluó la función pulmonar mediante espirometría forzada (Datospir900; SIBEL). Los volúmenes pulmonares estáticos, la resistencia de la vía aérea y la TL<sub>co</sub> se determinaron mediante pletismografía (Masterlab; Jaeger). Los valores de referencia utilizados fueron los de la población mediterránea (134).

Para los pacientes que se sometieron a toracotomía en la Universidad de Cincinnati, la función pulmonar se evaluó utilizando el Vmax Encore (Viasys Healthcare) de acuerdo con las guías de la *American Thoracic Society* (135). Los valores de referencia para esta población son los determinados por Morris (136). La EPOC se diagnosticó a partir de los criterios de la GOLD (1).

### 3.4.14 Fundamento de la tomografía computarizada (TC) torácica

Disponemos de TC torácica de 76 pacientes (93%) del total incluidos en el estudio. Todas las TCs se realizaron en decúbito supino mediante cortes de un grosor de 1,25 y 7 mm, con un tiempo de escaneo de 0,75 segundos y a 120 kV y 90 mAs

(SOMATOM Sensation 4; Siemens). Las imágenes se reconstruyeron utilizando algoritmos de resolución espacial de alta (B70) y baja (B40) frecuencia. Los escáneres se calibraron según protocolo estándar cada 6 meses y anualmente de acuerdo con las guías reguladoras nacionales. La exploración se realizó en inspiración máxima y sin la administración de contraste endovenoso. Se determinó la presencia de enfisema por un radiólogo que desconocía los datos clínicos del paciente. El diagnóstico radiológico de enfisema se realizaba si existían áreas de baja densidad centrolobular o por la presencia de cambios enfisematosos a nivel panlobular o paraseptal y se clasificó a los pacientes en tres categorías: los que no presentaban evidencia de enfisema, los que presentaban cambios sugestivos de enfisema y los que presentaban enfisema. En caso de discordancia, las imágenes eran revisadas de nuevo conjuntamente y se tomaba una decisión consensuada. Únicamente los pacientes catalogados como enfisematosos se utilizaron para los análisis posteriores.

### **3.4.15 Fundamento de la fibrobroncoscopia con obtención de las biopsias bronquiales y procesamiento de la pieza quirúrgica en el caso de toracotomía**

La fibrobroncoscopia se realizó con el paciente despierto y en posición supina, después de la administración de atropina (1 mg) intramuscular e diazepam (5 mg) sublingual. Se utilizó como anestésico tópico la lidocaína al 2% (20 mL máximo). Se utilizaron videobroncoscopios Olympus BF 1T160 y BF P-200 (Olympus, Tokyo, Japan).

Las muestras de biopsia bronquial se obtuvieron con pinzas de biopsia bronquial (FB 21-C; Olympus, Tokyo, Japan) de áreas macroscópicamente normales en los espolones de bronquios segmentarios. Las biopsias se preservaron en formol y se fijaron posteriormente en parafina para su adecuada conservación.

Las piezas quirúrgicas se obtuvieron de pacientes sometidos a una resección quirúrgica por patología pulmonar benigna o maligna. Las muestras correspondían a tejido pulmonar sano, distales al tumor, y la normalidad del tejido era verificada por un

patólogo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Cincinnati. Las muestras se transportaron en nitrógeno líquido para su posterior conservación a -80°C hasta el momento del procesamiento para la extracción de proteínas. En algunos pacientes, las muestras se introdujeron inmediatamente en medios de cultivo celulares.

### 3.4.16 Fundamento de los cultivos de tejido pulmonar humano y citometría de flujo

Las muestras de tejido pulmonar (alrededor de 1 g) obtenidas de pacientes sometidos a toracotomía se cortaron en cubitos, en fragmentos de menos de 5000 µL y se impregnaron en 4 mL de HBSS que contenía 175 U/mL de colagenasa, 0,2 U/mL de elastasa pancreática, 35 U/mL de hialuronidasa, 20 KU/mL de DNAsa (Sigma-Aldrich), 10% FCS, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (CellGro) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un agitador orbital. Los leucocitos se recuperaron sobre una solución de Percoll 30% y se centrifugaron a 400 g durante 40 minutos. La identificación de las células CD3+ (anti-human CD3, clon SK7, PerCP-C5.5 conjugado; BD Biosciences), CD4+ (anti-human CD4, clon RPA-T4, FITC conjugado; BD Biosciences), CD8+ (anti-human CD8, clon HIT8a, PE conjugado; BD Biosciences), NK (anti-human CD56, clon B159, APC conjugado; BD Biosciences) y NKG2D+ (anti-human NKG2D, clon 1D11, APC conjugado; BD Biosciences) se determinó mediante citometría de flujo utilizando un citofluorómetro FACSCalibur (BD Biosciences). La adquisición y análisis de los datos se realizó con el software CellQuest Pro (version 5.2; BD Biosciences).

### 3.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  DE o porcentajes. Para la comparación de la frecuencia de la presencia de MICA en los diferentes grupos se utilizó el Test  $\chi^2$ . El análisis de las diferentes variables de función pulmonar se compararon utilizando el Test T de Student entre pacientes con MICA (-) y MICA (+). El riesgo se estimó mediante regresión logística. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0.05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (SPSS Versión 11.5, 2002, SPSS Inc., Chicago, EUA).

## 3.6 Protocolos

A continuación, describimos los protocolos de las técnicas inmunocitoquímicas y de *Western blot* utilizadas en este estudio:

### 3.6.1 Técnica de la avidina-biotina peroxidasa preinclusión para microscopía de luz

Todos los animales fueron anestesiados con una mezcla de 60 mg/kg de pentobarbital y 1 g/kg uretano inyectada intraperitonealmente. La perfusión fue transcardiaca con tampón fosfato salino (TFP, pH 7,4) durante 20 segundos (s), seguido por una solución de fijador que contenía 4 % de formaldehído, 0,1 % de glutaraldehído y 0,2 % de ácido pícrico en tampón fosfato 0,1M (TF, pH 7,4). Las perfusiones se realizaron a temperatura (Tª) ambiente. Una vez extraídas las muestras, procedimos de la siguiente manera:

1. Crioprotección en sacarosa al 15 % en TF 0,1M y posteriormente al 30 % a 4°C.
2. Cortes en criotomo, secciones parasagitales de 50 µm recogidas en TFS 0,1M.
3. Bloqueo en suero normal de cabra al 1,5 % en TFS durante 1 hora (h) a Tª ambiente.
4. Incubación en anticuerpo (1:500) en 1,5 % suero normal de cabra en TFS 0,1M durante 2 días a 4°C.
5. Lavados en TFS durante 2 h a Tª ambiente.
6. Incubación con anticuerpo secundario biotinilado (1:200) en suero normal de cabra al 1,5 % en TFS durante 1,5 h a Tª ambiente.
7. Lavados en TFS durante 24 h a 4°C.

---

**8.** Incubación en complejo avidina-biotina en TFS durante 1 h a Tª ambiente.

**9.** Lavados en TFS durante 2 h a Tª ambiente.

**10.** Incubación con DAB al 0,05 % en TF 0,1M y peróxido de hidrógeno al 0,01 % durante 5 minutos (min) a Tª ambiente.

**11.** Lavados con TFS 0,1M durante 30 min a Tª ambiente.

**12.** Montaje de las secciones sobre portaobjetos gelatinizados.

**13.** Secado.

**14.** Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 70°, 96°, 100°) durante 5 min.

**15.** Aclarado en xilol durante 15 min.

**16.** Se cubren los portaobjetos con el medio de montaje DPX (Fluka, Suiza).

**17.** Observación del material en un microscopio de luz.

---

### 3.6.2 Técnica de *Western blot*

Todos los animales fueron anestesiados con cloroformo tras lo cual fueron decapitados. Se extrajeron los pulmones de dos ratones C57 de 4 semanas.

1. Homogeneización del tejido en lisis buffer (NaCl 1M, Hepes 1M, inhibidores de proteasas y 1 % Tritón X-100) para extraer las proteínas de membrana.
  2. Cuantificación de las proteínas por el método Bradford.
  3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (7,50 %), cargando cada pocillo con un total de 40 µg de proteínas. 126 V durante 1 h a Tª ambiente.
  4. Transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Se utiliza una transferencia húmeda a 100 V y 300 mA durante 1h.
  5. Bloqueo de la membrana en 5 % de leche en polvo en TFS durante 1 h, Tª ambiente.
  6. Incubación en anticuerpo primario (1:200) en TBS durante toda la noche a 4°C.
  7. Lavados en TBST durante 1 h a Tª ambiente.
  8. Incubación en anticuerpo secundario (1:3.000) peroxidasa en TBST durante 2h a Tª ambiente.
  9. Lavados en TBST durante 1 h a Tª ambiente.
  10. Revelado en oscuridad con kit comercial ECL (quimioluminiscencia aumentada) sobre papel radiográfico.
-

### 3.6.3 Técnica de la tinción con Ac anti-MICA

#### 1. Desparafinar.

Batería compuesta de xiloles (3 cubetas), alcoholes de 100° (2 cubetas), 96° (2 cubetas), 70° (1 cubeta) y agua destilada (1 cubeta). En cada xilol 10 minutos mínimo.

#### 2. Recuperación antigénica.

Citrato pH 7.3 en autoclave (3 minutos a 120°C).

#### 3. Lavados en TFS, después de cada paso.

#### 4. Peroxidasa al 2% durante 2 minutos a Tª ambiente.

#### 5. Lavados en TFS durante 1 h a Tª ambiente.

#### 6. Incubación en anticuerpo primario (1:50 - 1:200) en TBS durante 30 minutos a 4°C.

#### 7. Lavados en TFS durante 1 h a Tª ambiente.

#### 8. Incubación en anticuerpo secundario peroxidasa en TBST durante 30 minutos a Tª ambiente.

#### 9. Lavados en TFS durante 1 h a Tª ambiente.

#### 10. 1 mL de Dab y gota de concentrado durante 5 minutos a Tª ambiente.

#### 11. Lavados en TFS durante 1 h a Tª ambiente.

#### 12. Tinción con Hematoxilina, 5 minutos a Tª ambiente.

#### 13. Limpiar con agua.

#### 14. Deshidratar y montar con DPX. Batería de alcoholes y xiloles.

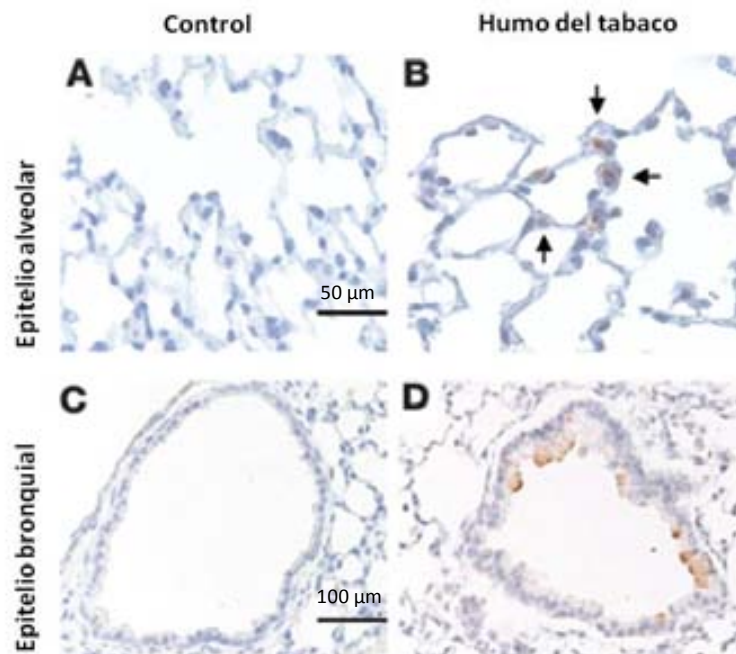


## 4. Resultados

### 4.1 El humo del tabaco induce la síntesis de ligandos de NKG2D en el epitelio pulmonar del ratón

Sabemos que la exposición prolongada al humo del tabaco es la principal causa de la EPOC y, especialmente, de enfisema pulmonar.

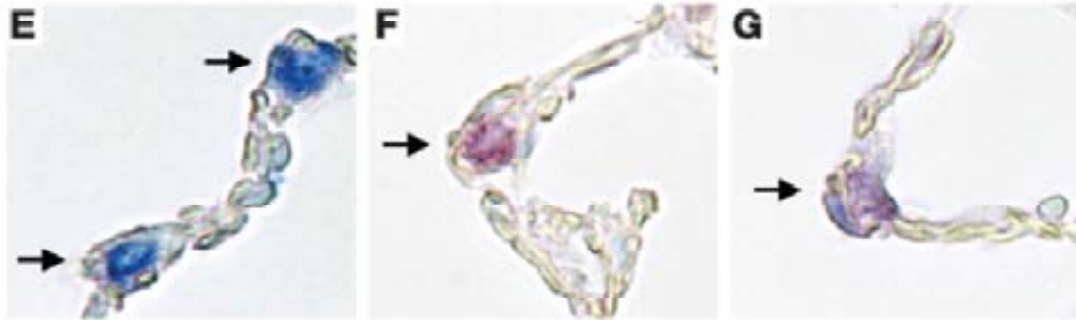
Por este motivo, primero examinamos si la exposición al humo del tabaco inducía la expresión del ligando de NKG2D en el ratón: RAET1 (*Retinoic Acid Early Transcript 1*) en un modelo murino de enfisema. El análisis inmunohistoquímico demostró que la exposición durante seis meses al humo del tabaco inducía la expresión de forma mantenida de RAET1 en el epitelio bronquial y alveolar (Figura 4.1.1).



**Figura 4.1.1.** Expresión de RAET1 demostrada mediante inmunohistoquímica en el epitelio alveolar y bronquial de ratones expuestos a aire filtrado (controles: **A** y **C**) o al humo del tabaco (**B** y **D**) después de 6 meses. Las flechas señalan a las células RAET1+. *J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

### 4.1.1 Expresión de RAET1 en el epitelio alveolar

Asimismo, demostramos la expresión de RAET1 en las células del epitelio alveolar mediante el doble marcaje de RAET1 junto con el marcador específico pro-SCP específico de las células tipo II del epitelio alveolar (Figura 4.1.2).

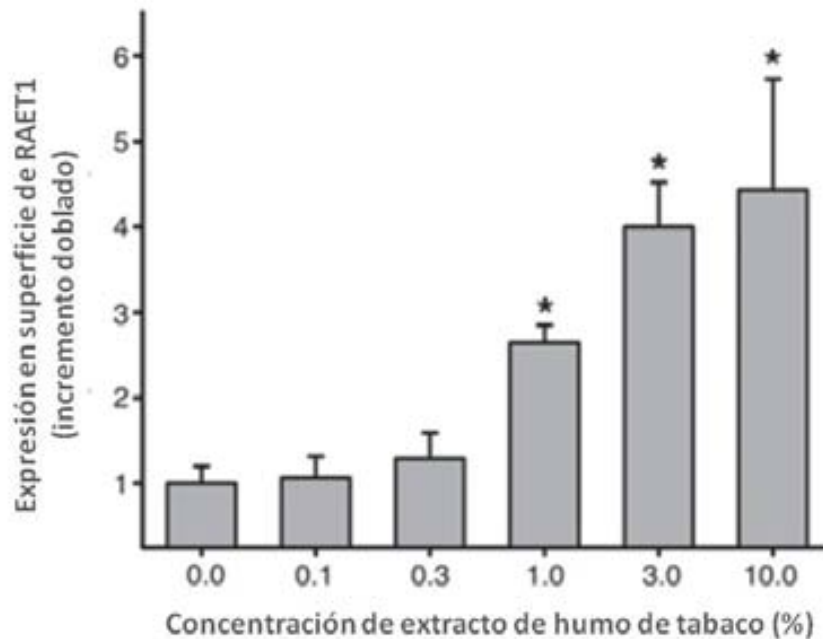


**Figura 4.1.2.** Cortes de epitelio alveolar de ratones expuestos al humo del tabaco que fueron teñidos con pro-SCP (en azul; **E**), RAET1 (en rojo; **F**) o los dos (en lila; **G**). Las flechas señalan a las células epiteliales alveolares (x400). *J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

La expresión de RAET1 coincidía con el desarrollo de enfisema, determinado por un incremento en el diámetro alveolar. En contraposición, la expresión de RAET1 no se observó en los ratones expuestos exclusivamente a aire filtrado. La determinación de la expresión del receptor NKG2D en el pulmón revelaba que aproximadamente el 20% de los linfocitos pulmonares lo expresaban. Esto representa una sustancial población efectora que correspondería de  $2 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  células en el pulmón del ratón, indicando que la sobreexpresión del ligando es el factor limitante en esta patología.

Para evaluar, *in vitro*, si el humo del tabaco inducía directamente la expresión del ligando de NKG2D en las células del epitelio pulmonar del ratón, expusimos a células epiteliales alveolares tipo II a extracto de humo de tabaco y analizamos los niveles en superficie de RAET1 mediante citometría de flujo. Las células epiteliales no tratadas presentaban una expresión negligible de RAET1. Sin embargo, similar a los

efectos *in vivo*, el extracto de humo de tabaco inducía la expresión de RAET1 en superficie (Figura 4.1.3).

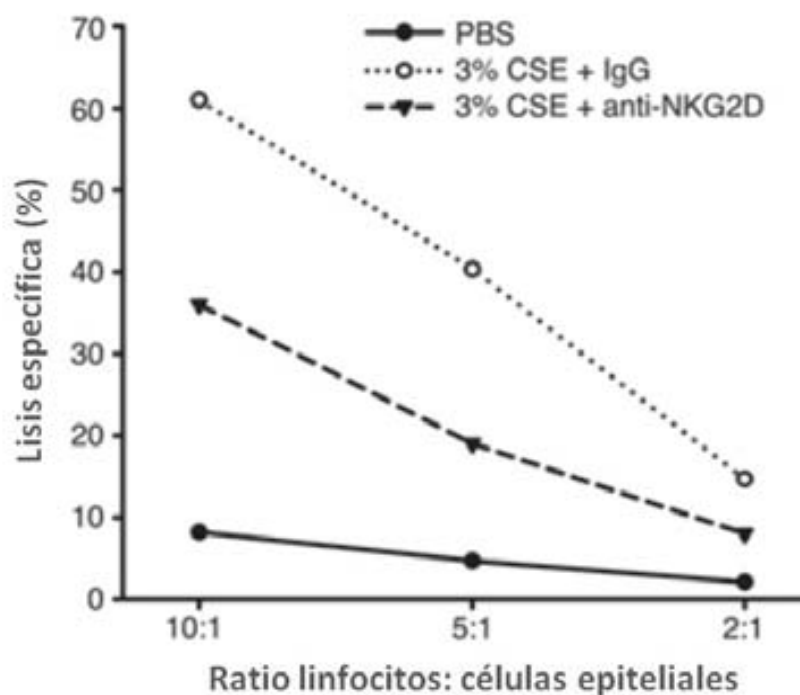


**Figura 4.1.3.** La expresión en superficie de RAET1 en las células epiteliales alveolares tipo II dependiendo de la concentración de extracto de humo de tabaco determinada por citometría de flujo y su incremento doblado derivado de los valores de intensidad de fluorescencia.  
*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

## 4.2 El ligando de NKG2D induce en el epitelio alveolar la activación de las células activadoras de linfocitos T *in vitro*

Para evaluar el significado funcional de la inducción del ligando de NKG2D en respuesta al humo de tabaco, creamos un sistema de cultivos utilizando células alveolares tipo II de ratón y linfocitos. Las células epiteliales tratadas con extracto de humo de tabaco (CSE, del inglés *Cigarette Smoke Extract*) eran responsables de una mayor activación de las células estimuladoras de linfocitos comparadas con las

células epiteliales tratadas con PBS, medido como lisis específica de estas células epiteliales (Figura 4.2.1). Para definir la contribución de los ligandos del receptor NKG2D en la citotoxicidad de las células epiteliales, incubamos inicialmente los linfocitos con un anticuerpo bloqueador del receptor NKG2D y posteriormente los cultivamos con las células epiteliales tratadas con extracto de humo de tabaco. La función del NKG2D bloqueado reducía la actividad citolítica frente a las células epiteliales tratadas con extracto de humo de tabaco aproximadamente al 50%. Estos hallazgos demuestran que la inducción del ligando de NKG2D en el epitelio alveolar es el mayor determinante de la activación de las células activadoras de linfocitos T ante la exposición al humo del tabaco.



**Figura 4.2.1.** La gráfica muestra la lisis específica de células epiteliales tratadas con extracto de humo de tabaco ( $1 \times 10^4$  células). Las células epiteliales habían sido cultivadas con linfocitos en las proporciones indicadas. Se muestran los resultados para células epiteliales tratadas con PBS, células epiteliales tratadas con un 3% de extracto de humo de tabaco y células epiteliales tratadas con un 3% de extracto de humo de tabaco cultivadas con linfocitos unidos a un anticuerpo que bloquea el receptor NKG2D en el ratón.

*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

## 4.3 La sobreexpresión de ligandos de NKG2D en ratones transgénicos induce enfisema pulmonar

Para caracterizar la respuesta provocada por los ligandos de NKG2D y su función en la fisiopatología pulmonar, creamos un modelo de ratones transgénicos que nos permitía la expresión controlada de *Raet1a* en las células del epitelio pulmonar. Expresamos *Raet1a* en las células epiteliales bronquiales mediante la administración de doxiciclina (DOX) utilizando el sistema *ccsp-rtTA* transgénico, descrito en el apartado de Material y Métodos.

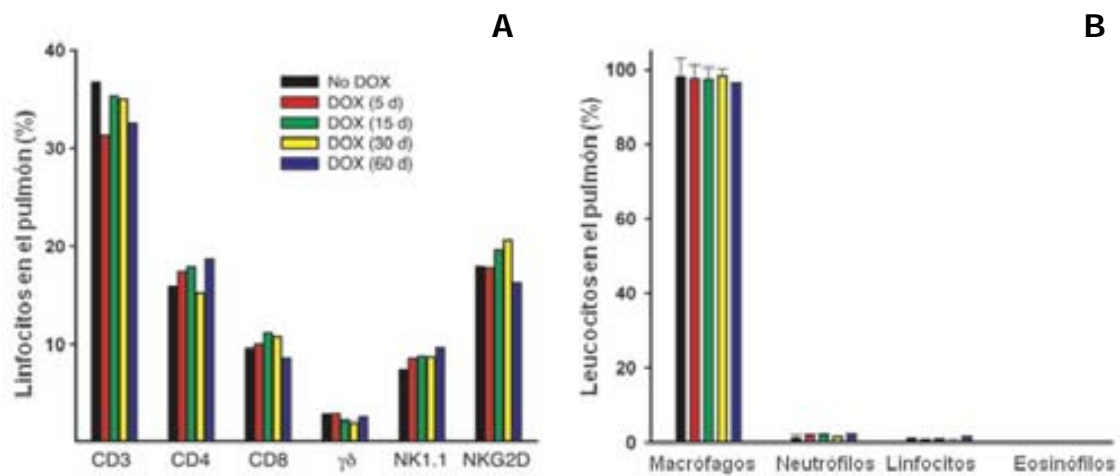
Creamos tres líneas de ratones *Raet1a Tg* distintas:

- La línea 20 *Raet1a Tg* para demostrar la inducción de la transcripción de *Raet1a* tras la administración de doxiciclina (DOX).
- La línea 32 *Raet1a Tg* la utilizamos para demostrar la inducción de la transcripción de *Raet1a*.
- La línea 22 *Raet1a Tg* se caracteriza por una importante inducción a la transcripción de *Raet1a*.

Primero estudiamos cómo la expresión del ligando de NKG2D afectaba la composición de la población de leucocitos en el pulmón del modelo murino. Nuestros hallazgos sugieren que la expresión de RAET1 no altera la composición de la población pulmonar de linfocitos (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> y células NK) ni el porcentaje de linfocitos NKG2D<sup>+</sup> (Figura 4.3.1A). Tampoco existen diferencias significativas ( $p > 0.6$ ) en el recuento celular en cuanto a macrófagos, neutrófilos y linfocitos del lavado broncoalveolar (LBA) en comparación con el grupo control (Figura 4.3.1B).

El estudio histológico de los pulmones de los ratones *Raet1a Tg* tras la administración de doxiciclina revelaba que la expresión de RAET1 causaba una progresiva destrucción de la arquitectura alveolar, responsable del enfisema pulmonar (Figura 4.3.1C). La intersección lineal media es un parámetro morfológico que mide el incremento de espacio aéreo sobre secciones de tejido pulmonar.

Posteriormente se demostró también que el receptor NKG2D mediaba específicamente los efectos de la expresión de RAET1 al administrar un anticuerpo bloqueador de NKG2D en los ratones *Raet1a* Tg. Se observó en los ratones transgénicos que al bloquear el receptor de NKG2D se interrumpía la destrucción alveolar (Figura 4.3.1C). Este hallazgo sugiere que la lisis alveolar, como consecuencia de la expresión de RAET1, se encuentra mediada exclusivamente por el receptor NKG2D. En este sentido, se demostró la relativa contribución de las subpoblaciones de linfocitos a la destrucción alveolar observada en los ratones *Raet1a* Tg. La eliminación de las células NK utilizando un anticuerpo específico (anti-asialo GM1) disminuye significativamente los efectos de la expresión de RAET1 en este modelo murino (Figura 4.3.3). La depleción de CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, αβ<sup>+</sup> y γδ<sup>+</sup> no tiene efectos significativamente relevantes en cuanto al desarrollo del enfisema pulmonar.

