

26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DE LA DC - CK1 (*Dendritic cell derived C - C Chemokine 1*) EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA Y ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA.

299043

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARTHA LIVIER BUSTOS ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO SEMO



2001



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"EXPRESIÓN DE LA DC-CK1 (Dendritic-cell-derived C-C Chemokine 1)
EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA Y ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA"

realizado por Martha Livier Bustos Espinoza

con número de cuenta 9424344-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Annie Pardo Semo.

Propietario

Dr. Moisés Selman Lama.

Propietario

Dra. Ma. de Lourdes Segura Valdés.

Suplente

M. en C. Martha Montaña Ramírez.

Suplente

Biol. Víctor Ruíz López.

Consejo Departamental de Biología

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIAS

Con cariño a Félix Espinoza Chávez y a Marina Hinojosa Ahumada por haberme mostrado el mundo de las ciencias biológicas desde que yo era pequeña y cuyas explicaciones tan didácticas e interesantes me ayudaron a descubrir mi verdadera vocación.

A Myshy y Maura por sus innumerables travesuras que siempre alegran mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera y por sus consejos.

A mi mejor amigo Luis Arturo Vega Álvarez por apoyarme en los momentos más difíciles.

A la Dra. Annie Pardo Semo, Dr. Moisés Selman Lama, Dra. María de Lourdes Segura Valdez, M. en C. Martha Montaña Ramírez y Biol. Víctor Ruíz López por haberme enseñado las técnicas de biología molecular con las cuales pude realizar la parte experimental de mi tesis y por su paciencia y disposición para resolver mis dudas.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM y en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo la dirección de la Dra. Annie Pardo Semo.

ÍNDICE

	Pag
Resumen.....	1
Introducción.....	3
Quimiocinas.....	3
DC-CK1/CCL18.....	4
Alveolitis alérgica extrínseca.....	11
Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	13
Objetivo.....	15
Hipótesis.....	15
Material y Métodos.....	16
Amplificación del cDNA de DC-CK1/CCL18.....	16
Elaboración de ribosondas (cRNA) sentido y antisentido de DC-CK1/CCL118.....	17
Hibridación <i>in situ</i> con las ribosondas sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE.....	19
Producción del anticuerpo monoclonal anti-DC-CK1/CCL18.....	20

Inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal para DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE.....	21
PCR con iniciadores (primers) para la DC-CK1/CCL18 con cDNA de pulmones sanos y con FPI.....	22
Resultados.....	23
Amplificación del cDNA de DC-CK1/CCL18.....	23
Elaboración de ribosondas (cRNA) sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18.....	23
Hibridación <i>in situ</i> con las ribosondas sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE.....	24
Inmunohistoquímica con el anticuerpo para DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE.....	24
PCR con iniciadores (primers) para la DC-CK1/CCL18 con cDNA de pulmones humanos sanos y con FPI.....	27
Discusión.....	28
Referencias.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Representación esquemática de la organización del gen DC-CK1/CCL18.....	6
2	Modelo tridimensional de la estructura de la DC-CK1/AMAC1/CCL18.....	6
3	Electroforésis en gel de agarosa al 1% que muestra el DNA plasmídico que contiene inserto el cDNA de DC-CK1/CCL18.....	23
4	Hibridación <i>in situ</i> de tejidos de pulmón humano con FPI, AAE y pulmón normal.....	25
5	Inmunohistoquímica de muestras de pulmón humano con FPI, AAE y pulmón normal.....	26
6	Electroforésis en gel de agarosa al 1% que muestra los fragmentos amplificados de la PCR para DC-CK1/CCL18.....	27

EXPRESION DE LA DC-CK1 (Dendritic-cell-derived C-C chemokine 1) EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA Y ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA.

RESUMEN

La presente tesis de licenciatura se enfoca en localizar la expresión de la quimiocina DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmón humano en dos neumopatías intersticiales difusas que son la alveolitis alérgica extrínseca y la fibrosis pulmonar idiopática. La importancia de la quimiocina DC-CK1/CCL18 radica en su capacidad para atraer linfocitos, los cuales tienen un papel fundamental en el desarrollo de las reacciones inflamatorias. Puesto que en la fibrosis pulmonar idiopática y la alveolitis alérgica extrínseca se presentan zonas de inflamación pulmonar donde predominan los linfocitos, resulta importante establecer si la DC-CK1/CCL18 es una de las quimiocinas encargadas del reclutamiento de linfocitos hacia las zonas donde existen lesiones pulmonares al igual que determinar el tipo de células que producen la DC-CK1/CCL18 tanto para la alveolitis alérgica extrínseca como para la fibrosis pulmonar idiopática, con el fin de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos moleculares y celulares que desencadenan el desarrollo de estas enfermedades.