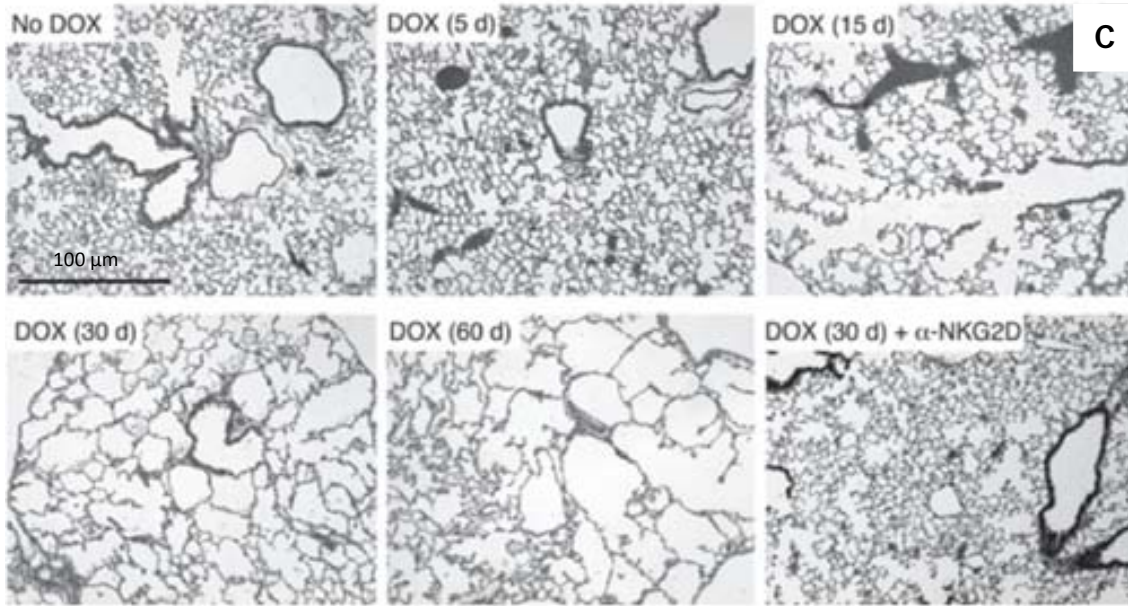


**Figura 4.3.1.**

(A) Proporción de la población pulmonar de linfocitos y de linfocitos NKG2D<sup>+</sup> en función de la administración de DOX.

(B) Proporción de las diferentes subpoblaciones linfocitarias (en el lavado broncoalveolar) en función de la administración de DOX.

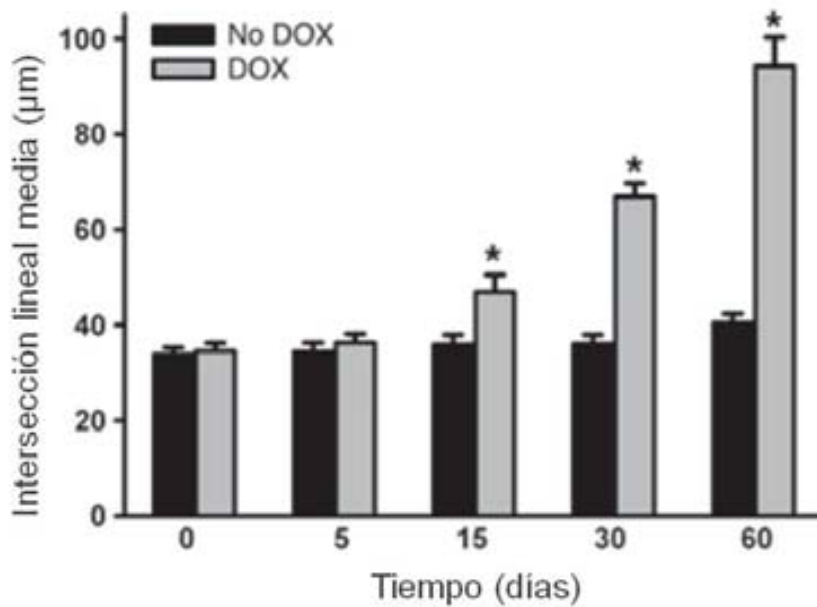
*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.



**Figura 4.3.1.**

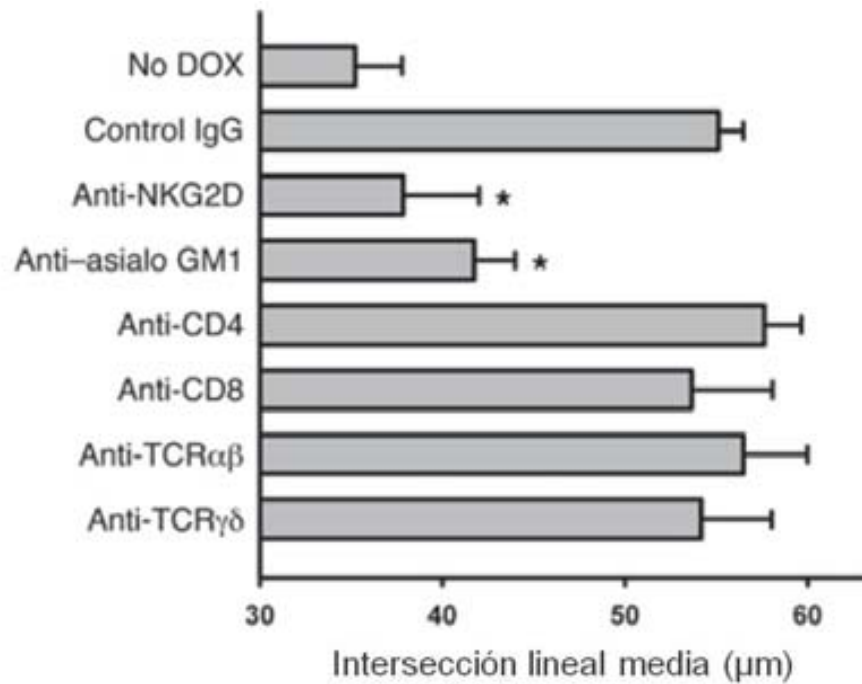
(C) Tinción de hematoxilina-eosina de secciones pulmonares de ratones a los que se administró doxiciclina (DOX) durante 5, 15, 30 y 60 días o que se administró DOX durante 30 días junto a un anticuerpo anti-NKG2D.

*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.



**Figura 4.3.2.** Gráfica que muestra la destrucción alveolar en relación al tiempo cuantificado como intersección lineal media en relación a la administración de doxiciclina, inductor de la síntesis de *Raet1a*.

*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.



**Figura 4.3.3.** La población de linfocitos fue específicamente depleccionada y se evaluó después de 30 días de tratamiento con DOX.  
 \* $p < 0.05$  respecto al grupo control no DOX.  
*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

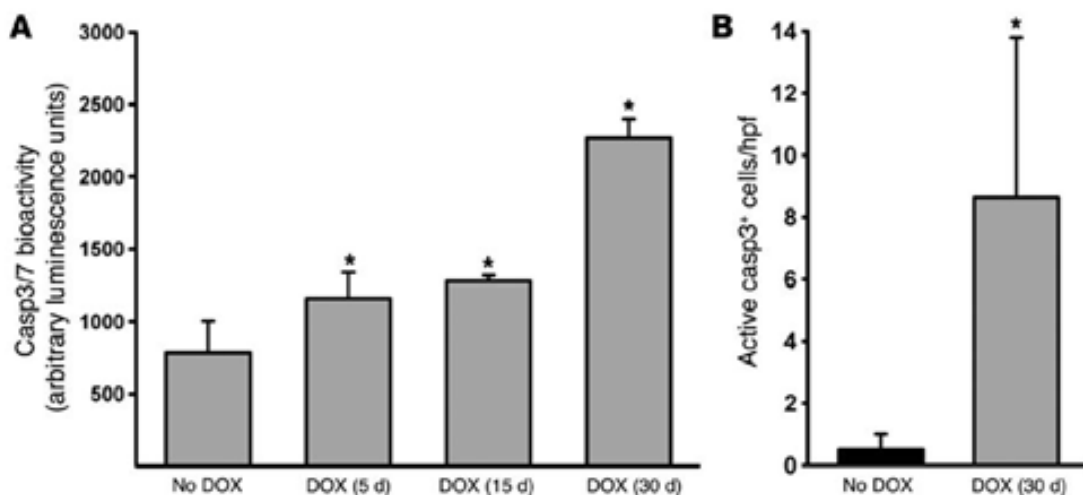
#### 4.4 La sobreexpresión de ligandos de NKG2D en ratones transgénicos induce apoptosis y activación de las células estimuladoras de linfocitos T, pero no inflamación

Se sabe que la activación del receptor NKG2D es el responsable de iniciar múltiples respuestas incluídas la inflamación, la modulación de la respuesta inmune adaptativa y la apoptosis de las células que expresan el ligando de NKG2D. En este sentido, queríamos estudiar también la posible contribución de este mecanismo como responsable del desarrollo de enfisema pulmonar.

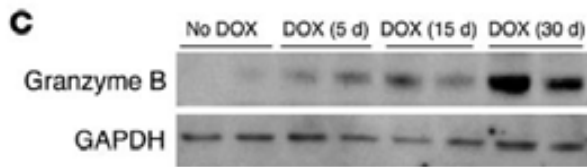


El análisis de la bioactividad de los marcadores de apoptosis como caspasa 3 (Casp 3) y Casp 3/7 revelaban que las señales de apoptosis en los pulmones de los ratones *Raet1a* Tg se encontraban incrementados (Figuras 4.4.1A y 4.4.1B). El análisis inmunohistoquímico mostraba que las células Casp3<sup>+</sup> se encontraban en los compartimentos alveolares, determinando un fenotipo enfisematoso.

Se analizó la activación de las células estimuladoras de linfocitos para medir la enzima efectora de apoptosis denominada granzima B. Consistente con el papel que desempeñan las células activadoras de linfocitos activadas durante la apoptosis de células epiteliales, se observó un incremento en los niveles de proteína granzima B en los pulmones de los ratones *Raet1a* Tg antes y durante el proceso de destrucción alveolar (Figura 4.4.1C). Estos resultados son coherentes con los obtenidos anteriormente y que demostraban una inducción de los ligandos de NKG2D por el humo del tabaco y la consiguiente activación de las células activadoras de linfocitos. Por tanto, la inducción de los ligandos de NKG2D es la responsable de una activación del sistema inmune y favorece la destrucción y/o remodelamiento de las células epiteliales pulmonares.



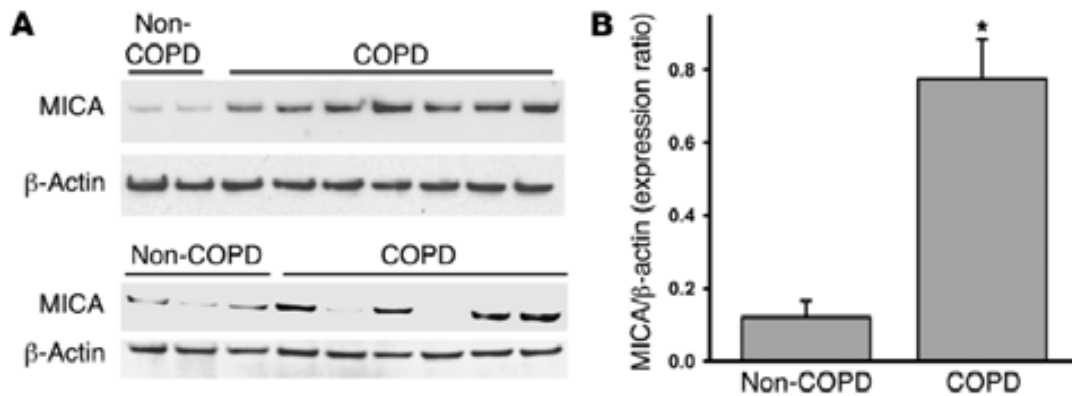
**Figura 4.4.1 (A)** Expresión de caspasa en pulmones de ratones *Raet1a* Tg después de 30 días de doxiciclina determinada por la bioactividad de Casp3/7 (n=5 por grupo). **(B)** Expresión de caspasa3 en pulmones de ratones *Raet1a* Tg después de 30 días de doxiciclina determinado por técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo específico frente a la caspasa activada. Expresado como células por campo (media +/- DE) (n=5 por grupo). *J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.



**Figura 4.4.1 (C)** La función efectora de las células activadoras de linfocitos inducida por la expresión del ligando de NKG2D *in vivo*. El análisis mediante técnica de *western blot* sobre pulmón homogeneizado utilizando un anticuerpo específico granzyme B muestra un incremento en la expresión de proteína después de la inducción del ligando de NKG2D en células epiteliales pulmonares.  
*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

## 4.5 La elevada expresión del ligando de NKG2D en el pulmón de los pacientes afectos de EPOC se asocia al desarrollo de dicha enfermedad

Para tratar de investigar el potencial papel de NKG2D en la EPOC y establecer su asociación con diversos aspectos clínicos de la enfermedad, examinamos la expresión en el pulmón de MICA, principal ligando de NKG2D, en humanos con o sin enfermedad pulmonar obstructiva crónica. El análisis por inmunoblot del tejido pulmonar obtenido de resecciones quirúrgicas demostró que los niveles de MICA se encontraban significativamente más elevados en los pacientes con EPOC (Figura 4.5.1). La expresión de MICA no se detectó en muestras de hígado en pacientes diagnosticados de EPOC, lo que sugiere que la sobreexpresión de MICA no es un hallazgo constante en tejidos obtenidos de pacientes con EPOC.



**Figura 4.5.1. (A)** Niveles de MICA en parénquima pulmonar de pacientes sin EPOC y EPOC determinado mediante análisis de inmunoblots.

**(B)** Expresión relativa de MICA y bandas de  $\beta$ -actina cuantificados mediante densitometría y expresado como ratio MICA/ $\beta$ -actina.

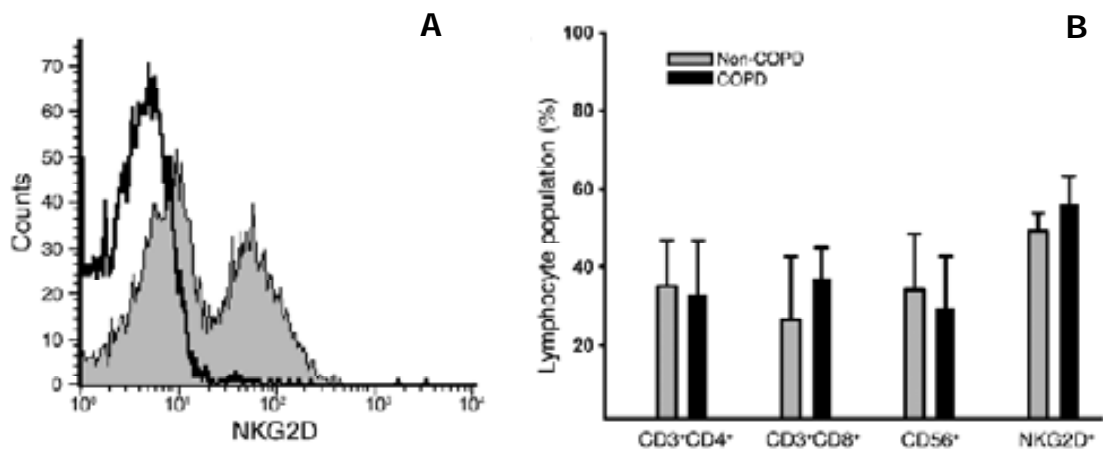
Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

(n=5, no EPOC; n=10, EPOC)

\*p<0.05 en relación a no-EPOC.

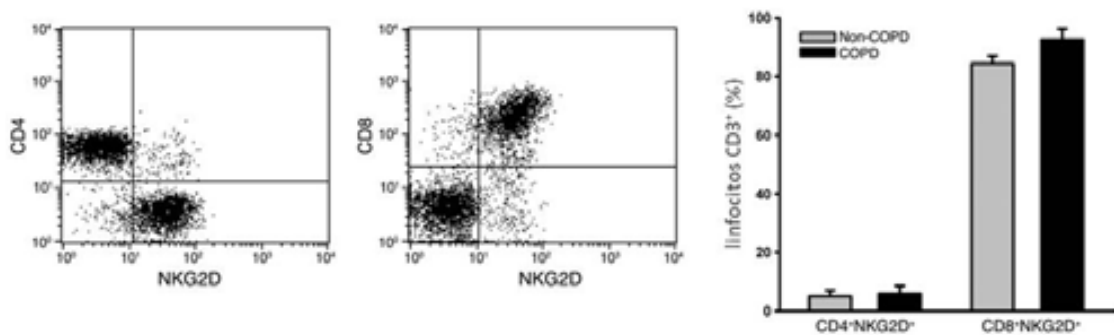
*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

Debido a la presencia en la pequeña vía aérea y en el parénquima pulmonar de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y linfocitos NK, así como de sus proteasas, cuantificamos las subpoblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), células NK (CD56<sup>+</sup>) y células NKG2D<sup>+</sup> en tejido pulmonar periférico de pacientes con EPOC y sin EPOC que se sometieron a cirugía torácica. La citometría de flujo indicó que los receptores NKG2D se expresaban en más del 50% del total de la población de linfocitos T en el pulmón periférico (Figura 4.5.2A). El porcentaje de células NKG2D<sup>+</sup> no mostró diferencia en los distintos grupos (Figura 4.5.2B).



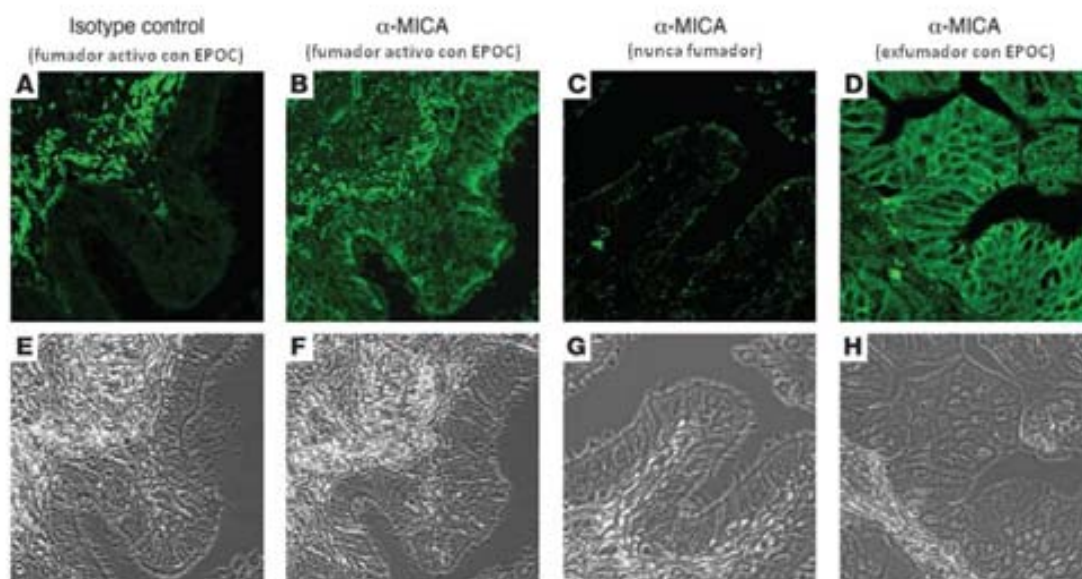
**Figura 4.5.2. (A)** Expresión de NKG2D<sup>+</sup> en el parénquima pulmonar de los pacientes con EPOC y sin EPOC **(B)** Proporción de las subpoblaciones de linfocitos y NKG2D<sup>+</sup> en el parénquima pulmonar de los pacientes con EPOC y sin EPOC. (n=5, no EPOC; n=10, EPOC) *J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

Las células NK, que constitutivamente expresan NKG2D, representa más del 30% de la población de linfocitos T en el pulmón periférico. Fenotipando los linfocitos T CD3<sup>+</sup> observamos que más del 90% de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos son NKG2D<sup>+</sup> mientras que menos del 5% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresan NKG2D (Figura 4.5.3).

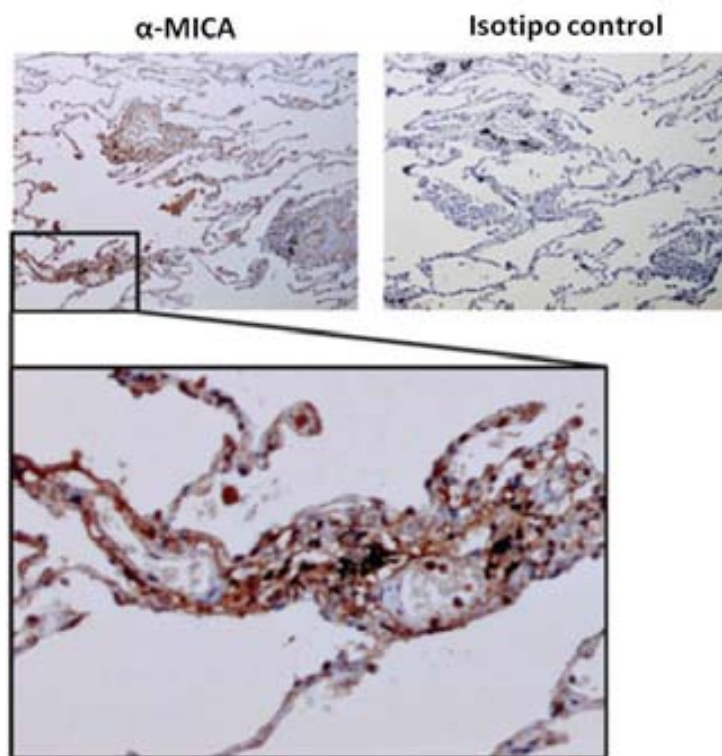


**Figura 4.5.3.** Cuantificación en muestras de pulmón periférico de linfocitos T CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> en pacientes EPOC. Presencia relativa de linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> y linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> en muestras de pulmón periférico en pacientes EPOC y no EPOC. Valores expresados como media ± desviación estándar. (n=5, no EPOC; n=10, EPOC) *J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

Para poder estudiar la relación entre la expresión del ligando de NKG2D y el desarrollo de la EPOC, analizamos la expresión de MICA en biopsias bronquiales obtenidas de 93 pacientes (21 nunca fumadores, 30 exfumadores y 42 fumadores activos). Estos pacientes fueron caracterizados en cuanto a la función pulmonar, la presencia o no de cáncer de pulmón, y el crecimiento de bacterias en el cultivo del broncoaspirado obtenido mediante fibrobroncoscopia. La tinción de MICA en las biopsias bronquiales de los pacientes fumadores activos y exfumadores se encontraba en las membranas apical y basolateral de las células epiteliales de la vía aérea (Figura 4.5.4). El análisis de la expresión de MICA en el epitelio alveolar mostraba un patrón de tinción más difuso, posiblemente reflejando una expresión en el endotelio vascular (Figura 4.5.5).



**Figura 4.5.4.** La expresión de MICA se asocia con la EPOC. **(A-D)** Expresión de MICA en el epitelio bronquial y alveolar detectado por inmunohistoquímica. La detección por inmunofluorescencia de la expresión de MICA en el epitelio bronquial se obtuvo mediante microscopía confocal en fumadores activos con EPOC (**A** y **B** son cortes del mismo paciente para demostrar la tinción en el isotipo control), nunca fumadores (**C**) y exfumadores con EPOC (**D**). **(E-H)** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. *J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.



**Figura 4.5.5.** Expresión de MICA en el epitelio alveolar por microscopía óptica en la periferia pulmonar de un exfumador con EPOC. (x40; x200)  
*J. Clin. Invest.* 2009; 119:636-649.

Las estimaciones de riesgo indican que el género, el hábito tabáquico, la presencia de síntomas de bronquitis crónica y el diagnóstico de EPOC se encuentran fuertemente asociados a la expresión de MICA en el epitelio de la vía aérea.

El FEV<sub>1</sub>, un marcador del grado de obstrucción, y la TL<sub>CO</sub>, un marcador de enfisema pulmonar, se encuentran significativamente reducidos en los pacientes MICA+. La evidencia macroscópica de enfisema, demostrada en 21 (23%) de los pacientes a los que se realizó TC torácico (n=87), se asociaba a una disminución de la TL<sub>CO</sub> ( $67 \pm 14$ , cuando el enfisema era evidente versus  $83 \pm 22$ , cuando el enfisema no era evidente;  $p=0.009$ ) y de la K<sub>CO</sub>, que equivale a la DL<sub>CO</sub> normalizada por el volumen alveolar efectivo ( $75 \pm 13$  versus  $92 \pm 19$ ;  $p=0.01$ ). Encontramos una asociación cercana a la significación entre el enfisema descrito macroscópicamente por técnicas de imagen y la expresión de MICA ( $p=0.07$ ). También demostramos que la expresión de

MICA se asocia con la presencia de cáncer pero no con la existencia de infección bronquial concomitante.

Aunque las biopsias bronquiales no representan el tejido diana donde se desarrolla el enfisema pulmonar, hemos evaluado estas muestras por diversos motivos: la EPOC es una compleja enfermedad que puede presentar una mezcla de enfisema pulmonar y de bronquitis crónica y es razonable asumir que los cambios que se dan en la vía aérea de estos pacientes son un reflejo y predicen los cambios que acontecen en el parénquima pulmonar. Sin duda, la mayor accesibilidad a las muestras bronquiales en contraposición al tejido pulmonar periférico es otro motivo a considerar. Examinamos, asimismo, las biopsias de tejido pulmonar periférico en un limitado subgrupo de pacientes con EPOC y sin EPOC que se sometieron a cirugía torácica (n=17) y en todas las muestras en las cuales la expresión de MICA fue positiva en las biopsias bronquiales (n=6), ésta también lo fue en el epitelio alveolar.

	Total	MICA-	MICA+	P
<b>Características generales</b>				
N	93	56	37	
Género (hombre/mujer)	75/18	40/16	35/2	0.006
Edad (años)	66±11	67±10	65±11	0.28
<b>Hábito tabáquico</b>				
Nunca fumador	21	21	0	
Exfumador	30	18	12	
Fumador activo	42	17	25	0.000
<b>EPOC y Tabaquismo<sup>A</sup></b>				
No-EPOC y nunca fumador	15	15	0	
No-EPOC y exfumador	4	4	0	
No-EPOC y fumador activo	7	2	5	0.004 <sup>B</sup>
EPOC y nunca fumador	6	6	0	
EPOC y exfumador	26	14	12	
EPOC y fumador activo	35	15	20	0.034 <sup>C</sup>
<b>Bronquitis Crónica</b>				
No	47	37	11	
Sí	46	19	26	0.000
<b>Función Pulmonar</b>				
FEV <sub>1</sub> (% pred.)	67±23	71±25	61±19	0.041
FVC (%pred.)	73±18	77±20	69±19	0.171
FEV <sub>1</sub> /FVC	65±12	66±13	64±10	0.249
TLC (%pred.)	95±19	97±20	93±19	0.351
TLco (%pred.)	78±22	86±22	68±16	0.005
<b>Enfisema macroscópico<sup>D</sup></b>				
No	66	43	23	
Sí	21	9	12	0.070
<b>Cáncer de Pulmón</b>				
No	31	25	6	
Sí	62	31	31	0.004
<b>Cultivo Broncoaspirado</b>				
Negativo	58	35	23	
Positivo	35	21	14	0.974

<sup>A</sup>  $p=0.000$ , grupo no-EPOC versus EPOC. <sup>B</sup> en relación con el hábito tabáquico en el grupo no-EPOC. <sup>C</sup> en relación con el hábito tabáquico en el grupo EPOC. <sup>D</sup> detectado por TC torácica; seis pacientes sin dicha exploración.



**Tabla 4.1.** Expresión de MICA en el epitelio bronquial humano de acuerdo con las características clínicas y demográficas.

		MICA-	MICA+	P
<b>n, (%)</b>		35 (52)	32 (48)	
<b>Edad, años</b>	m (DE)	67 (10)	66 (9)	0.802
<b>BMI, Kg/m<sup>2</sup></b>	m (DE)	27 (4)	23 (3)	0.012
<b>Hábito Tabáquico</b>				
Nunca fumador	n (%)	6 (0)	0 (0)	0.034
Exfumador	n (%)	15 (46)	20 (54)	
Fumador activo	n (%)	14 (54)	12 (46)	
<b>Tabaquismo, paq.año</b>	m (DE)	49 (35)	61 (29)	0.151
<b>Bronquitis Crónica</b>				
No	n (%)	18 (51)	8 (25)	0.027
Sí	n (%)	17 (48)	24 (75)	
<b>Severidad de la EPOC</b>				
GOLD I	n (%)	2 (33)	1 (67)	0.930
GOLD II	n (%)	21 (50)	21 (50)	
GOLD III	n (%)	9 (56)	7 (44)	
GOLD IV	n (%)	3 (50)	3 (50)	
<b>Función Pulmonar</b>				
FEV <sub>1</sub> , l	m (DE)	1.55 (0.58)	1.77 (0.57)	0.137
FEV <sub>1</sub> , % pred.	m (DE)	55 (16)	56 (15)	0.735
FVC, % pred.	m (DE)	64 (15)	65 (16)	0.769
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	m (DE)	61 (13)	63 (10)	0.916
TLC, % pred.	m (DE)	95 (21)	92 (19)	0.579
RV, % pred.	m (DE)	140 (51)	134 (44)	0.651
TLco, % pred.	m (DE)	77 (22)	66 (16)	0.067
TLco/VA, % pred.	m (DE)	86 (18)	82 (19)	0.441

**Tabla 4.2.** Expresión de MICA en el epitelio bronquial humano de acuerdo con las características clínicas, hábito tabáquico y función pulmonar en los pacientes afectados de EPOC.

## 5. Discusión

### 5.1 Introducción

El cuerpo fundamental de esta memoria de Tesis Doctoral lo constituye el conjunto de investigaciones publicadas en el *Journal of Clinical Investigation*, revista especializada con alto factor de impacto, y adjuntado en su formato original en el apartado de anexos. Para los objetivos de la discusión he querido profundizar en los aspectos de transferencia (por ejemplo, traslacionales) de estos trabajos. Con este objetivo, los hallazgos han sido resumidos en cinco conjuntos de evidencias. En primer lugar, demostramos que los ligandos del receptor NKG2D no se expresan de forma constitutiva en las células epiteliales bronquiales ni alveolares de sujetos sanos sin exposición al tabaco, ni animales (ratones) no tratados previamente. Sin embargo, la exposición al humo del tabaco se asocia con la expresión de los ligandos de NKG2D, tanto en las vías respiratorias como en el parénquima pulmonar. El segundo conjunto de evidencias demuestra que la expresión de MICA (ligando más potente del receptor NKG2D) tiene traducción funcional al precipitar citotoxicidad mediada por células sobre las células epiteliales pulmonares expuestas al humo del tabaco. El tercer conjunto de evidencias, desde el punto de vista de análisis de causalidad, permite demostrar que la expresión transgénica (por ejemplo, no tabáquica) de los ligandos del receptor NKG2D en células epiteliales pulmonares se traduce en un aumento de la apoptosis de las mismas. El cuarto conjunto de evidencias está representado por los cambios en los modelos animales, como alteraciones histológicas típicas de enfisema pulmonar, lo cual permite establecer una relación de causa y efecto entre la expresión aberrante de los ligandos de NKG2D y la EPOC. El quinto conjunto de evidencias nos permite demostrar que el bloqueo específico de la acción de MICA mediante la utilización de anticuerpos monoclonales contra su receptor NKG2D pudo prevenir la aparición de la enfermedad evaluada en términos de enfisema pulmonar

desde el punto de vista histológico. A continuación profundizaré en cada uno de estos cinco grupos de evidencias.

## 5.2 MICA, ligando de NKG2D, no se expresa por defecto en el epitelio bronquial

El primer conjunto de evidencias demuestra que el ligando MICA (y probablemente otros ligandos de NKG2D) no se expresa de forma constitutiva en el epitelio bronquial humano. En otras palabras, no se expresa “por defecto” en el tejido bronquial de los individuos esencialmente sanos y sin una exposición al humo del tabaco. Este hallazgo es coherente con el conocimiento disponible en relación a la función y regulación de los ligandos de NKG2D como moléculas de respuesta ante el “estrés celular”, y no como moléculas constitutivas en situación de homeostasis. Adicionalmente, nuestros estudios evidencian que el epitelio bronquial humano tiene la capacidad de transcribir y expresar ligandos del receptor NKG2D. Hasta el momento en el que nuestro grupo demostró estos hallazgos, la expresión de MICA u otros ligandos de NKG2D se había asociado a la presencia de neoplasias (transformación tumoral) del epitelio pulmonar. Específicamente, se había documentado en tejido tumoral de neoplasias broncogénicas malignas (93). Sin embargo, nuestros hallazgos permitieron demostrar que los ligandos se expresan también en ausencia de neoplasias, en asociación con la exposición al humo del tabaco. Esta asociación permitió especular sobre las potenciales relaciones que pueden existir entre la biopatología de las enfermedades pulmonares asociadas al consumo de tabaco, tumorales o no-tumorales, y dio origen a una secuencia de experimentos *in vitro*, estudios experimentales en animales y estudios analíticos en humanos que se encuentran descritos en la presente memoria.

## 5.3 Expresión de MICA y exposición al humo del tabaco

El segundo conjunto de evidencias demuestra que la exposición al humo del tabaco se asocia con la expresión aberrante de moléculas MICA en el epitelio bronquial, a partir de los estudios realizados en dos grupos de estudio: humanos y animales.

Estudios en humanos: Para los efectos de nuestros trabajos, el tabaquismo fue determinado mediante un cuestionario específico. El estado (no fumador, exfumador o fumador activo) fue cotejado mediante la carboxihemoglobinemia en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, no se realizaron estudios de cotinina en matrices biológicas diferentes como cabello o piezas dentarias. Esto nos limita en la cuantificación objetiva de la exposición, no sólo al humo del tabaco en fumadores activos sino también en no fumadores en términos de exposición pasiva, o inclusive para identificar la exposición a otros combustibles. A pesar de esta limitación potencial, nuestros resultados demuestran que el tabaquismo es un factor de riesgo para la expresión aberrante de MICA en el tejido pulmonar. En consecuencia, esta asociación nos permitió sugerir que el tabaco actúa como un factor de estrés celular químico que activa la expresión de ligandos de NKG2D en las vías aéreas.

Estudios experimentales *in vitro*: Para demostrar estos hallazgos, nuestros trabajos incluyeron experimentación celular *in vitro* con células epiteliales de las vías aéreas sometidas a diversas concentraciones, tanto de extracto de humo de cigarrillo como de humo de cigarrillo en atmósfera respirable. Nuestros resultados confirman que los derivados tabáquicos en estas dos formas inducen la expresión de MICA en las membranas celulares del epitelio de las vías aéreas. Desde el punto de vista funcional, y teniendo en cuenta que las biopsias analizadas provenían en todos los casos de tejido no tumoral, la asociación existente entre la exposición al humo del tabaco y la expresión de MICA debe ser considerada como un mecanismo adaptativo en

términos de señalización de cambios relevantes a nivel del ADN (por ejemplo, la *DNA damage pathway response*) en ausencia de transformación neoplásica.

## 5.4 La expresión de MICA en el epitelio bronquial y alveolar se relaciona con la presencia de la EPOC

Desde el punto de vista experimental de causalidad, nuestros estudios sugieren que la destrucción alveolar progresiva observada en ratones *Raet1a-Tg* es consecuencia de la citotoxicidad contra las células que expresan RAET1. Esta citotoxicidad se asocia con un aumento de la actividad de perforina y granzima, y su consecuente aumento de apoptosis en las células epiteliales pulmonares. Estos resultados son coherentes con estudios previos *in vitro* que han demostrado que la inducción de la expresión de los ligandos de NKG2D provoca citolisis mediada por perforina/granzima (96). Nuestros resultados son consistentes con lo descrito por otros estudios en relación con el papel de los linfocitos citotóxicos en la EPOC. En este sentido, se ha reportado un aumento de la expresión de perforina (una proteína que perfora la membrana celular y provoca la apoptosis de las células diana a través de gránulos citolíticos) en los linfocitos citotóxicos de pacientes con la EPOC (137). Además, se ha descrito que en el enfisema pulmonar está incrementada la apoptosis de células epiteliales alveolares en correlación directa con el número de linfocitos citotóxicos (138). En la misma línea, estudios recientes han demostrado que las células T citotóxicas son necesarias para el desarrollo de la sustancia tóxica que induce enfisema en los ratones (139,140). Nuestros estudios no muestran alteraciones importantes en la celularidad del lavado broncoalveolar (en algunos casos considerado representativo del intersticio pulmonar) ni en el compartimento pulmonar total de ratones *Raet1a-Tg* coincidiendo con el desarrollo de destrucción alveolar. Este hallazgo es algo inesperado. En estudios *in vitro*, la activación del receptor NKG2D se

asocia a la síntesis de varias citoquinas [IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL4, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)] (90), y quimioquinas [Proteína inflamatoria del macrófago 1- $\beta$  (MIP1 $\beta$ ) y I-309] (90), que inducen la acumulación y activación de múltiples poblaciones de leucocitos. Por lo tanto, la falta de criterios de inflamación en el lavado broncoalveolar y el tejido pulmonar en los ratones *Raet1a-Tg* sugiere que la unión del receptor NKG2D en el ratón RAET1 provoca una respuesta fundamentalmente diferente a la observada *in vitro* (es decir, la elaboración de citoquinas inflamatorias), o que estos mediadores se producen en cantidades insuficientes para inducir una inflamación evidente en este modelo *in vivo*. La implicación de estos hallazgos es que la función efectora de la expresión de RAET1 y la activación del receptor es precedente tanto de la inflamación como del exceso de la actividad proteolítica que se observa en la progresión natural del enfisema pulmonar. Es importante destacar que esta no es necesariamente representativa de los efectos de ligandos de NKG2D expresados de forma endógena ante la exposición de las vías aéreas a una sustancia tóxica (instilada o inhalada). En el caso de la inducción endógena ante la exposición al humo del tabaco, la inflamación y el aumento de la degradación de la matriz pueden incrementar el estrés impuesto sobre el epitelio, que conducen a la inducción de la expresión de RAET1.

Nuestros resultados no intentan definir un mecanismo inmunológico único de respuesta ante el humo del tabaco, y mucho menos considerar al sistema MICA-NKG2D como el único involucrado en el desarrollo de la EPOC. Es evidente que los mecanismos celulares y moleculares de una enfermedad compleja como la EPOC son difíciles de diseccionar. Es por ello que los modelos experimentales (*in vitro* y en modelos animales) como los de nuestro estudio tienen un interés práctico al permitir reducir la complejidad biopatogénica y, en este caso, trazar el papel crítico de los linfocitos citotóxicos en la presencia y, probablemente, la gravedad de la EPOC.

## 5.5 Consideraciones respecto a la ausencia de MICA en algunos fumadores y algunos pacientes con EPOC: ¿se puede explicar?

Los paradigmas aceptados en la actualidad respecto de la patogénesis de las enfermedades complejas como la EPOC incorporan factores múltiples e incluyen la posibilidad de interacciones entre ellos. Sin embargo, se debe resaltar un aspecto intrigante de nuestros resultados de aparente falta de expresión de MICA en algunos fumadores y en algunos pacientes con EPOC. Es posible que esta ausencia de detección de MICA en un subgrupo de pacientes esté explicado por uno o varios factores, incluyendo **(1)** que sea realmente una ausencia de MICA en algunos pacientes atribuible a la variabilidad interindividual en la respuesta a las exposiciones que son inherentes a cualquier proceso biológico; **(2)** que exista una heterogeneidad anatómica (variación focal) de la expresión de MICA. Es decir, una biopsia negativa obtenida de una localización anatómica no excluye la potencial expresión de MICA en el resto de las vías respiratorias; **(3)** que la expresión de MICA se halle en niveles por debajo de los límites de detección de nuestras técnicas; **(4)** que exista una participación de otros ligandos de NKG2D, tales como MICB o las proteínas ULBP; **(5)** que exista expresión de alelos MICA que no fueran detectados por los anticuerpos monoclonales anti-MICA utilizados, o de otros que, se sabe, no se expresan en la membrana celular; **(6)** que haya una potencial modulación terapéutica de MICA. De hecho, no podemos excluir que la expresión bronquial de MICA muestre cambios en respuesta a un tratamiento con fármacos inhalados que la mayoría de los pacientes con EPOC reciben (esteroides inhalados y beta-adrenérgicos inhalados); **(7)** si esto es plausible, la variabilidad del cumplimiento del tratamiento puede representar una variable que modifique la infraexpresión de MICA en algunos de los pacientes con EPOC. Aunque diametralmente opuesto, un punto interesante está en relación con los

fumadores que, sin cumplir con los criterios de diagnóstico de EPOC, muestran expresión de MICA en el epitelio bronquial. No se puede asegurar que estos fumadores se encuentren "absolutamente libres" de la enfermedad. De acuerdo con las definiciones actuales, el diagnóstico de obstrucción al flujo aéreo y la EPOC se basan en las pruebas de función pulmonar, principalmente espirometría forzada y la capacidad de transferencia del CO. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la tomografía computarizada de alta resolución pulmonar es más sensible y específica que las pruebas funcionales de uso común para la evaluación de las fases iniciales de enfisema en fumadores asintomáticos a pesar de la normalidad en la espirometría, la difusión del CO (TLco) u otras variables (141,142). Y, (8) la última consideración es la posibilidad de que los pacientes MICA- hayan estado en una etapa "off" de expresión. En otras palabras, es posible que la expresión del ligando MICA sea intermitente o transitoria en el microambiente pulmonar. Estudios experimentales así lo confirman, tanto ante la infección pulmonar bacteriana (143) como la exposición a irritantes pulmonares (por ejemplo, el ozono o la acroleína). Al igual que en estudios *in vitro* con células epiteliales humanas pulmonares (144), las exposiciones agudas al plomo inducen una expresión máxima del ligando de NKG2D a las 24-48 horas que retorna rápidamente a su nivel basal. Estos estudios no lograron demostrar que la expresión aguda de ligandos de NKG2D diese lugar a cambios irreversibles en la arquitectura pulmonar. Sin embargo, el presente estudio demuestra que la expresión inducible sostenida de ligandos de NKG2D en los ratones se produce tras la exposición crónica al humo del tabaco, y que la expresión pulmonar sostenida de los ligandos de NKG2D en los ratones es suficiente para causar enfisema pulmonar (es decir, en ratones *Raet1a-Tg*). Esta regulación positiva de ligandos de NKG2D en pacientes con la EPOC no muestra asociación con la infección ni con el índice acumulado de tabaquismo. Estos datos también demuestran la importancia de determinar si el bloqueo de la vía NKG2D es efectivo para atenuar el desarrollo de enfisema experimental inducido por el humo del tabaco.



## 5.6 La expresión de los ligandos de NKG2D tiene una relación causa-efecto con la EPOC

El sistema inmune puede ser activado por las señales de las células expuestas a los patógenos, estímulos ambientales o daños mecánicos. La función de la llamada “inmunovigilancia” es contribuir a la reparación de los tejidos dañados y facilitar la restauración de las células sanas (145,146). La activación de los linfocitos citotóxicos presentes en el pulmón ante la aparición de células tumorales o agentes patógenos es altamente beneficiosa para el huésped. La respuesta citotóxica iniciada por los linfocitos contra las células con estrés químico (por ejemplo, el humo del tabaco) puede ser perjudicial para el huésped si se precipita un desequilibrio entre el daño y la reparación en el tejido pulmonar. Precisamente este desequilibrio es una característica de la EPOC. Aunque el presente estudio no ha identificado las sustancias que inducen la expresión de ligandos de NKG2D, se supone que es probable una combinación de efectos directos de las sustancias tóxicas presentes en el humo del tabaco y los efectos indirectos de los productos del daño tisular. Esto es coherente con estudios previos que demuestran que las células epiteliales bronquiales humanas expresan varios de los ligandos del receptor NKG2D cuando se exponen a estrés oxidativo en cultivos *in vitro* (144). Además, la inducción de los ligandos de NKG2D se ha relacionado con la respuesta a la estimulación de los receptores Toll-like (147) y el daño en el ADN (148). En este contexto, la activación de NKG2D representa un mecanismo general de las células inmunes pulmonares ante situaciones de estrés.

Los estudios incluidos en esta memoria de Tesis Doctoral proporcionan la primera evidencia que el sistema NKG2D-MICA está relacionado con la EPOC y especialmente con las características morfológicas y/o criterios de valoración fisiológica del fenotipo enfisematoso. Los modelos animales en los que hemos demostrado el desarrollo de enfisema confirman que la expresión de RAET1 es suficiente para que se produzca la destrucción del espacio aéreo alveolar. En los

estudios en humanos hemos demostrado que la presencia de la EPOC se relaciona de forma significativa con la expresión, aberrante y persistente, del ligando MICA en el epitelio bronquial. Y en el mismo sentido, la expresión de MICA fue confirmada en tejido pulmonar periférico (por ejemplo, en el epitelio alveolar) en un subgrupo de pacientes afectados de EPOC sometidos también a toracotomía.

Algunos autores han planteado la hipótesis que la EPOC tenga un componente de enfermedad autoinmune, bajo evidencias fundamentalmente circunstanciales (149). La activación aberrante del sistema inmune podría explicar que los fenómenos inflamatorios pulmonares sean persistentes y que la función pulmonar continúe deteriorándose inclusive tras dejar de fumar (149,150). En este sentido, en algunos estudios de pacientes con enfisema sometidos a cirugía torácica se ha demostrado la presencia de grandes cantidades de células T CD4+, lo cual representaría su activación exagerada o persistente en el tejido pulmonar (151). Estos resultados, sin embargo, podrían reflejar la respuesta a una infección activa o estar relacionados con la presencia del tumor. En la misma línea, más recientemente, se ha demostrado que existe una expansión clonal, en su mayor parte a expensas de linfocitos T CD8+, en un modelo de ratón con enfisema, sin infecciones ni tumores (152), lo cual va a favor de la probable activación autoinmunitaria ante epítopes no definidos con claridad hasta la fecha. Adicionalmente, la evidencia directa de autoinmunidad es proporcionada por algunas investigaciones que demuestran que los anticuerpos circulantes contra fragmentos de elastina se correlacionan con la gravedad del enfisema (153), y que los autoanticuerpos dirigidos contra células epiteliales pulmonares están presentes en pacientes con EPOC (154). Nuestros resultados no son asociaciones circunstanciales sino directas y aportan evidencia de que la alteración persistente de la inmunidad innata (en este caso como sistema MICA-NKG2D) en las células epiteliales pulmonares puede representar uno de los mecanismos de autoinmunidad en la EPOC.

## **5.7 Comentarios respecto del factor iniciador del trastorno del sistema MICA en la EPOC**

Un punto que merece ser mencionado es el relacionado con el factor iniciador (gatillo) de la aberrancia de control en el sistema MICA que hemos identificado en pacientes con EPOC. Demostramos que MICA no se expresa de forma constitutiva en el tejido pulmonar (bronquial ni alveolar) de individuos sanos. Esto se deduce del examen de las muestras del número limitado de pacientes no fumadores que pudimos incluir en el estudio. La expresión de MICA se asoció con el tabaquismo activo pero no se detectó en ninguna muestra bronquial obtenida de un número limitado de pacientes no fumadores con EPOC ni en exfumadores sin EPOC. Todo lo anterior demuestra que existe una asociación entre toxicidad por tabaquismo y alteraciones en la expresión de MICA en el epitelio pulmonar. Sin embargo, no podemos excluir que el sistema MICA-NKG2D y los linfocitos involucrados en el mismo pierdan su control y se activen de forma aberrante como consecuencia de la interacción del humo del tabaco con patógenos previos, otros tóxicos inhalados, u otras reacciones autoinmunes subyacentes.

## **5.8 Comentarios respecto de la ausencia de exclusividad de la alteración de MICA y la EPOC**

No existe un mecanismo inmunológico exclusivo que, ontogenética ni filogenéticamente, se relacione con la respuesta inflamatoria del pulmón humano ante el humo del tabaco. De hecho, el receptor NKG2D está preservado desde las especies inferiores hasta la humana, lo cual resalta su importancia en la escala evolutiva. En consecuencia, desconocemos si la activación de la vía de NKG2D contribuye a otras enfermedades pulmonares, o si otros factores de riesgo de

bronquitis crónica y enfisema pulmonar (por ejemplo, la exposición pasiva al humo del tabaco, otros contaminantes inhalados, infecciones virales) también están asociados a cambios aberrantes en la expresión de MICA en el pulmón. Otro punto se refiere a la exclusividad del sistema en lo que respecta a la patología del pulmón como órgano diana expuesto. Las consecuencias de la expresión del ligando de NKG2D probablemente dependan de la expresión temporal y espacial (por ejemplo, las vías aéreas frente a los alvéolos), y del contexto del microambiente inmunológico pulmonar.

## **5.9 El sistema MICA-NKG2D puede representar una nueva diana terapéutica en la EPOC**

El quinto conjunto de evidencias de nuestro estudio demuestra que la manipulación del sistema MICA/NKG2D/DAP10 puede tener implicaciones terapéuticas (preventivas o de tratamiento) en pacientes con la EPOC. Específicamente, el bloqueo de la unión de MICA con su receptor utilizando anticuerpos monoclonales inhibidores específicos, consiguió abortar la aparición de enfisema pulmonar en el modelo animal. Estas evidencias permiten especular respecto a los efectos biológicos directos o indirectos que el bloqueo del sistema puede tener en humanos.

Nuestros hallazgos son coherentes con evidencias circunstanciales previas al sugerir esta posible función de los linfocitos en el desarrollo de ciertas patologías respiratorias. Se ha demostrado, por ejemplo, una relación entre el número de linfocitos en el tejido pulmonar y un conjunto de características clínicas o fenotípicas en la EPOC (155,133). El mecanismo por el cual los linfocitos se activan y contribuyen al desarrollo de estas patologías no está completamente definido. Nuestros estudios, en conjunto, demuestran que los linfocitos citotóxicos (por ejemplo, NKG2D+) desempeñan un papel

etiopatogénico en la EPOC. Específicamente, aportamos novedosas pruebas experimentales y asociativas entre la activación de los linfocitos T, la expresión de ligandos de NKG2D y la EPOC. Además, demostramos que la expresión pulmonar de los ligandos de NKG2D es suficiente para el desarrollo de enfisema en un modelo murino. En base a los hallazgos experimentales, postulamos que la expresión sostenida de ligandos de NKG2D conduce a la desestructuración de la arquitectura alveolar por la acción de las células citotóxicas y la apoptosis mediada por los linfocitos contra las células epiteliales pulmonares. Teniendo en cuenta que las células NKG2D<sup>+</sup> son abundantes en el pulmón y que la proporción de estos linfocitos NKG2D<sup>+</sup> no está alterada sustancialmente en el modelo experimental de enfisema ni en los pacientes afectados de EPOC, se concluye que los mecanismos de control de esta vía son principalmente dependientes de la expresión sostenida de ligandos de NKG2D en las células epiteliales pulmonares e independientes de la regulación de los receptores NKG2D.