El objetivo de esta tesis fue localizar la expresión de la DC-CK1/CCL18 en pulmones sanos, así como en pulmones afectados por fibrosis pulmonar idiopática y alveolitis alérgica extrínseca, identificando las células que la expresen. Para este propósito, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* con sondas de RNA sentido y antisentido marcadas con digoxigenina, experimentos de inmunohistoquímica con

un anticuerpo monoclonal anti-DC-CK1/CCL18 y PCR con iniciadores para la DC-CK1/CCL18. De la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica se encontró que en ambas enfermedades las principales células responsables de la producción de la DC-CK1/CCL18 eran los macrófagos intersticiales, los cuales muchas veces se encontraban rodeados de linfocitos o muy cerca de cúmulos de linfocitos, también se encontró la expresión de la quimiocina en algunas células dendríticas y esporádicamente en células del epitelio alveolar. En contraste, los experimentos realizados con las muestras de pulmón normal resultaron negativos para ambos experimentos. En el caso de la RT-PCR se encontró la expresión de la DC-CK1/CCL18 tanto para los casos de pulmón normal como los de fibrosis pulmonar idiopática. Mediante este trabajo se pudo comprobar la producción de la DC-CK1/CCL18 en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y alveolitis alérgica extrínseca, por lo que dicha quimiocina podría estar involucrada en el reclutamiento de linfocitos durante la reacción inflamatoria presente en éstas enfermedades.

INTRODUCCIÓN

Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de moléculas de pequeño tamaño (8-14 kDa) relacionadas estructuralmente y que se encargan de regular la quimiotaxis de varios tipos de leucocitos mediante interacciones con receptores transmembranales acoplados a proteína G (1, 28). Estas proteínas quimiotácticas están involucradas en procesos inmunológicos, inflamatorios y reacciones alérgicas (25).

El espectro de acción de las quimiocinas comprende un gran número de leucocitos incluyendo monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos T, B y NK. Por su función, las quimiocinas pueden ser divididas en homeostáticas e inflamatorias, las primeras son aquellas que se expresan constitutivamente en un órgano o tejido, sugiriendo una función específica que involucra la migración celular. Las quimiocinas inflamatorias en contraste están fuertemente reguladas por estímulos inflamatorios o inmunológicos en varios tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, linfocitos T, etc., participando en el desarrollo de las reacciones inmunológicas o inflamatorias (28). Estudios recientes sugieren que la expresión anormal de las quimiocinas desempeña un papel importante en los procesos patológicos como el cáncer, las alergias y las inflamaciones crónicas como psoriasis y asma (7).

A la fecha se han descrito cuatro clases de quimiocinas definidas por el arreglo de los residuos de cisteína conservados en la proteína madura.

a) Quimiocinas de la clase CC. Estas no presentan ningún aminoácido entre la primera y la segunda cisteínas, en general atraen monocitos y linfocitos, aunque también pueden atraer basófilos y/o eosinófilos con una selectividad variable. La mayoría de los genes de estas quimiocinas

se encuentran agrupados en el cromosoma 17q11.2 y se les denomina SCYa por sus siglas en inglés "small secreted cytokine a" (9, 28).

b) Quimiocinas de la clase CXC. Estas tienen un aminoácido entre la primera y la segunda cisteína, generalmente reclutan neutrófilos y la mayoría de sus genes se encuentran agrupados en el cromosoma humano 4q12-13, denominándoseles SCYb (9, 28).

c) Quimiocinas clase C. A la fecha se ha descrito una sola quimiocina llamada linfotactina/SCM-1; ésta proteína carece de la primera y tercera cisteínas, actúa atrayendo específicamente linfocitos y su gen se encuentra en el cromosoma humano 1q23 denominándose SCYc (9, 28).

d) Quimiocinas clase CX₃C. Esta clase también se compone de un solo miembro conocido como fractalcina; presenta 3 aminoácidos entre la primera y la segunda cisteína y su función es guiar la adhesión de las células T y monocitos; el gen de la fractalcina se localiza en el cromosoma humano 16q13 y se denomina SCYd (28).