Los mecanismos de regulación de las funciones efectoras que se precipitan cuando MICA se une a su receptor NKG2D han sido bien caracterizados (75). La función del receptor NKG2D depende de las moléculas DAP10 en humanos, mientras que en ratones es DAP12. Estas moléculas reclutan componentes de las Src-quinasas e inician múltiples vías de señalización que culminan en la polarización de gránulos, la liberación de citoquinas y la consiguiente citotoxicidad. Además del ligando, la expresión y función de NKG2D puede ser influenciada por otros factores en el microambiente inmunológico incluyendo IL-15 (156), IL-21 (157) y TGFβ1 (158).

Las diferencias en el sistema del receptor NKG2D-ligando entre el ratón y los humanos deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados del presente estudio. En los humanos, NKG2D se detecta en la mayoría de las células T CD8<sup>+</sup> y células NK. Por el contrario, en ratones el receptor NKG2D se expresa principalmente en las células NK, y no en linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por lo tanto, nuestros datos demuestran que el agotamiento de las células NK, pero no de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, explicaría una destrucción alveolar mediada por RAET1 en el modelo de ratón transgénico pero no

representa una respuesta congruente en el caso de la enfermedad en humanos. Es más probable que la respuesta a los ligandos de NKG2D en los seres humanos también esté mediada por las funciones efectoras de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> e incluyan posibles factores de confusión como la activación concurrente del receptor por otros ligandos y el impacto de las exacerbaciones de la enfermedad asociada a patógenos (159).

En nuestro estudio, el número de linfocitos efectoras que expresan el receptor NKG2D no se vio afectado por el aumento de la expresión del ligando. Los linfocitos citotóxicos (incluidos los linfocitos NKG2D<sup>+</sup>) están presentes constitutivamente y en cantidades significativas en el parénquima pulmonar. Sin embargo, podemos asumir razonablemente que la expresión de MICA es el principal determinante de las asociaciones con la EPOC, y no las diferencias en la expresión de NKG2D. Esta conclusión se ve corroborada por las observaciones de que los no fumadores no muestran expresión constitutiva de MICA, pero expresan la misma proporción de linfocitos citotóxicos NKG2D<sup>+</sup>, en comparación con los pacientes con EPOC. Además, la expresión exógena de RAET1 en células epiteliales pulmonares indujo de forma causal un fenotipo enfisematoso característico, sin alterar el número de linfocitos citotóxicos en el parénquima pulmonar. Además, esta conclusión se ve reforzada por la falta de modulación del receptor NKG2D<sup>+</sup> en las células pulmonares de los ratones expuestos al humo del tabaco y los ratones transgénicos *Raet1a*, y la ausencia de inflamación pulmonar o activación de los macrófagos (como lo demuestra la activación de MMP) en ratones que expresan RAET1 exógenos.

## **5.10 Especificaciones respecto al papel del doctorando en las investigaciones incluidas en la memoria de la Tesis Doctoral**

El tesinando se ha encargado del reclutamiento de todos los pacientes sometidos a fibrobroncoscopia y ha sido el responsable de su realización y de la obtención de las biopsias bronquiales que se han utilizado en el estudio. Asimismo, ha entrevistado a los pacientes y ha supervisado la realización de las pruebas funcionales respiratorias. También ha sido uno de los observadores en la determinación de MIC-A en todas las muestras de biopsias bronquiales.

En cuanto a las técnicas de laboratorio efectuadas en la Universidad de Cincinatti, el tesinando no ha estado presente en su realización pero sí el Dr. Mauricio Orozco-Levi, Director de esta Tesis Doctoral, quien me ha instruido en ellas y ha conseguido que las comprendiera para la correcta interpretación de los resultados obtenidos.

## 6. Conclusiones

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. Existe una activación del receptor NKG2D de los linfocitos citotóxicos ante la exposición al humo del tabaco en un modelo animal.
2. La expresión del ligando de NKG2D provoca enfisema en ratones transgénicos.
3. La expresión de ligandos de NKG2D aberrante en el epitelio pulmonar de modelos animales y en pacientes con EPOC coincide con haber desarrollado enfisema pulmonar.
4. El anticuerpo anti-NKG2D es capaz de inhibir el desarrollo de enfisema en un modelo animal.



## 7. Bibliografía

- (1) Pauwels RA. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 46:798-825.
- (2) Celli BR, MacNee W and Committee Members. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23:932-946.
- (3) Peces-Barba G, Barberà JA, Agustí A, Casanova C, Casas A, Izquierdo JL, Jardim J, López Varela V, Monsó E, Montemayor T and Viejo JL. Guía clínica SEPAR-ALAT de diagnóstico y tratamiento de la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2008; 44:271-281.
- (4) Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la EPOC. SEPAR-ALAT 2009. <http://www.separ.es>
- (5) Tirimanna PR, van Schayck CP, den Otter JJ et al. Prevalence of asthma and COPD in general practice in 1992: has it changed since 1977? *Br J Gen Pract* 1996; 46(406):277-281.
- (6) Mathers CD. The global burden of disease: 2004 update. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2008.
- (7) Sobradillo-Peña V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, et al. Estudio Epidemiológico de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica en España (IBERPOC): prevalencia de síntomas respiratorios crónicos y limitación del flujo aéreo. *Arch Bronconeumol* 1999; 35:159-66.
- (8) Miravittles M, Sobradillo V, Villasante C, Gabriel R, Masa JF, Jiménez CA, et al. Estudio Epidemiológico de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica en España (IBERPOC): reclutamiento y trabajo de campo. *Arch Bronconeumol* 1999; 35:152-8.
- (9) Chapman KR. Chronic obstructive pulmonary disease: are women more susceptible than men? *Clin Chest Med* 2004; 25(2):331-341.
- (10) Schellevis FG, Van de Lisdonk EH, Van d, V et al. Consultation rates and incidence of intercurrent morbidity among patients with chronic disease in general practice. *Br J Gen Pract* 1994; 44(383):259-262.

- (11) Lopez AD, Shibuya K, Rao C et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006; 27(2):397-412.
- (12) Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9064):1498-1504.
- (13) Mathers CD, Roncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine*. 2006; 3:2011-2030.
- (14) Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB et al. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27(1):188-207.
- (15) Miravittles M, Murio C, Guerrero T, Gisbert R on behalf of the DAFNE study group. Costs of chronic bronchitis and COPD. A one year follow-up study. *Chest*. 2003; 123:784-791.
- (16) Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ et al. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med* 2005; 118(12):1364-1372.
- (17) Behrendt CE. Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles. *Chest* 2005; 128(3):1239-1244.
- (18) Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005; 365(9478):2225-2236.
- (19) Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E et al. Estimated numbers and prevalence of PI\*S and PI\*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J* 2006; 27(1):77-84.
- (20) Silverman EK, Palmer LJ, Mosley JD et al. Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70(5):1229-1239.
- (21) Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350(9078):630-633.
- (22) Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977; 1(6077):1645-1648.

- (23) Eisner MD, Balmes J, Katz PP et al. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health* 2005; 4(1):7.
- (24) Leuenberger P, Schwartz J, Ackermann-Liebrich U et al. Passive smoking exposure in adults and chronic respiratory symptoms (SAPALDIA Study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults, SAPALDIA Team. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1222-1228.
- (25) Dayal HH, Khuder S, Sharrar R et al. Passive smoking in obstructive respiratory disease in an industrialized urban population. *Environ Res* 1994; 65(2):161-171.
- (26) Tager IB, Ngo L, Hanrahan JP. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(3):977-983.
- (27) Balmes J, Becklake M, Blanc P et al. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(5):787-797.
- (28) Ezzati M. Indoor air pollution and health in developing countries. *Lancet* 2005; 366(9480):104-106.
- (29) Boman C, Forsberg B, Sandstrom T. Shedding new light on wood smoke: a risk factor for respiratory health. *Eur Respir J* 2006; 27(3):446-447.
- (30) Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J et al. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27(3):542-546.
- (31) Sezer H, Akkurt I, Guler N et al. A case-control study on the effect of exposure to different substances on the development of COPD. *Ann Epidemiol* 2006; 16(1):59-62.
- (32) Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ et al. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *MMWR Surveill Summ* 2002; 51(6):1-16.
- (33) Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. *JAMA* 1994; 272(19):1497-1505.

- (34) Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM et al. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(6):2152-2158.
- (35) Shaheen SO, Barker DJ, Shiell AW et al. The relationship between pneumonia in early childhood and impaired lung function in late adult life. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:616-619.
- (36) Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 1999; 13(5):1109-1114.
- (37) US Centers for Disease Control and Prevention. Criteria for a recommended standard: occupational exposure to respirable coal mine dust: National Institute of Occupational Safety and Health; 1995.
- (38) Saetta M, Finkelstein R, Cosio MG. Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers. *Eur Respir J* 1994; 7(8):1505-1515.
- (39) Turato G, Di Stefano A, Maestrelli P et al. Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(4 Pt 1):1262-1267.
- (40) Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001; 344(9):655-664.
- (41) Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343(4):269-280.
- (42) Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T et al. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. *Thorax* 1993; 48(11):1130-1134.
- (43) Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345(5):340-350.
- (44) Suzuki N, Wakisaka S, Takeba Y et al. Effects of cigarette smoking on Fas/Fas ligand expression of human lymphocytes. *Cell Immunol* 1999; 192(1):48-53.
- (45) Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000; 16(3):534-554.

- (46) Finkelstein EI, Nardini M, Van d, V. Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(3):L732-L739.
- (47) Casolaro MA, Bernaudin JF, Saltini C et al. Accumulation of Langerhans' cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137(2):406-411.
- (48) Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13(2):343-348.
- (49) Diaz PT, King ER, Wewers MD et al. HIV infection increases susceptibility to smoking-induced emphysema. *Chest* 2000; 117(5 Suppl 1):285S.
- (50) Li XY, Gilmour PS, Donaldson K et al. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax* 1996; 51(12):1216-1222.
- (51) Jan Klein and Akie Sato. The HLA system. *N Engl J Med* 2000; 343:702-709.
- (52) Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(14):6259-6263.
- (53) Hughes AL, Yeager M, Ten Elshof AE et al. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol Today* 1999; 20(1):22-26.
- (54) Perez-Rodriguez M, Raimondi E, Marsh SG et al. Identification of a new MICA allele, MICA\*047. *Tissue Antigens* 2002; 59(3):216-218.
- (55) Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 2001; 22(7):378-385.
- (56) Steinle A, Li P, Morris DL et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001; 53(4):279-287.
- (57) Bauer S, Groh V, Wu J et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285(5428):727-729.

- (58) Groh V, Bahram S, Bauer S et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(22):12445-12450.
- (59) Bahram S, Inoko H, Shiina T et al. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(5):505-509.
- (60) Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signalling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004; 21:357-366.
- (61) Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004; 21:367-77.
- (62) Collins RW, Stephens HA, Clare MA and Vaughan RW. High resolution molecular phototyping of MICA and MICB alleles using sequence specific primers. *Hum Immunol* 2002; 63:783-794.
- (63) Fodil N, Pellet P, Laloux L et al. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 1999; 49:557-560.
- (64) Groh V, Wu J, Yee C et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419(6908):734-738.
- (65) Moretta A, Bottino C, Vitale M et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:197-223.
- (66) Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391(6669):795-799.
- (67) O'Callaghan CA. Molecular basis of human natural killer cell recognition of HLA-E (human leucocyte antigen-E) and its relevance to clearance of pathogen-infected and tumour cells. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99(1):9-17.
- (68) O'Callaghan CA. Natural killer cell surveillance of intracellular antigen processing pathways mediated by recognition of HLA-E and Qa-1b by CD94/NKG2 receptors. *Microbes Infect* 2000; 2(4):371-380.

- (69) Karre K, Ljunggren HG, Piontek G et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319(6055):675-678.
- (70) Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11(7):237-244.
- (71) Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20):11521-11526.
- (72) Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM et al. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001; 413(6852):165-171.
- (73) Malarkannan S. The balancing act: inhibitory Ly49 regulate NKG2D-mediated NK cell functions. *Semin Immunol* 2006; 18(3):186-192.
- (74) Coudert JD, Held W. The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(5):333-343.
- (75) Upshaw JL, Leibson PJ. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin Immunol* 2006; 18(3):167-175.
- (76) Wu J, Song Y, Bakker AB et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285(5428):730-732.
- (77) Meresse B, Chen Z, Ciszewski C et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004; 21(3):357-366.
- (78) Verneris MR, Karami M, Baker J et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood* 2004; 103(8):3065-3072.
- (79) Maccalli C, Pende D, Castelli C et al. NKG2D engagement of colorectal cancer-specific T cells strengthens TCR-mediated antigen stimulation and elicits TCR independent anti-tumor activity. *Eur J Immunol* 2003; 33(7):2033-2043.
- (80) Nitahara A, Shimura H, Ito A et al. NKG2D ligation without T cell receptor engagement triggers both cytotoxicity and cytokine production in dendritic epidermal T cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126(5):1052-1058.

- (81) Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(14):6259-6263.
- (82) Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ et al. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 2002; 79(1):114-123.
- (83) Bacon L, Eagle RA, Meyer M et al. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol* 2004; 173(2):1078-1084.
- (84) McFarland BJ, Strong RK. Thermodynamic analysis of degenerate recognition by the NKG2D immunoreceptor: not induced fit but rigid adaptation. *Immunity* 2003; 19(6):803-812.
- (85) Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH et al. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 2002; 169(8):4079-4083.
- (86) O'Callaghan CA, Cerwenka A, Willcox BE et al. Molecular competition for NKG2D: H60 and RAE1 compete unequally for NKG2D with dominance of H60. *Immunity* 2001; 15(2):201-211.
- (87) Li P, Morris DL, Willcox BE et al. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2001; 2(5):443-451.
- (88) Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Kinder J et al. Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior. *Eur J Immunol* 2002; 32(3):597-605.
- (89) Caillat-Zucman S. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol* 2006; 67(3):204-207.
- (90) Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; 14(2):123-133.
- (91) Pende D, Rivera P, Marcenaro S et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 2002; 62(21):6178-6186.



- (92) Poggi A, Venturino C, Catellani S et al. Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res* 2004; 64(24):9172-9179.
- (93) Groh V, Rhinehart R, Secrist H et al. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12):6879-6884.
- (94) Wu J, Groh V, Spies T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol* 2002; 169(3):1236-1240.
- (95) Bauer S, Groh V, Wu J et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285(5428):727-729.
- (96) Hayakawa Y, Kelly JM, Westwood JA et al. Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J Immunol* 2002; 169(10):5377-5381.
- (97) Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC et al. Letal, A tumor-associated NKG2D immunoreceptor ligand, induces activation and expansion of effector immune cells. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(4):446-451.
- (98) Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD et al. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000; 1(2):119-126.
- (99) Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000; 12(6):721-727.
- (100) Pende D, Cantoni C, Rivera P et al. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 2001; 31(4):1076-1086.
- (101) Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL et al. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 2005; 6(9):928-937.
- (102) Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U et al. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 2005; 175(2):720-729.

- (103) Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E et al. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood* 2005; 106(5):1711-1717.
- (104) Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; 169(8):4098-4102.
- (105) Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol* 2006; 67(3):188-195.
- (106) Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66(5):2520-2526.
- (107) Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ et al. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 2003; 33(1):194-203.
- (108) Dunn C, Chalupny NJ, Sutherland CL et al. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2003; 197(11):1427-1439.
- (109) Wu JD, Higgins LM, Steinle A et al. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 2004; 114(4):560-568.
- (110) Rolle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M et al. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol* 2003; 171(2):902-908.
- (111) Nomura M, Zou Z, Joh T et al. Genomic structures and characterization of Rae1 family members encoding GPI-anchored cell surface proteins and expressed predominantly in embryonic mouse brain. *J Biochem* 1996; 120(5):987-995.
- (112) Groh V, Bahram S, Bauer S et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(22):12445-12450.
- (113) Zou Z, Nomura M, Takihara Y et al. Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: a novel cDNA family encodes cell

surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules. *J Biochem* 1996; 119(2):319-328.

(114) Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A et al. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* 2005; 105(9):3615-3622.

(115) Poggi A, Prevosto C, Massaro AM et al. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. *J Immunol* 2005; 175(10):6352-6360.

(116) Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S et al. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006; 107(4):1484-1490.

(117) Ogasawara K, Benjamin J, Takaki R et al. Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol* 2005; 6(9):938-945.

(118) Li J, Rabinovich BA, Hurren R et al. Survival versus neglect: redefining thymocyte subsets based on expression of NKG2D ligand(s) and MHC class I. *Eur J Immunol* 2005; 35(2):439-448.

(119) Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA et al. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305(1):129-135.

(120) Rabinovich BA, Li J, Shannon J et al. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol* 2003; 170(7):3572-3576.

(121) Jinushi M, Takehara T, Kanto T et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; 170(3):1249-1256.

(122) Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA et al. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 2007; 109(9):3776-3785.

(123) Vankayalapati R, Garg A, Porgador A et al. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 2005; 175(7):4611-4617.

- (124) Tieng V, Le Bouguenec C, du ML et al. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(5):2977-2982.
- (125) Das H, Groh V, Kuijl C et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001; 15(1):83-93.
- (126) Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J et al. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2(3):255-260.
- (127) Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A et al. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 2001; 1526(1):10-12.
- (128) Gasser S, Orsulic S, Brown EJ et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436(7054):1186-1190.
- (129) Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 1999; 13(2):152-157.
- (130) Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(1):71-77.
- (131) Groh V, Steinle A, Bauer S et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells. *Science* 1998; 279(5357):1737-1740.
- (132) Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 2003; 3(5):421-429.
- (133) Saetta M., et al. CD8+ T cells in the lungs of smokers with COPD. *Am J Resir Crit Care Med* 1999; 160:711-717.
- (134) Roca J., et al. Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1998; 11:1354-1362.
- (135) Pellegrino R., et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26:948-968.

- (136) Morris JF, Koski A and Johnson LC. Spirometric standards for healthy nonsmoking adults. *Am Rev Respir Dis* 1971; 103:57-67.
- (137) Chrysafakis G., et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125:71-76.
- (138) Majo J, Ghezzi H, and Cosío MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17:946-953.
- (139) Borchers MT., et al. CD8+ T cells contribute to macrophage accumulation and airspace enlargement following repeated irritant exposure. *Exp Mol Pathol* 2007; 83: 301-310.
- (140) Maeno T., et al. CD8+ T cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol* 2007; 178:8090-8096.
- (141) Omori H, Fujimoto K, and Katoh T. Computed-tomography findings of emphysema: correlation with spirometric values. *Curr Opin Pulm Med*. 2008; 14:110-114.
- (142) Marsh S., et al. Utility of lung density measurements in the diagnosis of emphysema. *Respir Med* 2007; 101:1512-1520.
- (143) Borchers MT., et al. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2006; 74:2578-2586.
- (144) Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M and Cosman D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291:1222-1231.
- (145) Gleimer M and Parham P. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity* 2003; 19:469-477.
- (146) Janeway CA, Jones B and Hayday A. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol Today* 1988; 9:73-76.
- (147) Hamerman JA, Ogasawara K and Lanier LL. Cutting edge: toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 2004; 172:2001-2005.
- (148) Gasser S, Orsulic S, Brown EJ and Raulet DH. The DNA damage pathway regulate innate immune system ligands for the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436:1186-1190.

- (149) Agustí A, MacNee W, Donaldson K, and Cosío M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58:832-834.
- (150) Barnes PJ and Cosío MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PloS Med* 2004; 1:e20.
- (151) Sullivan AK., et al. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:590-596.
- (152) Motz GT., et al. Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *J Immunol* 2008; 181:8036-8043.
- (153) Lee SH., et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13:567-569.
- (154) Feghali-Bostwick CA., et al. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:156-163.
- (155) O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC and Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852-857.
- (156) Dann SM., et al. Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan cryptosporidium. *J Infect Dis* 2005; 192:1294-1302.
- (157) Takaki R., et al. IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism. *J Immunol* 2005; 175:2167-2173.
- (158) Song H., et al. IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol* 2006; 242:39-45.
- (159) Markiewicz MA., et al. Costimulation through NKG2D enhances murine CD8+ CTL function: similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation. *J Immunol* 2005; 175:2825-2833.

## Research article



## Sustained CTL activation by murine pulmonary epithelial cells promotes the development of COPD-like disease

Michael T. Borshers,<sup>1,2</sup> Scott C. Weaselkamper,<sup>1</sup> Victor Gurull,<sup>3,4,5</sup> Alba Ramirez-Sarmiento,<sup>3,4</sup> Albert Sánchez-Font,<sup>3,4</sup> Judith Garcia-Aymerich,<sup>6</sup> Carlos Coronell,<sup>7</sup> Josep Lloreta,<sup>7,8</sup> Alvar G. Agustí,<sup>9,10</sup> Joaquim Gea,<sup>4,7,9</sup> John A. Howington,<sup>11</sup> Michael F. Reed,<sup>11</sup> Sandra L. Stames,<sup>11</sup> Nathaniel L. Harris,<sup>1</sup> Mark Vitucci,<sup>1</sup> Bryan L. Eppert,<sup>1</sup> Gregory T. Molz,<sup>1</sup> Kevin Fogel,<sup>2</sup> Dennis W. McGraw,<sup>2</sup> Jay W. Tichelaar,<sup>12</sup> and Mauricio Orozco-Levi<sup>3,4,7,9</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Health, Division of Environmental Genetics and Molecular Toxicology, and <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, USA. <sup>3</sup>Group of Research on Injury, Immune Response, and Lung Function, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Servei de Pneumologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>6</sup>Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), IMIM, Barcelona, Spain. <sup>7</sup>CEXS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain. <sup>8</sup>Servei d'Anatomia Patològica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain. <sup>9</sup>CREP de Enfermedades Respiratorias Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain. <sup>10</sup>Hospital Universitario Son Dureta y Fundación Cooper-Cimora, Illes Balears, Majorca, Spain. <sup>11</sup>Department of Surgery, Division of Thoracic Surgery, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, USA. <sup>12</sup>Department of Surgery, Washington University, St. Louis, Missouri, USA.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a lethal progressive lung disease culminating in permanent airway obstruction and alveolar enlargement. Previous studies suggest CTL involvement in COPD progression; however, their precise role remains unknown. Here, we investigated whether the CTL activation receptor NK cell group 2D (NKG2D) contributes to the development of COPD. Using primary murine lung epithelium isolated from mice chronically exposed to cigarette smoke and cultured epithelial cells exposed to cigarette smoke extract *in vitro*, we demonstrated induced expression of the NKG2D ligand retinoic acid early transcript 1 (RAE1) as well as NKG2D-mediated cytotoxicity. Furthermore, a genetic model of inducible RAE1 expression on mouse pulmonary epithelial cells yielded a severe emphysematous phenotype characterized by epithelial apoptosis and increased CTL activation, which was reversed by blocking NKG2D activation. We also assessed whether NKG2D ligand expression corresponded with pulmonary disease in human patients by staining airway and peripheral lung tissues from never smokers, smokers with normal lung function, and current and former smokers with COPD. NKG2D ligand expression was independent of NKG2D receptor expression in COPD patients, demonstrating that ligand expression is the limiting factor in CTL activation. These results demonstrate that aberrant, persistent NKG2D ligand expression in the pulmonary epithelium contributes to the development of COPD pathologies.

### Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a progressive disease of the lung characterized by inflammation, largely irreversible airflow obstruction, and permanent alveolar enlargement (1). COPD afflicts more than 12 million adults and is the fourth leading cause of death in the United States. Further increases in prevalence of and mortality caused by COPD are predicted in the coming decades (1, 2). Currently, questions remain about the pathophysiological mechanisms controlling COPD, and, despite numerous clinical trials, therapy is limited mainly to supportive measures.

A prominent mechanism of airflow obstruction in COPD is emphysema. Emphysema is characterized by the permanent enlargement of airspaces accompanied by the loss of elastic recoil of the lung. The pathogenesis of the destruction of the alveolar unit in emphysema is complex and incompletely understood,

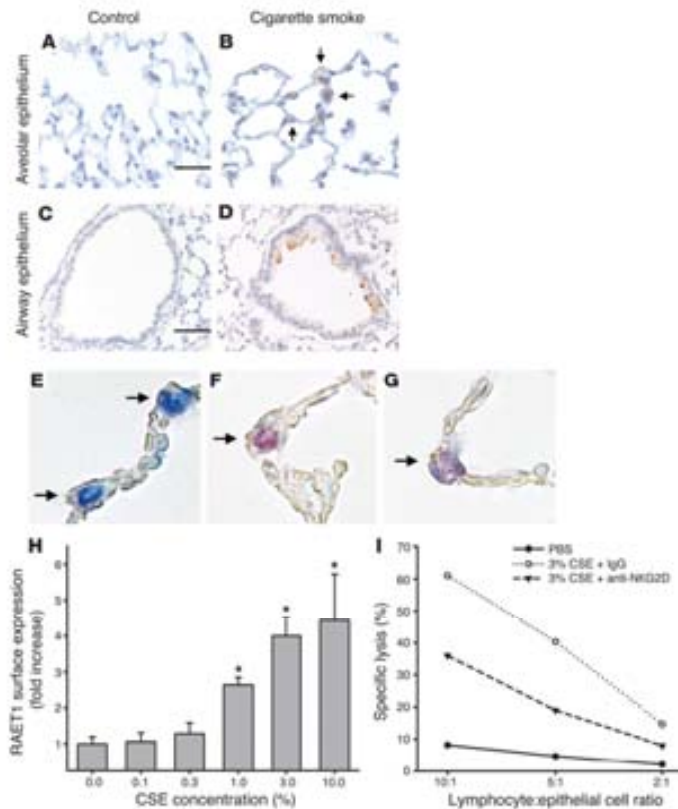
but is thought to involve chronic inflammation, leukocyte activation, oxidative stress, and increased elastolytic potential in the lung (3). Increased numbers of macrophages, neutrophils, and lymphocytes in the airways, parenchyma, and vasculature characterize the inflammation. Macrophages and neutrophils are well studied and seemingly contribute to tissue destruction through the liberation of extracellular matrix-degrading proteinases (4). A potential role for lymphocytes in COPD pathology is becoming increasingly appreciated (4–6). However, mechanistic data in support of causal role for lymphocytes in the development or progression of COPD are limited.

Cells undergoing physical or chemical stress are removed in order to control inflammation and promote repair. Multiple mechanisms for the detection and elimination of cells undergoing stress have been described previously (7). One system that may provide a mechanistic link between epithelial cell stress caused by cigarette smoking and immune cell activation in the lung involves NK cell group 2D (NKG2D; also known as KLRK1) receptor activation. The NKG2D receptor is expressed on circulating and tissue lymphocytes and directly recognizes stressed cells through ligands expressed on the cell surface (8). NKG2D receptors are expressed almost exclusively on CTLs (i.e., CD8\*

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Nonstandard abbreviations:** COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CSE, cigarette smoke extract; DOX, dexamethasone; MHC, major histocompatibility complex; NKG2D, NK cell group 2D; RAE1, retinoic acid early transcript 1; TREC, T-cell receptor capacity for CD3.

**Citation for this article:** *J. Clin. Invest.* 119:626–649 (2009). doi:10.1172/JCI34462



**Figure 1** NKG2D ligands are induced on pulmonary epithelial cells in cigarette smoke-induced emphysema and mediate CTL activation. (A–D) RAET1 was assessed by immunohistochemistry in the alveolar and airway epithelium of mice exposed to filtered air (control; A and C) or cigarette smoke (B and D) for 6 mo. Arrows denote RAET1<sup>+</sup> cells. Scale bars: 50  $\mu$ m (A and B); 100  $\mu$ m (C and D). (E–G) Alveolar epithelial tissue sections of mice exposed to cigarette smoke were stained for pro-SPC (blue; E), RAET1 (red; F), or both (purple; G). Arrows indicate alveolar epithelial cells. Photomicrographs in A–G are representative of 5 mice per group. Original magnification,  $\times 400$ . (H) Primary mouse type II alveolar epithelial cells were isolated as described in Methods and treated with CSE or PBS for 24 h. RAET1 expression was assessed by flow cytometry, and fold increase was derived from mean fluorescence intensity values. (I) Specific lysis of CSE-treated alveolar epithelial cells ( $1 \times 10^4$  cells). Cells were cocultured with freshly isolated, strain-matched lymphocytes at the indicated ratios. Shown are PBS-treated epithelial cells, 3% CSE-treated cells, and 3% CSE-treated cells cocultured with lymphocytes treated with a monoclonal blocking antibody against the mouse NKG2D receptor. Data are results of 3 independent experiments performed in quadruplicate.

T cells, NK cells, NK T cells, and  $\gamma\delta^+$  T cells) and can directly induce cell cytotoxicity, enhance innate immune functions, and modulate adaptive immune responses. The role of this system in triggering immune responses might also influence pathways that can result in aberrant activation of the immune system, leading to autoimmunity or other forms of immunopathology (9). NKG2D ligands are not expressed in healthy adult tissues, but are induced by infection, transformation, and DNA damage (8, 10–14). Multiple families of structurally distinct NKG2D ligands have been identified in both humans and mice. Two families of NKG2D ligands have been identified in humans: the MHC class I chain-related (MIC) molecules *MICA* and *MICB* (15) and the UL-16 binding proteins (16–18). Ligands for the mouse NKG2D receptor are encoded by the retinoic acid-inducible early genes (*Raet1a-Raet1e*) (19), *H60* (20), and *Mul1* (21).

Recently, we demonstrated that NKG2D ligand expression is induced on pulmonary epithelial cells in response to oxidative stress and infection (22, 23), implicating NKG2D receptor activation as a mechanistic link between epithelial cell stress and lymphocyte activation in pulmonary tissues. In this study, we provide support for the hypothesis that persistent NKG2D-mediated

activation of lymphocytes contributes to tissue remodeling and emphysema. In particular, we demonstrate that cigarette smoke induced NKG2D ligands on pulmonary epithelial cells and that NKG2D receptors governed cell-mediated cytotoxicity against cigarette smoke-exposed epithelial cells. We also show that sustained NKG2D activation was sufficient to cause pulmonary emphysema using a transgenic mouse model, which we believe to be novel, that regulates the exogenous expression of NKG2D ligands on pulmonary epithelial cells. Moreover, persistent epithelial expression of NKG2D ligands in mouse models of cigarette smoke-induced COPD and a population of COPD patients strongly correlated with morphological and physiological evidence of disease.

## Results

**Cigarette smoke induces NKG2D ligands in mouse pulmonary epithelium.** Long-term exposure to cigarette smoke is the primary cause of COPD and, specifically, emphysema. We first examined whether cigarette smoke exposure induced expression of the mouse NKG2D ligand retinoic acid early transcript 1 (RAET1) in a mouse model of emphysema. Immunohistochemical analyses demonstrated that cigarette smoke exposure for 6 mo induced sustained RAET1





expression in both airway epithelium and alveolar epithelium (Figure 1, A-D). We confirmed the expression of RAET1 on alveolar epithelial cells by dual labeling with the type II alveolar epithelial cell-specific marker pro-SPC (Figure 1, E-G).

RAET1 expression coincided with the development of emphysema, as determined by increased alveolar diameter. In contrast, RAET1 expression was not observed in control mice exposed to filtered air only. Quantitation of both RAET1 expression and increased alveolar diameter are presented below. Examination of NKG2D receptor expression in the lung revealed that approximately 20% of resident pulmonary lymphocytes express the NKG2D receptor (data not shown). This represents a substantial effector population, as lymphocytes accounted for about  $2 \times 10^7$  to  $5 \times 10^7$  cells in the mouse lung, and indicates that ligand upregulation is the limiting factor in this pathway.

To examine whether cigarette smoke exposure directly induces NKG2D ligand expression on pulmonary epithelial cells, we exposed primary mouse type II alveolar epithelial cells to cigarette smoke extract (CSE) and assessed RAET1 surface levels by flow cytometry. Untreated epithelial cells exhibited negligible expression of RAET1 ligands. However, similar to *in vivo* effects, CSE induced RAET1 surface expression (Figure 1H).

**NKG2D ligand induction on alveolar epithelial cells activates CTLs *in vitro*.** To assess the functional significance of NKG2D ligand induction in response to cigarette smoke, we established a coculture system using mouse type II cells and syngeneic lymphocytes. CSE-treated epithelial cells elicited marked CTL activation compared with PBS-treated epithelial cells, as measured by specific lysis of epithelial cells (Figure 1I). To define the contribution of ligands for the NKG2D receptor in epithelial cell cytotoxicity, we preincubated the lymphocytes with a blocking antibody against the mouse NKG2D receptor prior to coculture with CSE-treated epithelial cells. Importantly, blocking NKG2D function reduced the cytolytic activity toward CSE-treated epithelial cells by approximately 50%. These findings indicate that NKG2D ligand induction on alveolar epithelial cells is a major determinant of CTL activation after cigarette smoke exposure.

**Transgenic overexpression of NKG2D ligands induces pulmonary emphysema.** To characterize the response elicited by NKG2D ligands and their function in pulmonary pathophysiology, we generated a transgenic mouse model that allowed for the conditional expression of *Raet1a* in pulmonary epithelial cells. We expressed *Raet1a* in pulmonary epithelial cells under the control of doxycycline (DOX) administration using the *cre-loxP* transgenic system previously described (24). We established 3 separate *Raet1a* Tg mouse lines (lines 20, 22, and 32) bearing the target (*Cre*)-*CMV-Raet1a* transgene. Line 20 *Raet1a* Tg mice failed to demonstrate *Raet1a* transcript induction after DOX administration. Line 32 *Raet1a* Tg mice demonstrated modest *Raet1a* transcript induction. Line 22 *Raet1a* Tg mice exhibited robust *Raet1a* transcript induction and were used in all subsequent studies unless otherwise indicated. Immunohistochemical staining of DOX-treated *Raet1a* Tg mice confirmed RAET1 expression throughout the airway and alveolar epithelium (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI34462DS1) (25). None of the transgenic mice expressed the *Raet1a* transgene in the absence of DOX. Additionally, none of the transgenic mice exhibited any lung pathologies in the absence of DOX.

We first examined whether NKG2D ligand expression affected the composition of pulmonary leukocyte populations. Our data

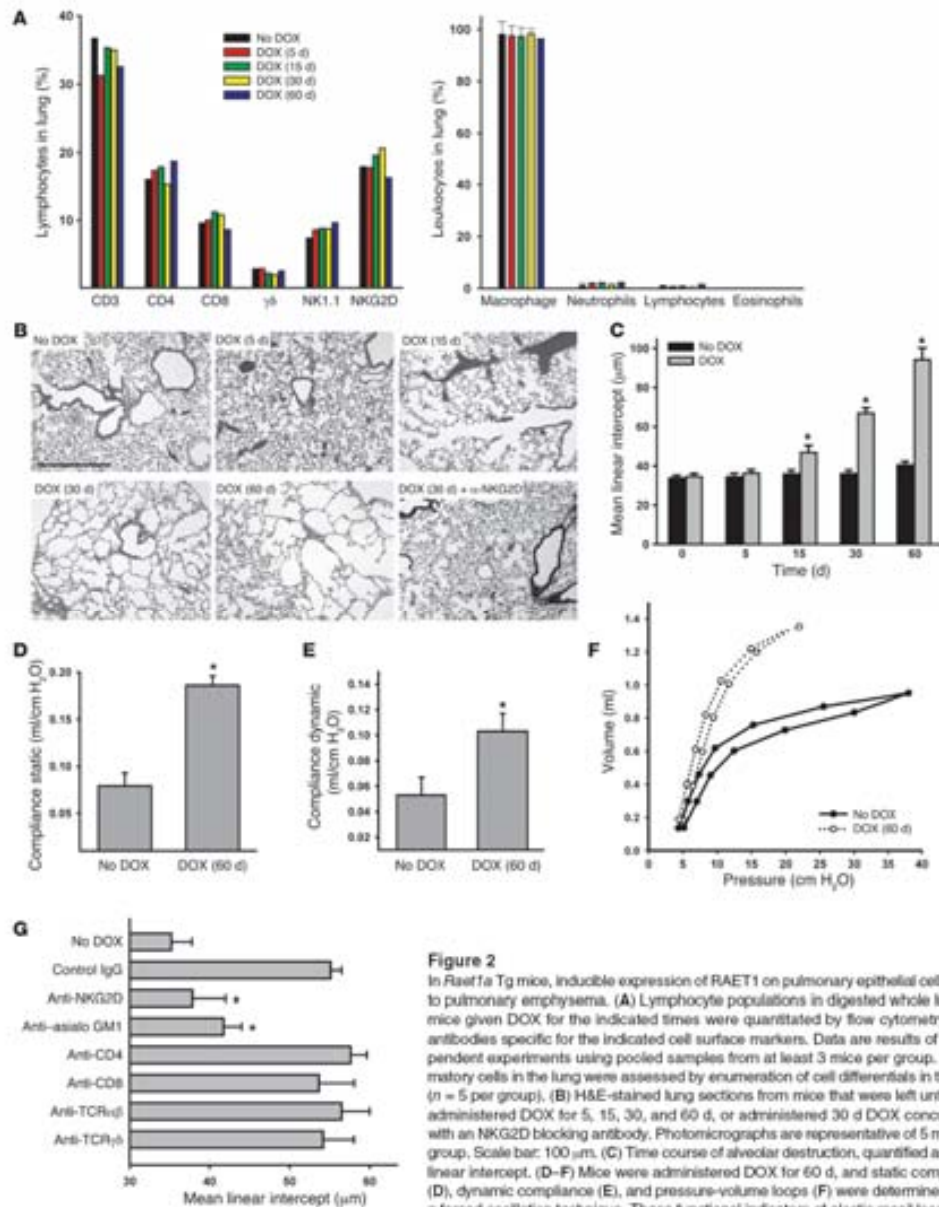
showed that RAET1 expression did not alter lung lymphocyte composition (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, and NK cells) or the percentage of NKG2D<sup>+</sup> lymphocytes (Figure 2A). Similarly, total and differential bronchoalveolar lavage (BAL) macrophage, neutrophil, and lymphocyte counts were not significantly different from those of control mice ( $P > 0.6$  for all comparisons; Figure 2A).

Histological examination of the lungs of *Raet1a* Tg mice after DOX administration revealed that RAET1 expression caused a progressive destruction of the alveolar architecture, resembling pulmonary emphysema (Figure 2, B and C). Quantitation of the changes in airspace enlargement, as assessed by alveolar diameter, demonstrated a nearly 300% increase in airspace enlargement compared with control-treated transgenic mice. Tissue remodeling was primarily localized to the alveolar architecture, with moderate alterations of the epithelium in the terminal airways, after 60 d DOX administration (data not shown). Consistent with the development of an emphysematous phenotype, we also observed increased static and dynamic compliance, physiological parameters describing the loss of elastic recoil and lung distensibility (Figure 2, D and E). Similarly, pressure-volume curve analysis illustrated a loss of lung elasticity in *Raet1a* Tg mice (Figure 2F).

We next examined whether the NKG2D receptor specifically mediated the effects of RAET1 expression by administering an anti-NKG2D blocking antibody to *Raet1a* Tg mice. We found that blocking NKG2D receptor activation completely abrogated the alveolar destruction observed in transgenic mice (Figure 2, B and G). These data strongly suggest that alveolar destruction, as a consequence of RAET1 expression, is mediated exclusively through the NKG2D receptor. Furthermore, we assessed the relative contributions of lymphocyte subpopulations to the alveolar destruction observed in *Raet1a* Tg mice. Elimination of NK cells using *in vivo* antibody depletion (anti- $\alpha\alpha\alpha$  GM1) significantly abated the effects of RAET1 expression in this mouse model (Figure 2G). In contrast, depletion of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, and  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cells had no significant effects on the development of airspace enlargement.

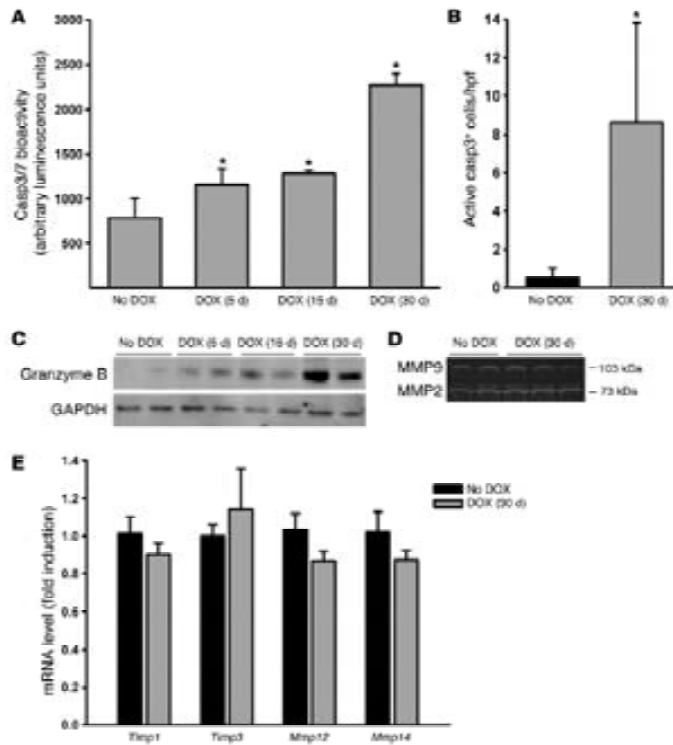
**Transgenic overexpression of NKG2D ligands induces epithelial cell apoptosis and CTL activation, but not inflammation.** Because NKG2D receptor activation can initiate several responses including inflammation, modulation of the adaptive immune response, and apoptosis of NKG2D ligand-expressing cells (8), we next sought to examine the possible contributions of these mechanisms to RAET1-induced emphysema. Assessments of bioactivity of the apoptotic markers active caspase 3 (Casp3) and Casp3/7 revealed that the apoptosis signals in the lungs of *Raet1a* Tg mice were increased (Figure 3, A and B). Immunohistochemistry revealed that the active Casp3<sup>+</sup> cells primarily localized to the alveolar compartments, consistent with the emphysematous phenotype. We assessed CTL activation by measuring the apoptotic effector enzyme granzyme B. Consistent with a role in CTL activation during epithelial cell apoptosis, we observed increased granzyme B protein levels in *Raet1a* Tg lungs both before and during the development of alveolar destruction (Figure 3C). These data are consistent with the results obtained with cigarette smoke-induced NKG2D ligand induction and CTL activation. That is, induction of NKG2D ligands activates the pulmonary immune system and leads to the destruction and/or removal of pulmonary epithelial cells.

Because MMPs are thought to play a critical role in the development of emphysematous lesions in mouse models (26), we assessed the activation state of the pulmonary macrophage compartment by examining MMP2 and MMP9 activation by gelatin zymography.



**Figure 2**

In *Ras17a* Tg mice, inducible expression of RAET1 on pulmonary epithelial cells leads to pulmonary emphysema. (A) Lymphocyte populations in digested whole lungs of mice given DOX for the indicated times were quantitated by flow cytometry using antibodies specific for the indicated cell surface markers. Data are results of 3 independent experiments using pooled samples from at least 3 mice per group. Inflammatory cells in the lung were assessed by enumeration of cell differentials in the BAL ( $n = 5$  per group). (B) H&E-stained lung sections from mice that were left untreated, administered DOX for 5, 15, 30, and 60 d, or administered 30 d DOX concurrently with an NKG2D blocking antibody. Photomicrographs are representative of 5 mice per group. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . (C) Time course of alveolar destruction, quantified as mean linear intercept. (D–F) Mice were administered DOX for 60 d, and static compliance (D), dynamic compliance (E), and pressure-volume loops (F) were determined using a forced oscillation technique. These functional indicators of elastic recoil loss reflect the ease with which the lung distends. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ –5 per group). (G) Specificity for NKG2D-mediated effects ( $n = 5$  per group). Lymphocyte populations were specifically depleted as described in Methods, and mean linear intercept was assessed after 30 d DOX treatment. \* $P < 0.05$  versus respective no DOX control.



**Figure 3**  
 Transgenic overexpression of NKG2D ligands induces epithelial cell apoptosis and CTL activation. (A) Effector caspase expression in lungs of *Raet1a* Tg mice administered 30 d DOX was assessed by Casp3/7 bioactivity in whole lung homogenates ( $n = 5$  per group). (B) Apoptotic cell accumulation in the lungs was assessed by immunohistochemistry on paraffin-embedded sections using a rabbit antibody specific for active Casp3. The number of active Casp3-stained cells was quantified from photomicrographs of lung sections and presented as mean  $\pm$  SD cells per high-power field (hpf). (C) CTL effector function was induced by NKG2D ligand expression in vivo. Western blot analysis on whole lung homogenates using a granzyme B-specific antibody showed increased protein expression after NKG2D ligand induction in pulmonary epithelial cells. (D) MMP2 and MMP9 activity were not altered in the lungs of mice ectopically expressing RAET1. Galatin zymography was conducted on lung homogenates of *Raet1a* Tg mice left untreated ( $n = 2$ ) or treated with 30 d DOX ( $n = 3$ ). Photomicrograph is representative of results obtained from 4–6 mice per group. (E) Transcript levels for MMP inhibitors *Mmp12* and *Mmp14* were not altered in the lungs of mice ectopically expressing RAET1. Real-time quantitative PCR was performed on RNA isolated from the lungs of *Raet1a* Tg mice left untreated or treated with 30 d DOX ( $n = 5$  per group). \* $P < 0.05$  versus no DOX control.

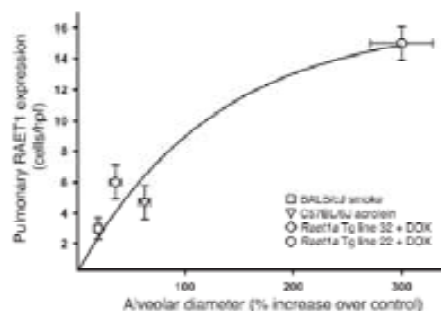
*Raet1a* Tg mice failed to demonstrate an increase in MMP2/9 activity, which coincided with the development of airspace enlargement (Figure 3D). Additionally, we measured the transcript levels of *Mmp12*, *Mmp14*, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (*Timp1*), and *Timp3*. *Raet1a* Tg mice failed to demonstrate an increase in these mediators, coinciding with the development of airspace enlargement (Figure 3E). Together, these data indicate that transgenic expression of RAET1 does not result in perturbations of the lymphocyte or macrophage populations known to contribute to airspace enlargement in smoke-induced emphysema models. Additionally, the lack of any effects on cell composition in these compartments, along with the data demonstrating activation of CTLs (i.e., granzyme B), suggests that the mechanism of alveolar destruction involves the efficient removal of affected cells without leading to collateral effects (i.e., inflammation).

*Sustained RAET1 expression correlates with increased alveolar destruction in multiple models of pulmonary emphysema.* To identify whether there is a relationship between the persistent expression of RAET1 and the development of airspace enlargement, we measured these endpoints in multiple models of airspace enlargement (Figure 4). These models included *Raet1a* Tg lines (strain FVB/N background), mice exposed to cigarette smoke (strain BALB/cJ), and a model of acrolein-induced COPD (strain C57BL/6J) that we recently

described (27). These data illustrate that there is a dose response relationship between the number of RAET1<sup>+</sup> epithelial cells and the degree of airspace enlargement ( $r^2 = 0.96$ ,  $P = 0.001$ ).

*NKG2D ligand expression increases in the peripheral lung of COPD patients and is associated with the development of COPD pathologies.* To further investigate the potential role of NKG2D in COPD, we examined the pulmonary expression of an NKG2D ligand, MICA, in human subjects with and without disease and assessed its association with several clinical components of the disease. Immunoblot analysis from peripheral lung resections demonstrated that protein levels of MICA were significantly increased in COPD patients (Figure 5, A and B). MICA expression was not detected in liver specimens from patients, regardless of COPD diagnosis (data not shown), which suggests that MICA upregulation is not a ubiquitous feature in tissues obtained from COPD patients.

Because cytotoxic CD8<sup>+</sup> and NK lymphocytes and their functional proteases are localized to the small airways (28) and to the lung parenchyma (29), we quantitated the abundance of T cell subpopulations, NK cells (CD56<sup>+</sup>), and NKG2D<sup>+</sup> cells in peripheral lung tissue of non-COPD and COPD patients undergoing thoracic surgery. Flow cytometric analyses indicated that NKG2D receptors were expressed on greater than 50% of peripheral lung lymphocytes (Figure 6A). However, the percent of NKG2D<sup>+</sup> cells

**Figure 4**

NKG2D ligand expression on pulmonary epithelial cells correlates with increased alveolar diameter in multiple mouse models of emphysema. The abundance of RAET1 expression on pulmonary epithelial cells was plotted against the increase in alveolar diameter (mean linear intercept) compared with respective control mice in 3 experimental models of pulmonary emphysema. RAET1 expression and mean linear intercept were quantified as described in Methods. The statistical significance of the relationship between RAET1 and increased alveolar diameter in these models is  $P < 0.001$ .

was not different between groups (Figure 6B). In addition, NK cells, which universally express NKG2D (8), represented greater than 30% of the peripheral lung lymphocyte population. Phenotyping of CD3<sup>+</sup> T cells showed that greater than 90% of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells were NKG2D<sup>+</sup>, whereas fewer than 5% of CD4<sup>+</sup> T cells expressed NKG2D (Figure 6, C–E).

To further examine the relationship between NKG2D ligand expression and the development of COPD pathologies, we assessed MICA expression in bronchial biopsies from 93 patients (21 never smokers, 30 former smokers, and 42 current smokers). These patients were extensively characterized in terms of pulmonary function, lung cancer staging, and presence of bacteria in bronchoaspirate cultures. MICA staining in bronchial biopsies from current and former smokers was present in the apical and basolateral membranes as well as airway epithelial cell cytoplasm (Figure 7, A–H). Analysis of MICA expression in the alveolar unit revealed a more diffuse pattern, possibly reflecting the expression in vascular endothelium (Figure 7I). Risk estimations indicated that sex, cigarette smoking, chronic bronchitis symptoms, and COPD diagnosis were all strongly associated with MICA expression in the airway epithelium (Table 1; see Methods and Supplemental Figure 2 for delineation of MICA<sup>+</sup> and MICA<sup>-</sup> categorical variables). The forced expiratory volume in the first second, a marker of airflow obstruction, and the lung transfer capacity for CO (TL<sub>CO</sub>), a marker of pulmonary emphysema, were significantly decreased in MICA<sup>+</sup> patients (Table 1). Moreover, macroscopic evidence of emphysema of the lungs, evident in 21 (23%) of the patients with an available CT scan of the lungs ( $n = 87$ ), was associated with decrease of TL<sub>CO</sub> (evident emphysema,  $67 \pm 14$ ; versus nonevident emphysema,  $83 \pm 22$ ;  $P = 0.009$ ), CO transfer coefficient (K<sub>CO</sub>, equal to TL<sub>CO</sub> normalized to effective alveolar volume;  $75 \pm 13$  versus  $92 \pm 19$ ;  $P = 0.001$ ), and

BMI ( $22 \pm 5$  versus  $26 \pm 3$ ;  $P = 0.01$ ). A near significant association was found between definite macroscopic emphysema and expression of MICA ( $P = 0.07$ ). MICA expression associated with the presence of lung cancer, but not with other variables, including age, cancer staging, or evidence of bacterial infection (Table 1).