Dado que en cada clase de quimiocinas la mayoría de sus genes se agrupan en un mismo cromosoma, se sugiere que muchos miembros de esta familia aparecieron por duplicación genética y sufrieron una divergencia posterior (28).

DC-CK1/CCL18

Características del gen, el mRNA y la proteína de DC-CK1/CCL18

La quimiocina DC-CK1 (Dendritic-Cell-Derived C-C Chemokine 1) (1) se conoce también como PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine) (9), AMAC-1 (Alternative Macrophage Activation-Associated CC-Chemikine-1) (11), o MIP-4 (Macrophage Inflammatory Protein-4) (7). Se trata de una quimiocina de la clase CC, que presenta varios nombres pues ha sido estudiada por grupos independientes y cada uno de ellos la ha reportado con un nombre distinto. Con el fin de sistematizar los datos se ha propuesto una nueva clasificación de las quimiocinas, en la cual el nombre que le corresponde a esta quimiocina

se encuentran agrupados en el cromosoma 17q11.2 y se les denomina SCYa por sus siglas en inglés "small secreted cytokine a" (9, 28).

b) Quimiocinas de la clase CXC. Estas tienen un aminoácido entre la primera y la segunda cisteína, generalmente reclutan neutrófilos y la mayoría de sus genes se encuentran agrupados en el cromosoma humano 4q12-13, denominándoseles SCYb (9, 28).

c) Quimiocinas clase C. A la fecha se ha descrito una sola quimiocina llamada linfotactina/SCM-1; ésta proteína carece de la primera y tercera cisteínas, actúa atrayendo específicamente linfocitos y su gen se encuentra en el cromosoma humano 1q23 denominándose SCYc (9, 28).

d) Quimiocinas clase CX₃C. Esta clase también se compone de un solo miembro conocido como fractalcina; presenta 3 aminoácidos entre la primera y la segunda cisteína y su función es guiar la adhesión de las células T y monocitos; el gen de la fractalcina se localiza en el cromosoma humano 16q13 y se denomina SCYd (28).

Dado que en cada clase de quimiocinas la mayoría de sus genes se agrupan en un mismo cromosoma, se sugiere que muchos miembros de esta familia aparecieron por duplicación genética y sufrieron una divergencia posterior (28).

DC-CK1/CCL18

Características del gen, el mRNA y la proteína de DC-CK1/CCL18

La quimiocina DC-CK1 (Dendritic-Cell-Derived C-C Chemokine 1) (1) se conoce también como PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine) (9), AMAC-1 (Alternative Macrophage Activation-Associated CC-Chemikine-1) (11), o MIP-4 (Macrophage Inflammatory Protein-4) (7). Se trata de una quimiocina de la clase CC, que presenta varios nombres pues ha sido estudiada por grupos independientes y cada uno de ellos la ha reportado con un nombre distinto. Con el fin de sistematizar los datos se ha propuesto una nueva clasificación de las quimiocinas, en la cual el nombre que le corresponde a esta quimiocina

es el de CCL18 (28). Durante esta tesis se conservará el nombre de DC-CK1 debido a que fue el primero que recibió esta quimiocina y fue el nombre con el cual se registró esta tesis.

El gen de la DC-CK1/CCL18 se conoce como SCYa18 y se localiza dentro de la región LD78, una de las dos subregiones del grupo de las quimiocinas CC en el cromosoma 17q11.2 (9 y 26). Consta de tres exones y dos intrones y tiene 7.2 Kb de largo debido a que su primer intrón consta de 6.0 Kb (Fig.1) (7, 16 y 26). En la secuencia nucleotídica de DC-CK1/CCL18 se encuentra un polimorfismo en el nucleótido 55, el cual puede ser adenina o citosina (9). El mRNA de DC-CK1/CCL18 consta de 750 pb, presenta un marco abierto de lectura de 267 pb, que codifica para 89 aminoácidos (9, 11 y 7), dentro de los cuales destacan cuatro residuos de cisteína característicos de las quimiocinas CC (9). Los 20 aminoácidos amino terminales presentan todas las características de un péptido señal, de tal manera que la proteína madura comprende 69 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 7855 daltons (Fig. 2) (1, 11 y 7).