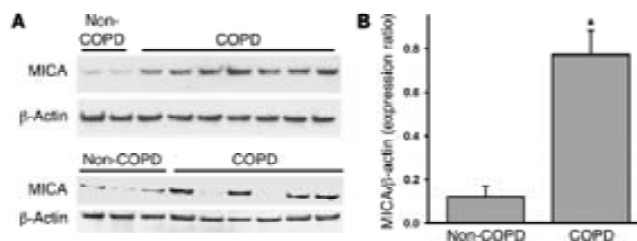
Although endobronchial biopsies are not the target tissue in regard to the development of emphysema, we evaluated these specimens for several reasons. COPD is a complex mixture of both pulmonary emphysema and chronic bronchitis, and it is reasonable to assume that changes in the airways of patients with COPD are reflective and predictive of changes in the peripheral lung (30). Moreover, we could obtain reasonable access to endobronchial biopsies, as opposed to the peripheral lung, in larger study patient groups. Therefore, we examined biopsies of peripheral lung tissues available in the limited subgroup of COPD cases and non-COPD controls that were submitted to thoracic surgery ( $n = 17$ ). All samples that demonstrated MICA<sup>+</sup> endobronchial biopsies ( $n = 6$ ) were also MICA<sup>+</sup> in the alveolar epithelium.

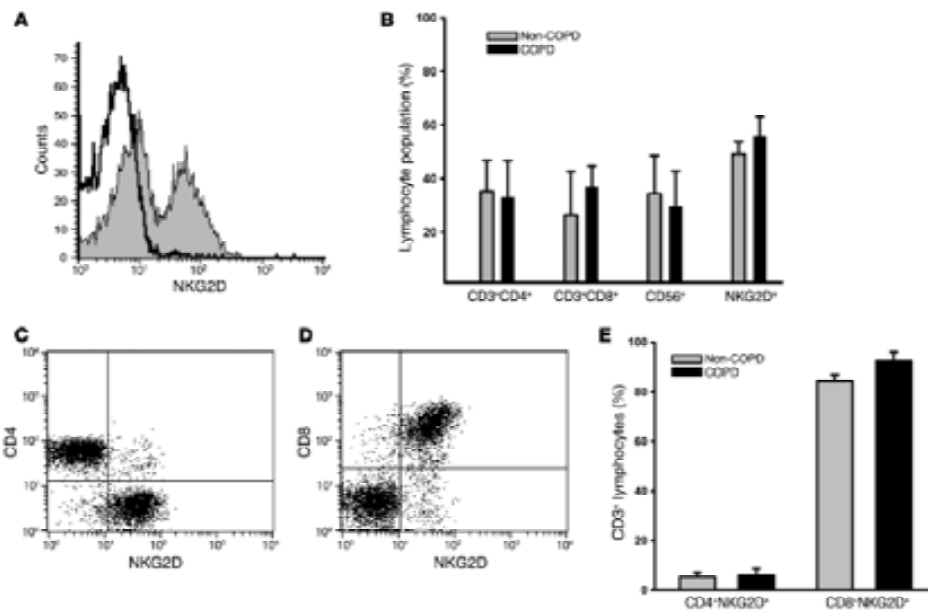
## Discussion

A potential role for lymphocytes in COPD pathologies is based primarily on reports demonstrating that the number of lymphocytes in the lung correlates with the extent of COPD clinical endpoints (31–34). However, the mechanism whereby lymphocytes become activated and contribute to COPD pathologies remains unclear. In the present study, we provide evidence, which we believe to be novel, that a lymphocyte activation pathway, NKG2D ligand expression, is associated with COPD pathologies in mouse models of disease and in human patients. Furthermore, we demonstrated that pulmonary expression of NKG2D ligands is sufficient for the development of emphysema in a mouse model.

**Figure 5**

MICA protein expression is increased in peripheral lung tissue of COPD patients. (A) MICA protein levels in peripheral lungs of non-COPD and COPD patients were assessed by immunoblot analysis. (B) Relative expression of individual MICA and  $\beta$ -actin bands were quantitated by scanning densitometry and expressed as a ratio of MICA to  $\beta$ -actin. Values are mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  versus non-COPD.



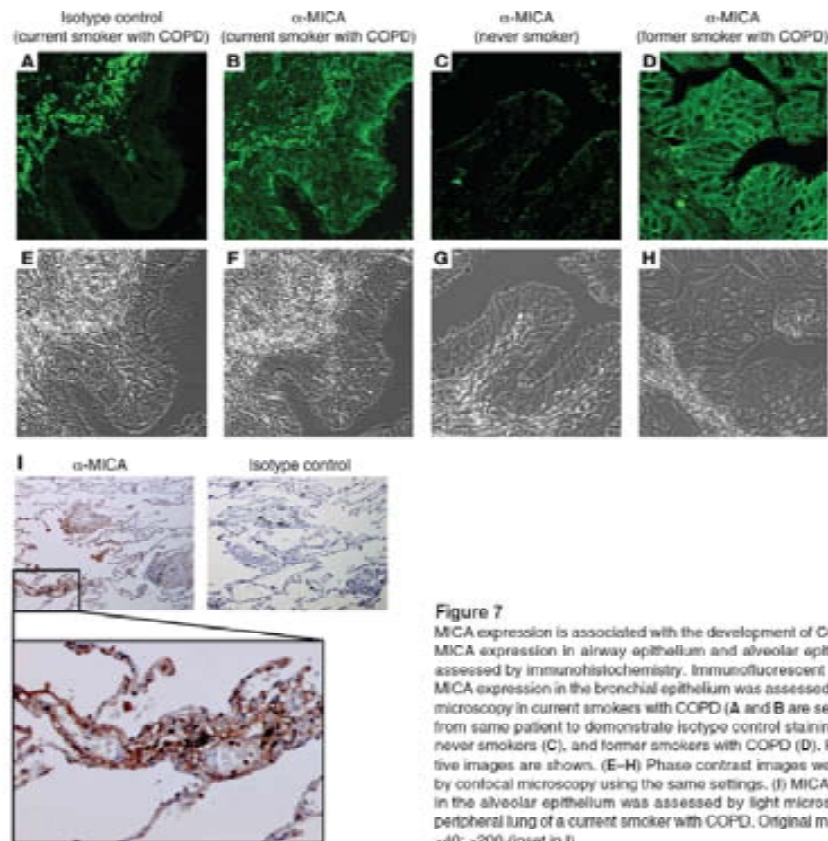


**Figure 6** NKG2D receptors are constitutively expressed on pulmonary CTLs. (A) NKG2D receptor expression on lymphocytes isolated from peripheral lung tissue of a representative COPD patient. Lymphocyte population was defined by forward and side scatter properties. Open histogram represents isotype control staining; filled histogram represents anti-NKG2D staining. (B) Relative abundance of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> (NK), and NKG2D<sup>+</sup> lymphocytes in the peripheral lungs of non-COPD and COPD patients. (C and D) CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> T cells (C) and CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> T cells (D) isolated from peripheral lung tissue of a representative COPD patient gated on CD3<sup>+</sup> cells. (E) Relative abundance of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> T cells in the peripheral lungs of non-COPD and COPD patients. Values are mean  $\pm$  SD. *n* = 5 (non-COPD); 10 (COPD).

Based on our experimental findings, we postulate that sustained expression of NKG2D ligands leads to the disruption of the alveolar architecture by CTL-mediated apoptosis of pulmonary epithelial cells. Given that NKG2D-bearing cells were abundant in the lung and that NKG2D lymphocyte populations did not considerably change in our mouse models of emphysema or COPD patients, we conclude that the mechanisms controlling this pathway are primarily dependent on the anomalous, sustained expression of NKG2D ligands on pulmonary epithelial cells and are independent of NKG2D receptor regulation. Several lines of evidence from *in vitro* and *in vivo* models demonstrate that the NKG2D pathway directly contributes to the pathogenesis of COPD. First, we showed that NKG2D ligands were not constitutively expressed in pulmonary epithelial cells of healthy subjects or naive mice, but cigarette smoke exposure associated with NKG2D ligand expression in both airway and peripheral tissues. Second, we showed that cell-mediated cytotoxicity against cigarette smoke-exposed alveolar epithelial cells was dependent on NKG2D receptor signaling. Third, transgenic expression of NKG2D ligands by pulmonary epithelial cells resulted in increased apoptosis of epithelial cells and emphysema, which was critically dependent on the function of NKG2D and NK cells. Fourth, we used multiple mouse models of emphysema to establish a causal

relationship between NKG2D ligand expression and the typical histological changes of emphysema.

The mechanisms regulating NKG2D-mediated effector functions have been thoroughly characterized (reviewed in ref. 35). NKG2D engagement is dependent on DAP10/DAP12 adaptor molecules that recruit Src family kinases and initiate multiple downstream signaling pathways that culminate in granule polarization, cytokine release, and cytotoxicity. In addition to ligand engagement, the expression and function of NKG2D can be influenced by other factors in the immune microenvironment, including IL-15 (36), IL-21 (37), and TGF- $\beta$ 1 (38). However, the number of effector lymphocytes expressing the NKG2D receptor was not affected by increased NKG2D ligand expression. Our present study as well as previous studies by others (28, 29) demonstrate that CTLs, including NKG2D<sup>+</sup> lymphocytes, are constitutively present in substantial numbers in the lung parenchyma. The differences in NKG2D receptor expression between mouse and human pulmonary lymphocytes represent a salient consideration in the interpretation of the data presented in the present study. In humans, NKG2D is present on the majority of CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells. In contrast, NKG2D is expressed primarily on NK cells, but not CD8<sup>+</sup> T cells, in mice. Therefore, our data demonstrating that NK cell depletion, but not CD8<sup>+</sup> T cells, ablated RAET1-mediated alveolar destruc-



**Figure 7**

MICA expression is associated with the development of COPD. (A–D) MICA expression in airway epithelium and alveolar epithelium was assessed by immunohistochemistry. Immunofluorescent detection of MICA expression in the bronchial epithelium was assessed by confocal microscopy in current smokers with COPD (A and B are serial sections from same patient to demonstrate isotype control staining reaction), never smokers (C), and former smokers with COPD (D). Representative images are shown. (E–H) Phase contrast images were obtained by confocal microscopy using the same settings. (I) MICA localization in the alveolar epithelium was assessed by light microscopy in the peripheral lung of a current smoker with COPD. Original magnification,  $\times 40$ ;  $\times 200$  (inset in I).

tion in the transgenic mouse model may not represent a congruent response in human disease. It is more likely that the response to NKG2D ligands in humans is also mediated by the effector functions of CD8<sup>+</sup> T cells and includes potentially confounding factors such as concurrent T cell receptor activation and the impact of pathogen-based disease exacerbations (39). We conclude that induced NKG2D ligand expression, as opposed to receptor expression, is the major determinant of NKG2D-attributed pathologies in COPD. This conclusion is supported by observations that non-smokers had no MICA expression, but expressed the same proportion of NKG2D<sup>+</sup> CTLs, compared with COPD patients. Moreover, exogenous RAET1 expression in pulmonary epithelial cells caused an emphysematous phenotype without altering the CTL number in the parenchyma. Our conclusion is also bolstered by the lack of modulation of NKG2D<sup>+</sup> cells observed in both cigarette smoke-exposed mouse lungs and *Raet1a* Tg mice, and the lack of pulmonary inflammation or macrophage activation (as evidenced by MMP activation) observed in mice expressing exogenous RAET1.

The apparent lack of MICA expression in some smokers and COPD patients is intriguing. Current paradigms of complex disease pathogenesis, including COPD, incorporate multiple factors and pathways and include the possibility of interactions among them. The absence of MICA in a subgroup of smokers and COPD patients could be a reflection of several possibilities. These include an actual absence of MICA in some patients, attributable to inter-individual variability in response to exposures inherent to any biological process; potential anatomical heterogeneity of the MICA expression (i.e., a negative biopsy obtained from an anatomical location does not exclude MICA expression in other airways); expression levels below our detection limits, and the potential involvement of other NKG2D ligands, such as ULBP proteins. The presence of aberrant polymorphic MICA alleles may circumvent detection with the antibody and also contributes to a failure to detect MICA expression (40). For example, the MICA-A5.1 allele has 1 extra nucleotide in the transmembrane region compared with the MICA-A5, which leads to a frame shift. This results in



**Table 1**  
MICA expression in bronchial epithelium according to demographic and clinical characteristics

	Total	MICA <sup>+</sup>	MICA <sup>-</sup>	P
<b>General characteristics</b>				
n	93	56	37	
Sex (male/female)	75/18	40/16	35/2	0.006
Age (yr)	66 ± 11	67 ± 10	65 ± 11	0.28
<b>Smoking status</b>				
Never smoker	21	21	0	
Former smoker	30	18	12	
Current smoker	42	17	25	0.000
<b>COPD and smoking<sup>a</sup></b>				
Non-COPD never smoker	15	15	0	
Non-COPD former smoker	4	4	0	
Non-COPD current smoker	7	2	5	0.004 <sup>b</sup>
COPD never smoker	6	6	0	
COPD former smoker	26	14	12	
COPD current smoker	35	15	20	0.034 <sup>c</sup>
<b>Chronic bronchitis</b>				
No	47	37	11	
Yes	46	19	26	0.000
<b>Pulmonary function</b>				
FEV <sub>1</sub> (% predicted)	67 ± 23	71 ± 25	61 ± 19	0.041
FVC (% predicted)	73 ± 18	77 ± 20	69 ± 19	0.171
FEV <sub>1</sub> /FVC ratio	65 ± 12	69 ± 13	64 ± 10	0.249
TLC (% predicted)	95 ± 19	97 ± 20	93 ± 19	0.351
TL <sub>CO</sub> (% predicted)	78 ± 22	86 ± 22	68 ± 16	0.005
<b>Macroscopic emphysema<sup>d</sup></b>				
Nonevident	66	43	23	
Evident	21	9	12	0.070
<b>Lung cancer</b>				
Negative	31	25	6	
Positive	62	31	31	0.004
<b>Bronchoalveolar culture<sup>e</sup></b>				
Negative	58	35	23	
Positive	35	21	14	0.974

Age and pulmonary function values are mean ± SD; other values denote n. FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; TLC, total lung capacity. <sup>a</sup>P = 0.000, non-COPD versus COPD groups.

<sup>b</sup>Among smoking statuses in non-COPD group. <sup>c</sup>Among smoking statuses in COPD group. <sup>d</sup>As assessed by CT scan; 6 scans were not available. <sup>e</sup>Bacteria species included *S. flora*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. marcescens*, and *M. tuberculosis*.

a premature stop codon within the transmembrane region, and, consequently, no cytoplasmic tail is present in these MICA molecules, which can lead to aberrant expression on the cell surface. Furthermore, we cannot exclude the possibility that smokers without a COPD diagnosis that demonstrate MICA expression in the epithelium are absolutely free of pulmonary disease. According to present definitions, diagnosis of airflow obstruction and COPD itself is based on pulmonary function tests, mainly spirometry. Nevertheless, several studies demonstrate that high-resolution CT is more sensitive and specific than commonly used functional tests for the evaluation of initial emphysema in asymptomatic smokers, despite normal or minimal abnormal changes in spirometry, TL<sub>CO</sub>, or other variables (41, 42). In other words, we speculate that it is probable that the definition of COPD according to current guidelines, and hence assignment of our volunteers to one group,

could underestimate the presence of early phases or less obstructive phenotypes of the disease. Additionally, the potential abrogation of bronchial MICA expression in response to chronic inhaled treatment may confound the detection of ligand expression, as most COPD patients receive inhaled β-adrenergic and inhaled steroids that potentially regulate epithelial cell gene expression. Finally, interindividual variability in treatment compliance may also represent a variable explaining potential MICA downregulation in some COPD patients.

The results of the present study indicate that the progressive alveolar destruction observed in *Raet1a* Tg mice is primarily a consequence of directed cytotoxicity against RAET1<sup>+</sup> cells. This response was associated with an increase in perforin/granzyme activity that was accompanied by an increase in apoptotic pulmonary epithelial cells. These results were not surprising, because previous studies have demonstrated that exogenous expression of NKG2D ligands elicits perforin/granzyme-mediated cytotoxicity in vitro (43, 44). However, these findings represent an expansion of earlier studies investigating the role of CTLs in COPD. Along these lines, increased expression of perforin, a pore-forming protein that causes apoptosis of target cells via cytolytic granules, has previously been reported in CTLs in patients with COPD (45), and increased alveolar epithelial cell apoptosis is correlated with the number of CTLs in patients with emphysema (54). In addition, recent studies demonstrate that cytotoxic T cells are necessary for the development of toxicant-induced emphysema in mice (27, 46).

Our findings of no major alterations in the cellular composition of the BAL or whole lung compartments of *Raet1a* Tg mice coincident with the development of alveolar destruction were somewhat unexpected. NKG2D receptor activation in vitro results in the elaboration of several cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, and GM-CSF; refs. 16, 47), and chemokines (macrophage inflammatory protein 1-β and 1-309; refs. 16, 48, 49) that are capable of inducing the accumulation and activation of multiple leukocyte populations. Therefore, the lack of BAL and lung inflammation in *Raet1a* Tg mice suggests that the binding of mouse NKG2D by RAET1 in vivo elicits a fundamentally different response than that observed in vitro (i.e., inflammatory cytokine elaboration), or that these mediators are not produced in sufficient quantities in vivo to induce overt inflammation. The implication of these findings is that the effector function of RAET1 expression and/or NKG2D receptor activation is downstream of both the inflammation and excess proteolytic activity observed in the natural progression of pulmonary emphysema. It is important to emphasize that this is not necessarily the same expectation we would have for the effects of endogenous NKG2D ligand expression induced in a toxicant-induced model of airspace enlargement. In the instance of endogenous induction by cigarette smoke exposure, we expect that direct effects of the smoke, inflammation, and increased matrix degradation contribute to the stress imposed on the epithelium, which leads to the induction of RAET1 expression. Our present results highlight the difficulties of dissecting the cellular and molecular mechanisms of a complex disease, but demonstrate that the development of an experimental model of reduced complexity can help delineate the role of CTLs in COPD pathogenesis.

An important consideration in these studies is that the pathologies are dependent on sustained as opposed to transient expression of NKG2D ligands in the pulmonary microenvironment. Several acute experimental exposures initiate pulmonary NKG2D ligand expression in mice in a transient manner, including pul-



monary bacterial infection (23) and exposure to pulmonary irritants (e.g., ozone and acrolein; M.T. Borchers, unpublished observation). Similar to *in vitro* studies with human pulmonary epithelial cells (22), acute exposures lead to maximal induction of NKG2D ligand expression at 24–48 h that rapidly returns to baseline. Under all the above-described conditions, acute expression of NKG2D ligands does not lead to irreversible changes in the pulmonary architecture. However, the present study demonstrated that inducible, sustained expression of NKG2D ligands in mice occurred following chronic exposure to cigarette smoke and that sustained pulmonary expression of NKG2D ligands in the *Raet1a* Tg mouse model was sufficient to cause pulmonary emphysema. More importantly, we demonstrated that upregulation of NKG2D ligands in COPD patients was likewise persistent, as evidenced by the lack of association between MICA upregulation and either infection or smoking status. These data also demonstrate the importance of determining whether NKG2D pathway blockade is effective in attenuating experimental emphysema development induced by cigarette smoke.

The immune system can be activated by signals from cells exposed to pathogens, environmental stimuli, or mechanical damage. The presumed function of stress immunosurveillance is to contribute to tissue repair and maintenance by eliminating stressed or damaged cells and to facilitate the restoration of healthy cells (7, 50). In the context of COPD, the local pulmonary immune system appears to be chronically responding as if it recognizes a tumor cell or virus-infected cell. Although CTL activation in response to tumors and pathogens is highly beneficial to the host, the CTL response to chemically stressed cells (e.g., cigarette smoking) is ultimately detrimental to the susceptible host as it contributes to the imbalance in tissue injury/repair that is a pathognomonic feature of COPD. Previously, we reported that cultured human airway epithelial cells respond to acute oxidative stress by transiently expressing several known ligands for NKG2D (22). Although the present study did not address the mechanisms of NKG2D ligand induction on pulmonary cells, we presume that it is likely a combination of direct effects of the many toxicants present in cigarette smoke and the indirect effects of products of tissue damage. Along these lines, NKG2D ligand induction has previously been reported in response to toll-like receptor stimulation (51) and DNA damage (10). In this context, NKG2D ligand induction represents a general mechanism of immune cell activation used by the lung under stress.

We provide the first evidence to our knowledge that the NKG2D pathway is associated with COPD, particularly the morphological and/or physiological endpoints of emphysema. We demonstrated that in multiple mouse models of emphysema, RAET1 expression was strongly associated with the development of airspace enlargement. In human COPD patients, bronchial biopsies demonstrated that MICA staining was associated with cigarette smoking and emphysema development. Similarly, MICA expression increased in peripheral lung tissue from a separate COPD patient population. Investigators have hypothesized that COPD represents an autoimmune disease and suggested that aberrant activation of the immune system accounts for the findings that inflammation persists and lung function continues to decline in former smokers (52, 53). Several findings support the concept that autoimmune reactions accompany COPD pathogenesis. Oligoclonal expansions of CD4<sup>+</sup> T cells in emphysematous lung tissue of patients undergoing thoracic surgery have been reported (54), but these find-

ings may reflect the response to current infection or tumor. More recently, we have demonstrated clonal expansions in predominantly CD8<sup>+</sup> T cells in a mouse model of COPD devoid of infections or tumors (55). Direct evidence of autoimmunity is provided by the reports that circulating antibodies against elastin fragments correlate with emphysema severity (56) and that autoantibodies against pulmonary epithelial cells are present in COPD patients (57). Our present findings support the hypothesis that persistent NKG2D ligand expression on pulmonary epithelial cells, and the subsequent pathological consequences, is a form of autoimmunity because it reflects a breakdown in self tolerance. The emerging picture is that immunopathogenesis represents an important component of COPD progression.

Presently, it is unknown whether activation of the NKG2D pathway contributes to other chronic pulmonary diseases, or whether other exposures (e.g., passive exposure to cigarette smoke or other inhaled pollutants or viral infections), if any, are also associated with aberrant MICA expression in the lung. However, the potential pathogenic role of current or former active smoking is highlighted in the present study, as MICA was associated with smoking whereas it was not detected in any bronchial sample obtained from the limited number of patients with nonsmoking COPD or in former smokers without COPD. In addition, examination of a limited number of never smoker asthma patients failed to reveal any MICA immunoreactivity in bronchial biopsy material (data not shown). There was no *a priori* evidence that any immune functions are disease specific. Indistinguishable lymphocyte effector functions are triggered in response to pathogens, cancer, and autoimmune reactions. Therefore, the consequences of NKG2D ligand expression are likely dependent on temporal and spatial expression (airway versus alveoli) and the context of the unique pulmonary immune microenvironment.

In summary, our findings that NKG2D mediated CTL activation after exposure to cigarette smoke, that NKG2D ligand expression caused emphysema in transgenic mice, and that NKG2D ligands were aberrantly expressed in the pulmonary epithelium of both animal models and patients with COPD, which coincided with emphysema development, provide mechanistic insight into COPD pathogenesis. These data provide a more comprehensive picture of COPD and increase our understanding of the effects of current treatments and new therapeutics developed for COPD patients. Moreover, we demonstrated that anti-NKG2D blocking antibody abrogated emphysema development in the animal model, which suggests the NKG2D pathway maybe a molecular target for complementary treatment and/or prevention of emphysema. An increased understanding of how the pulmonary epithelium communicates with the immune system in order to maintain healthy tissue will provide the foundation for future investigations to determine the role of lymphocyte subpopulations in pulmonary diseases in which injury and repair are in disequilibrium.

## Methods

**Mice.** All procedures were conducted using mice 8–12 wk of age maintained in ventilated microisolator cages housed in an American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care–accredited animal facility. Protocols and studies involving animals were conducted in accordance with NIH guidelines and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Cincinnati College of Medicine.

**Animal exposures.** Mice (8-wk-old female BALB/cJ; The Jackson Laboratory) were exposed to filtered air or 150 mg/m<sup>3</sup> cigarette smoke from stan-





standard research cigarettes (ZR4F, University of Kentucky Tobacco Research and Development Center) – 4 h per d, 5 d per wk – for 6 mo using the Teague TE-10Z whole body exposure system (Teague Enterprises). Mice (8-wk-old female C57BL/6J; The Jackson Laboratory) were exposed to filtered air or 2.0 ppm acrolein – 6 h per d, 5 d per wk – for up to 12 wk as previously described (58) to induce the hallmark features of COPD.

**Immunohistochemistry.** RAET1 immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded mouse lung tissue with a goat polyclonal antibody (clone AF1136; R&D Systems) as previously described (23). Pro-SPC was detected with a rabbit polyclonal antibody (Chemicon). RAET1 and pro-SPC dual labeling was visualized using alkaline phosphatase-labeled secondary antibody kits (Vectastain ABC-AP kit; Vector Laboratories) with Vector Red and Vector Blue Alkaline Phosphate Substrate kits (Vector Laboratories) according to manufacturer's recommendations. Activated Casp3 protein was detected with a rabbit polyclonal antibody (R&D Systems) in 5- $\mu$ m paraffin sections of mouse lung tissue as previously described (27). RAET1<sup>+</sup> and Casp3<sup>+</sup> cells were quantitated as the number of positive cells per randomly chosen high-power field ( $\times$ 400 magnification) of 5 fields per section from 3 sections per mouse ( $n = 5$ –8 mice per group).

MICA immunoreactivity was assessed using a mouse anti-human MICA- $\beta$  monoclonal antibody (clone AMO1; Immunotek Biotechnologies) as described in Supplemental Figure 2. Both immunofluorescence and immunoperoxidase techniques were similarly performed on adjacent sections using FITC-conjugated and peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibodies (BD Biosciences – Pharmingen). Confocal microscopy was performed using a Leica SP2 confocal scanning laser microscope adapted to an inverted Leica DM IRBE microscope. Immunoreactivity was assessed on peroxidase-stained sections using a single-blind approach by 3 investigators and was expressed as a binomial categorical variable. MICA<sup>+</sup> or MICA<sup>-</sup> MICA<sup>+</sup> was defined using 2 objective criteria obtained from a computer-assisted image analysis based on epithelial staining, the hue and saturation of the reaction, and the stained area fraction (see Supplemental Figure 2).

**Isolation of mouse alveolar epithelial cells and flow cytometry.** Primary alveolar epithelial cells were isolated and maintained as previously reported (59). Lungs were perfused with 10 ml of 0.9% saline through the right ventricle, and 3 ml Dispase (Fisher) was instilled through a cannula in the trachea, followed by 1 ml of 1% low-melt agarose (Promega). After a 2-min incubation of the animal on ice to harden the agarose, the lungs were removed and incubated separately in 1 ml Dispase for 45 min at room temperature. Lungs were then placed in 60-mm culture dishes containing 7 ml DMEM (Mediatech), 20 mM HEPES (Fisher), 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen), and 100 U/ml DNase I (Sigma-Aldrich). The lungs were gently teased away from the cell suspension, agitated for 10 min, and placed on ice. The cell suspension was filtered successively through 100- $\mu$ m, 40- $\mu$ m, and 20- $\mu$ m nylon gauze and centrifuged for 8 min at 130  $g$ . After centrifugation, cells were resuspended in complete DMEM (containing 20 mM HEPES, 10% FBS, and 100 U/ml penicillin-streptomycin). Cells were then incubated on precoated dishes containing 45  $\mu$ g/ml anti-mouse CD45 and 16  $\mu$ g/ml anti-mouse CD32 for 2 h in a tissue culture incubator (5% CO<sub>2</sub> at 37°C). Nonadherent cells were panned from the antibody plates, rinsed with complete DMEM, centrifuged, and resuspended in complete DMEM. The cells were then placed in 6-well plates precoated with a mixture of 80% Matrigel (BD Biosciences) and 20% complete DMEM. Cell purity was determined by light microscopy. Cells were maintained in complete DMEM.

**CSE and treatment.** CSE was generated by bubbling smoke from 1 standard reference cigarette into 10 ml PBS through a 50-ml fritted impinger at a flow rate of 350 ml/min. The resulting extract was passed through a 0.22- $\mu$ m filter and was considered 100% CSE. The CSE was adjusted to pH 7.4 by the addition of NaOH before addition to the epithelial cell cultures. CSE

treatment was performed in 6-well plates, and experiments were performed using cells at approximately 80% confluence. Briefly, cells were replenished with fresh media, allowed to equilibrate for 2 h (5% CO<sub>2</sub> at 37°C), and exposed to CSE or PBS for 24 h. Cells were released from the Matrigel with Matrisperse (BD Biosciences) nonenzymatic recovery solution according to the manufacturer's instructions in order to ensure minimal distress to the cell surface ligands. RAET1 expression on the surface of epithelial cells was determined by staining with the anti-RAET1 $\alpha$ -RAET1 $\alpha$  monoclonal antibody (clone 186107; R&D Systems). Flow cytometry was performed on a FACScan cytometer (BD), and data acquisition and analysis was performed using CellQuest Pro software (version 5.2; BD).

**Preparation of mouse lymphocytes and cytotoxicity assays.** Lymphocytes were isolated and purified from mouse spleen using a magnetic cell separation system according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec). The protocol uses a negative selection strategy to magnetically retain antibody-bound granulocytes. The effluent from this protocol yields untouched, enriched lymphocytes. A recovery of approximately 40% lymphocytes per spleen was typical. Approximately 20% of splenic lymphocytes express NKG2D upon isolation, and do so for up to 12 d when maintained in RPMI-1640 containing 1,000 U/ml recombinant human IL-2. All coculture studies were conducted with freshly isolated cells in RPMI-1640 containing 1,000 U/ml recombinant human IL-2 and mouse alveolar epithelial cells treated with 3% CSE or PBS for 24 h. Cytotoxicity assays were performed using the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions.

**Raet1 $\alpha$  Tg mice.** *Cop-rta* transgenic mice, on the FVB/N background, were previously generated (24), and DOX-inducible *Raet1 $\alpha$* -expressing mice, on the FVB/N background, were generated at the University of Cincinnati using *Raet1 $\alpha$*  cDNA obtained by PCR cloning as described in Supplemental Figure 1 and in previous publications (24, 25). DOX was administered in the diet (TD 01306 rodent diet, 2.018 diet and 625 mg DOX; Harlan Teklad) beginning at 8–10 wk of age.

**Morphometric analysis and pulmonary mechanics.** The average intra-alveolar distance was calculated as the mean linear intercept on H&E-stained sections of inflation-fixed (20 cm H<sub>2</sub>O) mouse lungs, as previously detailed (60). Total respiratory system mechanics were assessed in mice using the forced oscillation technique (FlexVent; Scireq) according to the method of Gosses (61).

**Anti-NKG2D administration.** NKG2D receptor function was blocked by i.p. administration of the rat anti-mouse NKG2D monoclonal antibody CX5 (eBioscience) under conditions identical to those previously reported (23).

**In vivo lymphocyte depletion.** Lymphocyte populations were depleted by repeated i.p. administration of antibodies (100–200  $\mu$ g/mouse, every 4 d beginning 8 d prior to DOX administration) specific for NK cells (anti-asialo GM1; Wako Chemicals USA),  $\alpha$  $\beta$  T cells (clone H57-97),  $\gamma$  $\delta$  T cells (clone UC7-13D5), CD4<sup>+</sup> cells (clone GK1.5), and CD8<sup>+</sup> cells (clone 2-43). All TCR antibodies were kindly provided by G. Deepe (University of Cincinnati). Lymphocyte depletion was greater than 90% in all experiments, as confirmed by analyzing peripheral blood cells using the detection antibodies against the following cell types: NK cells (anti-NKp46, clone 29A1.4; eBioscience),  $\alpha$  $\beta$  T cells (clone 145-2C11; BD Biosciences – Pharmingen),  $\gamma$  $\delta$  T cells (clone GL3; BD Biosciences – Pharmingen), CD4 cells (clone LT34; BD Biosciences – Pharmingen), and CD8 cells (clone 53-67; BD Biosciences – Pharmingen).

**Caspase bioassay.** Whole lung homogenates were prepared in PBS, and commercially available kits were used to estimate the activity of Casp3/7 according to manufacturer's instructions (Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay; Promega).

**Quantitative real-time PCR.** Total RNA was isolated from mouse lung with TRIzol Transcription Kit (Applied Biosystems). For each gene examined, quantitative RT-PCR was performed on an ABI 7300 System using pre-



validated TaqMan Gene Expression Assays Reagent (Invitrogen) and subsequently converted into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse according to the manufacturer's standard protocols (Applied Biosystems). Gene expression was normalized to the *Hprt1* endogenous control gene, and relative quantitation of gene expression was calculated using the comparative Ct method (2400).

**BAL and cell enumeration.** After exposure, mice were anesthetized (50 mg/kg of pentobarbital sodium (p)) and exsanguinated by severing the posterior abdominal aorta. The lungs were then lavaged 2 times with 1 ml HBSS. Individual BAL returns were pooled and centrifuged at 300 g for 10 min. The supernatant was removed and stored at 70°C. The cell pellet was reconstituted in 1 ml HBSS containing 2% FBS. Total cell counts were determined with a hemocytometer. Differential cell counts (>300 cells) were performed on Diff-Quik-stained (Baxter Diagnostics) cytospin slides (Cytospin3; Shandon Scientific).

**Pulmonary lymphocyte characterization.** Single cell suspensions from perfused, digested lungs were layered onto a single-step Percoll gradient (60% Percoll,  $\rho = 1.064$ , 1× HBSS, and 15 mM HEPES, pH 7.4) and centrifuged at 2,000 g for 45 min at 4°C. The buffy coat containing mononuclear cells was removed and washed twice in PBS containing 2% FCS. The cell pellet was then subject to red blood cell lysis, washed, and resuspended in PBS containing 2% FCS. Cells were labeled with antibodies against CD3 (clone 145-2C11; BD Biosciences – Pharmingen), TCR $\beta$  (clone GL3; BD Biosciences – Pharmingen), CD4 (clone GK1.5; BD Biosciences – Pharmingen), CD8 (clone 53-6.7; BD Biosciences – Pharmingen), NK1.1 (clone PK136; BD Biosciences), and MRG2D (clone CX5; eBiosciences) (BD). Cells were analyzed by flow cytometry using a FACScan cytofluorometer (BD). Data acquisition and analysis were performed using CellQuest Pro software (version 5.2; BD).

**Zymogram.** Mice were anesthetized (50 mg/kg of pentobarbital sodium (p)) and exsanguinated by severing the posterior abdominal aorta. Lungs were removed, immersed in liquid nitrogen, and homogenized in HBSS. Gelatin zymography was performed using whole lung homogenates. Briefly, 60  $\mu$ g lung protein in 2× Tris-Glycine gel loading buffer was electrophoresed at 125 V for 60 min in a 10% Tris-Glycine gel containing 0.1% gelatin (Invitrogen). Gels were washed twice in zymogram renaturing solution, preincubated for 30 min at 37°C in zymogram developing solution, and incubated in zymogram developing solution (Invitrogen). Gels were stained with 0.5% Coomassie blue (Sigma-Aldrich) in 40% methanol and 10% acetic acid (1 h, 22°C) and destained in 40% methanol and 10% acetic acid (1 h, 22°C), with 2 changes of destaining solution to visualize digested bands in the gelatin matrix. A parallel SDS-PAGE gel was loaded with 60  $\mu$ g protein and stained with Coomassie blue as a loading control. Gels were photographed using a FOTO/Analyst Investigator System digital camera (Fotodyne).

**Human ethics and study design.** Bronchial biopsies and surgical specimens were collected from 2 separate patient study groups. The Research Committee of Human Investigation at BCM approved the study for endoscopic biopsy collection from adult patients admitted to the Bronchoscopy Facility for diagnostic purposes. Written informed consent was obtained from each participant. The Institutional Review Board of the University of Cincinnati College of Medicine approved protocols to obtain surgical specimens from patients undergoing thoracic surgery procedures for benign and malignant disease.

**Patient identification and case enrollment.** For both study groups, COPD diagnosis was made according to Global Initiative for Obstructive Lung Disease criteria (1). All patients undergoing endoscopic bronchial biopsy were clinically stable for more than 2 mo. Some patients received regular treatment with inhaled bronchodilators ( $n = 21$ ) and/or inhaled steroids ( $n = 7$ ). Patients were excluded for reasons of COPD exacerbation in the last 3 mo, clinical suspicion of bronchial asthma, treatment with systemic

steroids within the last 2 mo, or tumor observed in the trachea or main bronchi during bronchoscopy. Smoking status data was collected via a questionnaire. Exhaled CO was measured to confirm smoking cessation or continued smoking.

**Pulmonary function.** For patients undergoing endoscopic bronchial biopsy, pulmonary function was assessed by forced spirometry (Dataspire 900; SIBEL). Static lung volume determination, airway resistance, and T $_{100}$  were determined using plethysmography and single-breath analysis (Masterlab; Jaeger). Reference values used were those for the Mediterranean population (52).

For patients undergoing thoracoscopic procedures at the University of Cincinnati, pulmonary function was tested using the Vmax Encore (Viasys Healthcare) according to American Thoracic Society guidelines (63). Reference values for this population were determined according to Morris (64). COPD was diagnosed according to the Global Initiative for Obstructive Lung Disease (1). Clinical patient characteristics from the 2 institutions were similar in pack years, pulmonary function parameters, and tumor incidence. See Table 1 and Supplemental Tables 1–3 for complete demographic and clinical characteristics of both patient groups.

**CT of the lungs.** CT of the lungs was available in 76 (93%) of the selected study subjects. All CT scans were taken in the supine position with 1.25 and 7 mm collimation, scanning time of 0.75 s, 120 kV, and 90 mA (SOMATOM Sensation 4; Siemens). Images were reconstructed using high (100) and low (340) spatial frequency resolution algorithms for all cases. The machines were calibrated with standard protocols every 6 mo using the manufacturers' standard phantom and yearly, according to the national regulatory guidelines. Scans were obtained at full inspiration, and no *iv.* contrast was used. Scans were independently examined for the presence of emphysema by radiologists blinded to the subjects' clinical history. The radiological diagnosis of emphysema was made if centrilobular low-density areas or parilobular or paraseptal emphysematous changes were present, and subjects were graded as having no evidence of emphysema, changes suggestive of emphysema, or definite emphysema. In cases of discordance, the images were viewed together and a consensus decision reached. Only subjects with definite emphysema were included as having macroscopic disease in subsequent analyses (42).

**Bronchoscopy, bronchial biopsy, and surgical specimen collection.** Endobronchial biopsy specimens were obtained by direct visualization using a flexible videobronchoscope (BF-200, Olympus) and bronchial biopsy forceps (FB 21-C, Olympus) from macroscopically normal areas of the third order carina as previously described (65). Biopsies were preserved in formalin and fixed in paraffin. Surgical specimens were obtained from patients who underwent pulmonary resections for benign and malignant processes. Surgical specimens were obtained from lung tissue distant from the tumor site and were cut by a certified pathologist within the Anatomic Pathology Department, University of Cincinnati Hospital. Portions of the surgical specimens were snap frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until protein extraction. In some patients, portions were immediately placed in cell culture media and enzymatically digested as described below.

**Immunoblots.** Protein isolation and immunoblot analyses were performed as previously described (22). Membranes were incubated overnight with anti-MICA (catalog no. AF1300, R&D Systems) or anti-granzyme B (clone 216315; R&D Systems), then incubated with IgG-HRP-conjugated secondary antibody and detected by chemiluminescence (ECL Reagent; Amersham). Membranes were stripped and reprobed with anti-GAPDH or anti- $\beta$ -actin antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Individual MICA and  $\beta$ -actin bands were quantitated by scanning densitometry using ImageQuant software (version 5.2; Molecular Dynamics).

**Human lung cell isolation and flow cytometry.** Freshly isolated lung tissue (<1.0 g) obtained from patients undergoing surgical resections was diced



into pieces of less than 500  $\mu$ l in 4 ml HBSS containing 175 U/ml collagenase, 0.2 U/ml pancreatic elastase, 35 U/ml hyaluronidase, 30 KU/ml DNase (Sigma-Aldrich), 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (CellGro) and incubated for 30 min at 37°C on an orbital shaker. Digested tissue was sheared through a 20-gauge needle and passed through 40- $\mu$ m filters. Leukocytes were recovered by layering over a 30% Percoll solution and centrifuging at 400 g for 40 min. Identification of CD3<sup>+</sup> (anti-human CD3, clone SK7, PerCP-C5.5 conjugated; BD Biosciences), CD4<sup>+</sup> (anti-human CD4, clone RPA-T4, FITC conjugated; BD Biosciences), CD8<sup>+</sup> (anti-human CD8, clone HIT8a, PE conjugated; BD Biosciences), NK (anti-human CD56, clone B159, APC conjugated; BD Biosciences), and NKG2D<sup>+</sup> (anti-human NKG2D, clone 1D11, APC conjugated; BD Biosciences) cell populations was determined by flow cytometry using a FACSCalibur cytometer (BD). Data acquisition and analysis was performed using CellQuest Pro software (version 5.2; BD).

Statistical analysis. Animal data were analyzed for normality using SigmaStat software (version 3.5; Systat Software). Significant differences among groups were identified by ANOVA, and individual comparisons between groups were confirmed by a post-hoc Tukey test, with differences between means considered significant at  $P < 0.05$ . All data presented are mean  $\pm$  SD. The relationship between RAET1 and alveolar diameter in mouse models was assessed by an exponential rise, 2 parameter nonlinear regression analysis ( $y = a(1 - e^{-bx})$ ) performed using SigmaStat software.

Clinical characteristics are expressed as mean and SD or as a percentage. MICA frequency comparison between different groups was performed by  $\chi^2$  test. Mean values of pulmonary function variables were compared using 2-tailed Student's *t* test between MICA<sup>+</sup> and MICA<sup>-</sup> patients. Risk estimates were assessed by logistic regression. A *P* value of less than 0.05 was considered significant. Clinical statistics were performed using Statview (release 8.0; StatCorp).

**Acknowledgments**

The authors gratefully thank Thomas Spies, Veronika Groh (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA), Angel Gayete (CRC Mar, Hospital del Mar, Barcelona, Spain), and Josep M. Antó (Respiratory and Environmental Research Unit, Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain), for helpful analyses and discussions. The University of Cincinnati Transgenic Core Facility, John Leikauf, Michael Graves, Alejandro Candelos, Jay Asplan, and Patricio Esquivel provided excellent technical assistance. The authors acknowledge X. Sanjuan (Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain), B. Abejón (Hospital del Mar, Barcelona, Spain), and B. Casado (Muscle and Respiratory Research Unit, IMIM) for assistance with immunohistochemistry and confocal microscopy. This work was supported by Red RESMIRA (RTEC-C03/11, Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Spain), ISCIII RA06/90061, ARMAR, ERESMUS in COPD (BMTH4-CT98-3406, E.U.), SOCAP 2004, Becario SEPAP 2005, CIBER de Enfermedades Respiratorias, FIS-PI-05-2438 (M. Orozco-Levi), the Health Effects Institute (M.T. Borchers), University of Cincinnati Center for Environmental Genetics grant P30-ES06096-02 (M.T. Borchers), and NIH grant R01 ES015036 (M.T. Borchers).

Received for publication April 9, 2008, and accepted in revised form December 22, 2008.

Address correspondence to: Michael T. Borchers, Department of Environmental Health, Division of Environmental Genetics, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio 45267-0056, USA. Phone: (513) 558-6424; Fax: (513) 558-0925; E-mail: michael.borchers@uc.edu.

1. Pauwels RA, Buur A.S., Calverley P.M., Jenkins C.R., and Hurd S.S. 2001. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1256-1276.
2. Murray C.J., and Lopez A.D. 1996. Evidence-based health policy - lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274:740-743.
3. Barnes P.J., Shapiro S.D., and Pauwels R.A. 2003. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 22:672-688.
4. Geaonelli S., et al. 2004. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 1:e11.
5. Cosio M.G. 2004. Autoimmunity, T cells and STAT-4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 24:3-5.
6. Tarantini Stewart L., and Voelkel NF. 2008. Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest* 118:394-402.
7. Gleason M., and Padman P. 2003. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity* 19:469-477.
8. Raulet D.H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3:781-790.
9. Ogasawara K., et al. 2003. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18:41-51.
10. Gasser S., Ormlitz S., Beron J.J., and Raulet D.H. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436:1186-1190.
11. Groh V., et al. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445-12450.
12. Groh V., et al. 1999. Recombinant-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6879-6884.
13. Imahiri M., et al. 2005. Expression and role of MICA and MICB on human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* 104:554-561.
14. Teng V., et al. 2002. Binding of Escherichia coli adhesin Nal to CD55 triggers cell surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2977-2982.
15. Bamer S., et al. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.
16. Cosman D., et al. 2001. ULBP4, novel MHC class I-related molecules, bind to CD95 glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123-135.
17. Jia Chaloupey M., et al. 2003. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 305:129-135.
18. Bacca L., et al. 2004. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol* 173:1078-1084.
19. Cerwenka A., et al. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12:721-727.
20. Dieckmuth A., et al. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1:119-126.
21. Cazanavopoulos L.N., Madsenko O.V., Fremont D.H., and Yokoyama W.M. 2002. Currying edge: murine UL16-binding protein-like molecule 1, a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 169:4079-4085.
22. Borchers M.T., Harris N.L., Westfal-Kemper S.C., Vincoli M., and Cosman D. 2006. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L221-L231.
23. Borchers M.T., et al. 2006. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa. *Infect Immun* 74:2578-2586.
24. Tschelar J.W., Lu W., and Whitsett J.A. 2000. Conditional expression of fibroblast growth factor 7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem* 275:11858-11864.
25. Westfal-Kemper S.C., et al. 2008. NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against pseudomonas aeruginosa respiratory infection. *J Immunol* 181:5481-5489.
26. Hatanaka R.D., Kobayashi D.K., Senoz R.M., and Shapiro S.D. 1997. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277:2002-2004.
27. Borchers M.T., et al. 2007. CD8<sup>+</sup> T cells contribute to macrophage accumulation and airway hyperplasia following repeated irritant exposures. *Exp Med Biol* 33:301-310.
28. Hogg J.C., et al. 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350:2645-2653.
29. Verzoy J.H., et al. 2007. Increased granulocyte A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175:464-472.
30. Hogg J.C. 2004. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364:709-721.
31. Finkelstein B., Faxon R.S., Chezo H., and Cosio M.G. 1995. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1666-1672.



- 32 O'Shaughnessy, T.C., Ansari, T.W., Barnes, N.C., and Jeffery, P.R. 1997. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 155:852-857.
- 33 Satta, M., et al. 1999. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160:711-717.
- 34 Mao, J., Ghicci, H., and Conso, M.G. 2001. Lymphocyte populations and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 17:946-953.
- 35 Upphan, J.L., and LeBeau, P.J. 2004. NKG2D mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin Immunol* 14:167-175.
- 36 Duan, S.M., et al. 2005. Interleukin-13 activates human natural killer cells to clear the minimal proto-oncogenes *myeloperoxidase*. *J Infect Dis* 192:1204-1202.
- 37 Takaki, R., et al. 2005. IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism. *J Immunol* 175:2167-2173.
- 38 Song, H., et al. 2006. IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Gef Immunol* 242:39-45.
- 39 Markiewicz, M.A., et al. 2005. Costimulation through NKG2D enhances murine CD8+ CTL function: similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation. *J Immunol* 175:2825-2835.
- 40 Collins, R.W., Stephens, H.A., Chre, M.A., and Vaughan, R.W. 2002. High resolution molecular phenotyping of MICA and MICB alleles using sequence specific primers. *Hum Immunol* 63:783-794.
- 41 Ono, H., Fujimori, K., and Kuroki, T. 2006. Computed-tomography findings of emphysema: correlation with spirometric values. *Chest* 130:1110-1114.
- 42 Marsh, S., et al. 2007. Utility of lung density measurements in the diagnosis of emphysema. *Respir Med* 101:1512-1520.
- 43 Hayakawa, Y., et al. 2002. Cutting edge: cancer rejection mediated by NKG2D receptor ligand interaction is dependent upon perforin. *J Immunol* 169:5377-5381.
- 44 Smith, M.J., et al. 2004. NKG2D recognition and perforin effector function mediates effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 200:1525-1535.
- 45 Chrysofakis, G., et al. 2004. Perforin expression and cytotoxic activity of human CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 125:71-76.
- 46 Maeno, T., et al. 2007. CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol* 178:8090-8096.
- 47 Groh, V., et al. 2001. Costimulation of CD8alpha-beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260.
- 48 Sutherland, C.L., et al. 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 168:671-679.
- 49 Kubin, M., et al. 2001. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL18, activate NK cells. *Eur J Immunol* 31:1428-1437.
- 50 Isenway, C.A., Jr., Jones, B., and Hayday, A. 1988. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol Today* 9:73-78.
- 51 Minematsu, J.A., Ogasawara, K., and Lanier, L.L. 2004. Cutting edge: toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 172:2001-2005.
- 52 Agosti, A., MacNee, W., Donaldson, K., and Conio, M. 2003. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 58:832-834.
- 53 Barnes, P.J., and Conso, M.G. 2004. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med* 1:e20.
- 54 Sullivan, A.K., et al. 2005. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 172:590-596.
- 55 Motez, G.T., et al. 2008. Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *J Immunol* 181:8036-8043.
- 56 Lee, S.H., et al. 2007. Acellular autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 13:567-569.
- 57 Fyghul-Boswick, C.A., et al. 2005. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 177:156-163.
- 58 Borchers, M.T., et al. 2007. CD8(-) T cells contribute to macrophage accumulation and airspace enlargement following repeated irritant exposure. *Eur Mol Pathol* 88:301-310.
- 59 Rice, W.R., et al. 2002. Maintenance of the mouse type II cell phenotype in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L256-L265.
- 60 Iyemba, T.A., et al. 2003. Altered lung structure, composition, and function in a murine model of Hermansky-Rudrak syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L643-L653.
- 61 Gomez, R.F., Shandooofsky, F., Eddleman, D.H., and Bates, J.H. 2001. Respiratory mechanics and lung development in the rat from early age to adulthood. *J Appl Physiol* 90:1631-1638.
- 62 Roca, J., et al. 1998. Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 11:1354-1362.
- 63 Pellegrino, R., et al. 2005. Interoperative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 26:948-968.
- 64 Morris, J.F., Koshi, A., and Johnson, L.C. 1971. Spirometric standards for healthy nonsmoking adults. *Am Rev Respir Dis* 104:57-67.
- 65 Lopez-Fernandez, A., et al. 2001. Micrins as differentiation markers in bronchial epithelium. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma display similar expression patterns. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:22-29.

## 9. Comunicaciones a Congresos

### SEPAR 2007 Barcelona (Comunicación Oral):

**Relaciones entre tabaquismo, infección bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la expresión de las moléculas de stress "MIC-A" en el epitelio bronquial humano.**

**A. Sánchez Font**, V. Curull, A. Ramírez-Sarmiento, C. Coronell, B. Abeijón, B. Casado, J. Gea y M. Orozco-Levi. *Servei de Pneumologia, Servei d'Anatomia Patològica. Hospital del Mar. Universitat Autònoma de Barcelona, CEXS-Universitat Pompeu Fabra. Unidad de Investigación en Músculo y Aparato Respiratorio (URMAR), IMIM, Barcelona.*

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) parece estar asociada a un proceso inflamatorio persistente a nivel pulmonar. Algunos estudios han apuntado al sistema de ligandos NKG2D como desencadenante de la activación de células NK y linfocitos T, inductores y perpetuadores de la inflamación. **Objetivo:** Evaluar la potencial sobreexpresión en el epitelio bronquial humano de las moléculas MIC-A, un potente ligando del receptor NKG2D, y su potencial asociación con la exposición al tabaco, evidencia de infección bronquial y presencia de EPOC. **Métodos:** Se seleccionaron un total de 82 pacientes ( $65 \pm 10$  años) a los cuales se realizó una fibrobroncoscopia diagnóstica. Se estudiaron pacientes nunca-fumadores ( $n = 11$ ), exfumadores ( $n = 29$ ) y fumadores activos ( $n = 42$ ). Un total de 61 pacientes cumplieron criterios funcionales de EPOC. Las biopsias bronquiales se obtuvieron durante la realización de una fibrobroncoscopia y se procesaron mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal específico anti-MIC-A. Se realizó, asimismo, cultivo del broncoaspirado (BAS) en el caso que el paciente presentara signos clínicos o endoscópicos de infección bronquial. **Resultados:** Se detectó expresión de MIC-A en el 57% de los fumadores activos, en el 41% de los exfumadores y estuvo ausente en los nunca-fumadores ( $p < 0.003$ ). Detectamos, asimismo, expresión de MIC-A en un 51% de las muestras de pacientes con EPOC. Mediante un modelo de regresión logística observamos que la expresión de MIC-A se asocia a tabaquismo y a la presencia de EPOC (OR = 2.749; CI95 = 1.069-6.929;  $p = 0.036$ ). Se confirmó la presencia de infección bronquial mediante cultivo *in-vitro* en 17 pacientes de los 82 comprendidos en el estudio (20.7%). No se observó una relación significativa entre infección bronquial y expresión de MIC-A ( $p = 0.12$ ). **Conclusiones:** Este es el primer estudio que demuestra la expresión de MIC-A en el epitelio bronquial de los individuos fumadores (activos y exfumadores), así como en pacientes con EPOC (a pesar de haber cesado el tabaquismo activo). La infección bronquial no justifica la expresión de MIC-A en el epitelio bronquial. Estos hallazgos sugieren que mecanismos autoinmunes subyacen en la perpetuación de la inflamación bronquial en la EPOC.

## **ERS 2007 Stockholm (Thematic Poster):**

### **Expression of MIC molecules in non-neoplastic tissue of patients with primary lung neoplasm: evidence for a whole organ immunostimulatory signal.**

M. Orozco-Levi, **A. Sánchez-Font**, A. Ramírez-Sarmiento, L. Pijuan, A. Gayete, J. Gea, V. Curull. *Servei de Pneumologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; CEXS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; URMAR, Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain; Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; Servei de Radiologia-CRC Mar, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; Facultat de Medicina, Universitat Autònoma, Barcelona, Spain.*

MHC class I related chains (MIC) serve as ligands for the NKG2D-DAP10 receptor complex, which activates NK cells and costimulates effector T cell subsets, and are frequently associated with epithelial tumors. **Aim:** This study was aimed at investigating the potential expression of MIC molecules in non-neoplastic epithelia of humans with and without a primary pulmonary neoplasm. **Methods:** 82 patients (65±10 yrs; FEV<sub>1</sub> range: 21–118%pred.) have been studied. Never smokers (n=11), former smokers (n=29) and current smokers (n=42) were included. 61 (74%) patients accomplished criteria for COPD. Bronchial biopsies from anatomical places far or contralateral from the primary lung neoplasm were obtained during fiberbronchoscopy and processed for immunohistochemistry using monoclonal anti-MIC-A as primary antibodies. A primary lung neoplasm was histopathologically confirmed in 56 (68%) cases. **Results:** MICA was not expressed in samples from never-smokers. However, epithelial MICA expression was evident in contralateral and non-neoplastic tissue. This MICA expression significantly associated with the presence of pulmonary lung neoplasm as assessed by risk estimations (OR:2.9; CI95%: 1.1–8.0; p=0.038) even when adjusting for current cigarette smoking. **Conclusions:** This study shows that MICA proteins (1) are expressed in non-neoplastic human bronchial epithelium and (2) are associated with the presence of pulmonary lung neoplasm. These evidences suggest that MIC ligands are aberrantly expressed in non-neoplastic epithelium of patients with lung cancer.

### **Expression of MIC-A molecules in bronchial epithelium of humans with and without current bacteria infection**

**A. Sánchez-Font**, V. Curull, A. Ramírez-Sarmiento, C. Coronell, L. Pijuan, B. Casado, J. Gea, M. Orozco-Levi. *Servei de Pneumologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; Servei d'Anatomia Patològica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; CEXS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; Unitat D'Investigació en Muscul i Aparell Respiratori (URMAR), IMIM, Barcelona, Spain.*

MIC-A molecules serve as ligands for the NKG2D receptor which activates NK cells and costimulates effector T cell subsets. We have recently found that MIC-A are expressed in human

bronchial epithelium in association with smoking (Orozco-Levi et al., ERJ2006). **Objective:** to evaluate the potential expression of MIC-A in human bronchial epithelium and its potential association current bronchial infection in both COPD and non-COPD patients. **Methods:** 82 patients (65±10 yrs.) submitted to bronchoscopy were included. The study group included never smokers (n=11), former smokers (n=29) and current smokers (n=42). 61 patients fulfilled COPD criteria. Bronchial biopsies were obtained and processed using immunohistochemical techniques with a specific monoclonal anti-MIC-A antibodies. Clinical, bronchoscopic and *in vitro* culture of bronchoaspirate were included as criteria of current respiratory infection. **Results:** MIC-A expression was detected in 57% of current smokers, 41% of former smokers and absent in never-smokers (p<0.003). Bronchial infection was confirmed in 17 patients (20.7%). A clear association between bacterial bronchial infection and current MIC-A expression was not found (p=0.12). **Conclusions:** Epithelial MIC-A expression appears to be not up-regulated by current bronchial bacterial infection in smokers and COPD patients.

#### **ATS 2008 Toronto (Poster Discussion):**

##### **Is soluble MICA facilitating tumor immune evasion in patients with COPD ?**

M. Orozco-Levi, **A. Sánchez-Font**, C. Coronell, A. Ramírez-Sarmiento, J. Gea, V. Curull. *CEXS-Pompeu Fabra University and URMAR-IMIM, Barcelona, Spain; Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; Respiratory Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.*

A common cause of death among patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is lung cancer. Tumor-associated ligands of the activating receptor NKG2D trigger activation of NK cells and co-stimulation of effector T cells, and may thus promote resistance to cancer. However, shedding of these ligands can counter this anti-tumor activity. We asked whether COPD associates with soluble NKG2D ligand shedding even in absence of cancer. **Methods:** Healthy controls (n=19), never smokers (n=11), former smokers (n=53), current smokers (n=13) and COPD (n=61; FEV<sub>1</sub> 39±18%pred.) were eligible. Soluble MICA (sMICA, an NKG2D ligand) in serum (n=80), epithelial MICA in bronchi (n=10) and NKG2D expression in peripheral CD8+ T cells (n=15) were assessed. **Results:** Sera of 63% of the healthy volunteers and 62% of COPD patients contained detectable levels of sMICA (1.7±2.0 vs. 7.3±9.4 ng/ml, respectively; p<0.05). Sera from 26 (42%) COPD patients contained increased sMICA > 10 ng/ml (p<0.05). Increased values of sMICA associated with evidence of local (bronchial) expression of MICA (p=0.035). Expression of NKG2D was decreased to 46±28% of circulating CD8+ T cells (range, 8-85%). Smoking status did not associated differences in sMICA. **Conclusions:** Our study shows that COPD associates with circulating levels of NKG2D ligands and suggests that these ligands may associate with NKG2D receptor downregulation in CD8+ T cells. In consequence, circulating NKG2D ligands could be involved in host tumour susceptibility in patients with COPD.

### ERS 2008 Berlin (Thematic Poster):

#### **Is soluble MICA facilitating tumor immune evasion in patients with COPD ?**

M. Orozco-Levi, **A. Sánchez-Font**, C. Coronell, A. Ramírez-Sarmiento, J. Gea, V. Curull.  
*Department of Respiratory Medicine, Hospital del Mar-IMIM, Universitat Autònoma de Barcelona, CEXS-Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.*

One of the most common causes of death in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is lung cancer. Tumour-associated ligands of the activating receptor NKG2D trigger activation of natural killer cells and co-stimulation of effector T cells, and may this promote resistance to cancer. However, shedding of these ligands can counter this anti-tumour activity. In the present study we asked whether COPD associates with soluble NKG2D ligand shedding even in absence of cancer. **Methods:** 80 patients including healthy controls (n=19), never smokers (n=11), former smokers (n=53) and current smokers (n=13). 61 patients were diagnosed for COPD (FEV<sub>1</sub> 39±18%pred.). ELISA for soluble MICA and NKG2D ligand was performed in serum samples from all patients. In a subset of 10 COPD patients, a flexible bronchoscopy was performed for diagnostic purposes. Bronchial expression of MICA was assessed by immunohistochemistry. Expression of NKG2D in peripheral CD8+ T cells was assessed by flow cytometry in a subset of 15 COPD patients. **Results:** Sera of 63% of the healthy volunteers and 62% of COPD patients contained detectable levels of sMICA (1.7±2.0 vs. 7.3±9.4 ng/ml, respectively; p<0.05). However, sera from 26 (42%) COPD patients contained levels of sMICA > 10 ng/ml. Increased values of sMICA associated with evidence of bronchial expression of MICA (p=0.035). Expression of NKG2D was decreased in 46±28% of circulating CD8 + T cells (range, 8-85%). **Conclusions:** COPD associates with circulating levels of NKG2D ligands and suggests that these ligands may associate with NKG2D receptor downregulation in CD8 + T cells. In consequence, circulating NKG2D ligands could be involved in host tumour susceptibility in patients with COPD.

### SEPAR 2008 Tenerife (Comunicación Oral):

#### **Deterioro de la inmunovigilancia antitumoral en pacientes con EPOC: evidencia de moléculas "MICA" solubles**

M. Orozco-Levi, **A. Sánchez-Font**, C. Coronell, A. Ramírez-Sarmiento, J. Gea, V. Curull.  
*Hospital del Mar, IMAS-IMIM, Universitat Autònoma de Barcelona, CEXS-Universitat Pompeu Fabra, CIBER de Enfermedades Respiratorias, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, EEUU.*

El cancer de pulmón es una de las causas frecuentes de muerte en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se sabe que las células asesinas naturales (natural killer, NK) y los linfocitos T efectores reconocen los ligandos MICA (*major histocompatibility class I chain related molecules A*) a través del receptor NKG2D y de esta forma promueven la resistencia



antitumoral innata. Sin embargo, la liberación de estos ligandos a la circulación sistémica puede contrarrestar esta actividad antitumoral. En ausencia de cáncer, la EPOC se asocia a la expresión de moléculas MICA en el epitelio bronquial. Hemos hipotetizado que si estas moléculas MICA son liberadas a la circulación sistémica, los pacientes con EPOC pueden sufrir un deterioro de la actividad antitumoral innata. **Material y métodos:** La investigación incluyó 80 individuos representados por nunca fumadores (controles, n=11), exfumadores (n= 53), fumadores actuales (n=13), pacientes con función pulmonar normal (n=19) y pacientes con EPOC (n=61; FEV<sub>1</sub> 39±18%pred.). Se realizaron técnicas a múltiples niveles incluyendo la detección de MICA soluble (sMICA) en suero (ELISA), expresión de moléculas MICA en epitelio bronquial (biopsias endoscópicas, inmunohistoquímica) y la expresión del receptor NKG2D en linfocitos T CD8+ circulantes (citometría de flujo multicolor). **Resultados:** La presencia de EPOC se asoció con títulos séricos elevados de sMICA (7.3±9.4 vs. 1.7 ±2.0 ng/ml en controles; p<0.05). En 26 (42%) de los pacientes con EPOC los títulos de sMICA fueron mayores a 10 ng/ml. La presencia de sMICA circulantes estuvo asociada a la presencia de MICA local en el epitelio bronquial (p=0.035). La expresión del receptor NKG2D se encontró disminuida a valores del 46±28% de los linfocitos T CD8+ circulantes (rango, 8-85%). El tabaquismo activo no se asoció con diferencias en los títulos de sMICA. **Conclusiones:** Los pacientes con EPOC presentan ligandos del receptor NKG2D en la circulación sistémica. La traducción biológica es relevante y se expresa como una severa disminución del receptor en las células T CD8+NKG2D+. En consecuencia, las moléculas sMICA circulantes pueden estar involucradas en la susceptibilidad de pacientes con EPOC al desarrollo de neoplasias malignas y su modulación podría representar alternativas terapéuticas novedosas.

### **SEPAR 2009 Santander (Comunicación Oral):**

#### **Moléculas "MICA" y susceptibilidad a la EPOC y Cáncer de Pulmón: "Estudio EMICON"**

M. Orozco-Levi, C. Rodríguez-Rivera, **A. Sánchez-Font**, A. Ramírez-Sarmiento, L. Pijuan, E. Ariola, W. Franco, J. Gea, J. Albanell, V. Curull. *Grupo de Investigación en Lesión, Respuesta Inmune y Función Pulmonar (LIF), IMIM. Servicio de Neumología, Hospital del Mar. CEXS-Universitat Pompeu Fabra. Servicio de Oncología, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona.*

Las células NK son esenciales en la defensa contra el cáncer. Estos linfocitos monitorizan cambios aberrantes como la expresión de moléculas marcadoras de stress celular. Esta función recae sobre el receptor de alarma NKG2D, cuyos ligandos más potentes son las moléculas MICA. Recientemente hemos identificado que el epitelio de fumadores con EPOC puede expresar MICA. La eventual liberación de MICA al suero (MICA soluble, sMICA) podría incrementar la susceptibilidad al cáncer en estos pacientes. El **Objetivo** fue evaluar la expresión de sMICA en suero de pacientes con EPOC y/o neoplasia de pulmón, y su asociación con tabaquismo activo, tipo celular tumoral, y estadio tumoral. **Materiales y métodos:** Estudio prospectivo, caso-control, en pacientes seleccionados desde la Unidad Funcional de Cáncer de Pulmón, Dispensario de

Tabaquismo, y Laboratorio de Funcionalismo Respiratorio del centro. Se realizaron estudios funcionales respiratorios, radiológicos, endoscópicos (según el caso), y análisis de sMICA circulante utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Se han incluido 319 adultos asignados a grupos de: no-fumadores, fumadores sin EPOC, EPOC (fumadores activos y exfumadores), y pacientes con neoplasia pulmonar. En 69 casos se confirmó un cáncer de pulmón (TNM I-IV), y en 4 la presencia de tumores benignos. **Resultados:** Se detectó sMICA circulante 213 pacientes (67%), en un rango de 6-42415 pg/ml). El tabaquismo activo mostró una tendencia estadística a la asociación con sMICA ( $p=0,08$ ). La presencia de cáncer de pulmón (mediana, 4062 vs. 321 pg/ml,  $p=0,000$ ) y la presencia de EPOC (538 vs. 94 pg/ml,  $p=0,000$ ) se asociaron con altas títulos de sMICA, inclusive en aquellos sin tabaquismo activo ( $p=0,000$ ). **Conclusiones:** El presente estudio es el primero en identificar la presencia de sMICA en pacientes con EPOC, y el que con mayor casuística confirma su presencia en pacientes con cáncer de pulmón en diferentes estadios de la enfermedad. Las biopatologías de la EPOC, el cáncer de pulmón y la expresión aberrante de MICA podrían no ser una simple coincidencia, dado que las moléculas sMICA tienen un potente efecto inmunosupresor sobre la vigilancia antitumoral. La persistencia de estas moléculas podría modificar la evolución de la EPOC, incidencia de cáncer en la EPOC, y el pronóstico del mismo.

### **ERS 2010 Barcelona (Comunicación Oral):**

#### **Soluble NKG2D ligand expression associates with smoking, presence of COPD, and presence of lung cancer: The "EMICON" study.**

M. Orozco-Levi, C. Rodríguez Rivera, A. Ramírez-Sarmiento, **A. Sánchez-Font**, M. Polo, L. Pijuan, E. Arriola, J. Gea, J. Albanell, V. Curull, M. T. Borchers. *Grupo de Investigación en Lesión, Respuesta Inmune y Función Pulmonar (LIF), IMIM. Servicio de Neumología, Hospital del Mar. CEXS-Universitat Pompeu Fabra. Servicio de Oncología, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona. University of Cincinnati, United States Of America.*

We recently demonstrated that cigarette smoking induces expression of NKG2D ligands in pulmonary cells (Borchers et al. *J Clin Invest* 2009). The major histocompatibility complex class I-related protein A (MICA) is the most potent of these ligands. Tumour cells of epithelial origin can release MICA from the surface in a soluble form (sMICA) which downregulates the immune receptor NKG2D, thus allowing the tumour to escape immunosurveillance by NKG2D+ cells. In this study, we aimed at examining the association between serums MICA and (1) cigarette smoking, (2) presence of COPD, (3) presence of primary lung cancer and stage, and (4) prognosis (survival). **Methods:** To date, 287 patients were studied ( $68\pm6$  yrs,  $FEV_1 43\pm26\%$ ref.). In controls, sMICA was  $122\pm667$  pg/ml. Among patients categorized according to disease parameters, sMICA exhibit higher levels (in pg/ml) in current smokers ( $709\pm1576$ ,  $p=0,025$ ), COPD ( $674\pm540$ ,  $p=0,019$ ), and primary lung cancer ( $2681\pm7219$ ,  $p=0,000$ ) patients. Overall survival rates were significantly higher for patients with low sMICA levels. Among patients with cancer,

combination of sMICA and tumor-node-metastasis stage was found to be a 30% stronger predictor of survival (OR=3.8, p=0.016) than the TNM staging alone. **Conclusions:** MICA-NKG2D-DAP10 may perpetuate the tisular damage initiated by smoking, and associate with impaired immunosurveillance in smokers and patients with COPD. Serum levels of sMICA may be useful as an prognostic indicator of immunosurveillance mediated by NKG2D ligand in lung cancer.

### **SEPAR 2010 A Coruña (Comunicación Oral):**

#### **Moléculas "MICA" circulantes como marcadores de riesgo de cáncer de pulmón en el momento del análisis: "Estudio EMICON"**

C. Rodríguez-Rivera, **A. Sánchez-Font**, A. Ramírez-Sarmiento, L. Pijuan, E. Arriola, W. Franco, J. Gea, J. Albanell, V. Curull, M. Orozco-Levi. *Grupo de Investigación en Lesión, Respuesta Inmune y Función Pulmonar (LIF), IMIM. Servicio de Neumología, Hospital del Mar. CEXS-Universitat Pompeu Fabra. Servicio de Oncología, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona.*

Recientemente hemos identificado (J Clin Invest, 2009) que las moléculas MICA se expresan en el epitelio de fumadores y pacientes con EPOC. En pacientes con cáncer, la liberación de las moléculas MICA al suero (MICA soluble, sMICA) induce inmunodepresión sistémica y susceptibilidad a la diseminación de la enfermedad. El énfasis de esta susceptibilidad recae sobre el receptor que reconoce MICA (NKG2D) en células NK y linfocitos CD8+ encargados de la inmunovigilancia antitumoral innata. **OBJETIVO:** Evaluar la expresión de sMICA en suero de pacientes fumadores (sin y con EPOC), como marcador de probabilidad de padecer en el momento del análisis una neoplasia de pulmón. **Materiales y métodos:** Se trata de un estudio prospectivo de tipo caso-caso-control en individuos identificados a partir de tres fuentes asistenciales: Unidad Funcional de Cáncer de Pulmón, Dispensario de Tabaquismo, y Laboratorio de Funcionalismo Respiratorio. En todos los casos se realizaron evaluación nutricional, pruebas de funcionalismo respiratorio, radiología, y análisis de sMICA circulante utilizando anticuerpos monoclonales específicos y sándwich-ELISA. En pacientes con diagnóstico de neoplasia de pulmón, se han realizado los baremos diagnósticos según normativas vigentes. **Resultados:** Se han incluido 282 adultos asignados a dos grupos de estudio según la presencia o ausencia de cáncer primario de pulmón, ajustándose el análisis según las variables de tabaquismo o presencia EPOC. En 84 casos se confirmó la presencia de cáncer de pulmón en diferentes estadios (TNM I-IV). La sMICA circulante fue detectada en 174 pacientes, con un amplio rango de valores (1 a >40000 pg/ml). En un análisis transversal, la presencia de sMICA>2000 pg/ml se asoció con el riesgo de malignidad definida como diagnóstico de cáncer de pulmón (OR=2,9; IC95% 1,4-6,2, p=0.006), y su estadío en términos de masa tumoral (T, N) o afectación a distancia (M) (p<0.05). **Conclusiones:** Los títulos de sMICA tienen utilidad diagnóstica (punto de corte 2000 pg/ml) y pronóstica (estadio TNM) en el cáncer de pulmón. Dado que las moléculas sMICA

tienen un potente efecto supresor de la vigilancia antitumoral, permitirían identificar pacientes susceptibles de intervención adicional a través del sistema MICA-NKG2D

### **Cambios en las moléculas “MICA” circulantes de pacientes con exacerbación de la EPOC: ¿un efecto terapéutico de los corticosteroides?**

Ana Barradas, Cristina Rodríguez, **Albert Sánchez-Font**, Ana Mayoral, Maeba Polo, Alba Ramírez-Sarmiento, Joaquim Gea, Víctor Curull, Mauricio Orozco-Levi. *Grupo de Investigación en Lesión, Respuesta Inmune y Función (IMIM) Servicio de Neumología y de Anatomía Patológica, Hospital del Mar; Servicio de Neumología, Hospital Clínico, IDIBAPS Servicio De Cardiología, Laboratorio De Ecocardiografía, Unidad De Hemodinamia, Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM) Universitat Pompeu Fabra CIBER de Enfermedades Respiratorias.*

La desregulación del sistema inmune MICA-NKG2D está involucrado en la patogenia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (J Clin Invest 2009). La liberación de moléculas MICA al plasma (soluble MICA, sMICA) es un evento anormal, deteriora la inmunovigilancia antitumoral, y posiblemente esté involucrada en la susceptibilidad al cáncer epitelial en fumadores. Existe la atractiva posibilidad de que este sistema represente una diana terapéutica novedosa en el tratamiento de la EPOC y cáncer de pulmón. **OBJETIVO:** El presente estudio longitudinal es determinar la presencia de moléculas sMICA circulantes en pacientes con EPOC en fase de agudización de la enfermedad, comparándolas con la fase de estabilidad clínica. **Materiales y métodos:** Se han incluido 31 pacientes (FEV1=43±17 %pred) ingresados bajo diagnóstico de exacerbación de la EPOC, definida según criterios clínicos y gasométricos. Se consideraron como criterios de exclusión las razones sociales, enfermedades autoinmunes o tumorales, y tratamiento con corticosteroides sistémicos o inmunosupresores. Se tomaron muestras de sangre venosa en las primeras 24 h del ingreso, procesadas para la separación de componentes celulares y solubles. Se cuantificó la concentración de sMICA en suero mediante sandwich ELISA, y criterios acordes con la Food and Drug Administration (1998). Una segunda muestra de sangre fue tomada a los 3±1 meses del alta hospitalaria. **Resultados:** El tratamiento de la exacerbación incluyó antibioticoterapia, corticoidoterapia parenteral, oxigenoterapia, y tratamiento broncodilatador. Solo dos pacientes mostraron títulos detectables de sMICA circulante durante la exacerbación. En la fase estable se confirmó la aparición de títulos sMICA en 70% de los casos, con valores de 385±443 pg/ml (estable) vs. 0±0 pg/ml (exacerbación) (p=0,023; figura 1). No se encontró relación lineal dosis-respuesta entre las variables de función pulmonar y los títulos de sMICA. **Conclusiones:** Existe un estereotipo entre la presencia de sMICA circulante y la fase clínica de exacerbación de la EPOC que refleja un aspecto dinámico de la inmunidad innata. Es posible que el sistema MICA-NKG2D sea potencialmente modificable (p.ej., esteroides) con intención terapéutica en pacientes seleccionados con EPOC.