La secuencia de aminoácidos para DC-CK1/CCL18 en la región amino terminal es muy diferente a la que presentan otras quimiocinas, aunque en las demás regiones, incluyendo la del péptido señal, tiene una alta similitud con las otras quimiocinas. Dado que la región amino terminal de las quimiocinas es importante para la especificidad celular, la divergencia de dicha secuencia en DC-CK1/CCL18 ha sugerido que ésta quimiocina no comparte su receptor con otras, sino que interactúa con una clase nueva de receptor expresado solo en linfocitos (11 y 26).

Mediante análisis comparativos de la secuencia de aminoácidos se sabe que la DC-CK1/CCL18 presenta el mayor valor de similitud con MIP-1 α seguido de MIP-1 β y por último con RANTES (1, 9 y 11). Estas tres quimiocinas constituyen un grupo claramente separado de otros grupos de quimiocinas de la clase CC (11). Físicamente el gen de DC-CK1/CCL18 se encuentra más próximo al gen de MIP-1 α y análisis bioinformáticos sugieren que el gen de DC-CK1/CCL18 se generó de la

fusión de dos genes tipo MIP-1 α que mediante deleciones, uso selectivo de exónes, así como mutaciones en algunas bases, generaron a DC-CK1/CCL18 como un nuevo gen con funciones distintas a MIP-1 α .

En el genoma del ratón existe solo una copia del gen MIP-1 α y hasta ahora no se ha encontrado la contraparte del gen DC-CK1/CCL18 por lo cual se piensa que éste se originó después de la diversificación de los roedores y los primates. Dado que en el genoma humano existen varias copias del gen MIP-1 α se piensa que el locus que rodea a ese gen es un punto caliente que continuamente produce nuevas familias de genes (26).

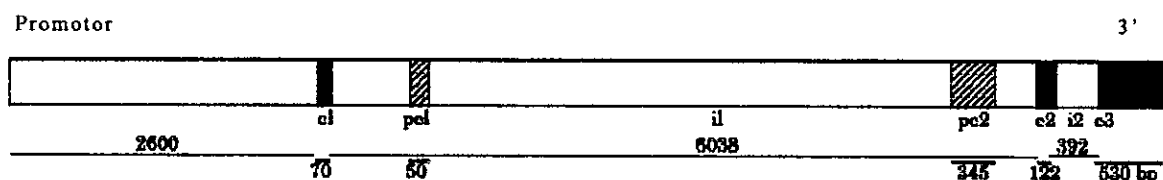


Figura 1. Representación esquemática de la organización del gen DC-CK1/CCL18. Se muestra la región del promotor, los exónes e1, e2 y e3, además de los pseudoexones pe1 y pe2 que se encuentran contenidos en los intrones i1 e i2 respectivamente, así como la región 3' no traducida. Tomado de Politz y Kodelja 2000.

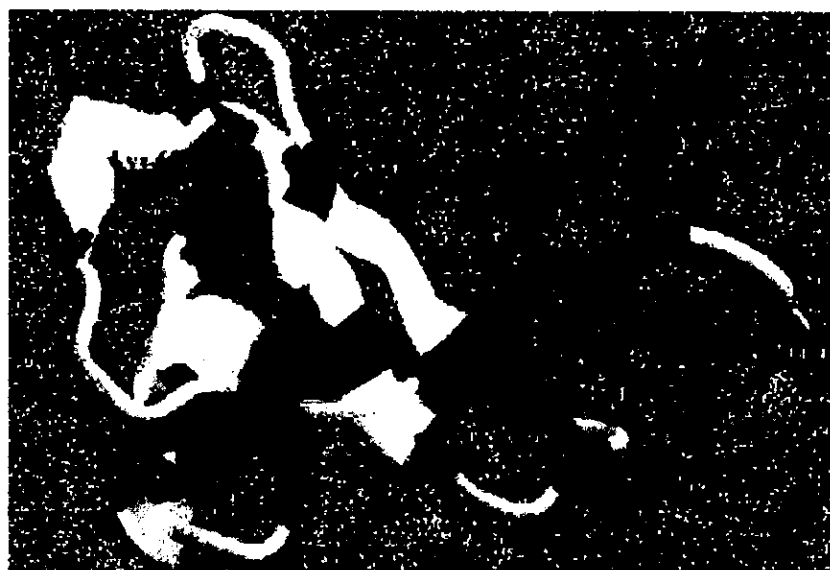


Figura 2. Modelo tridimensional de la estructura de DC-CK1/AMAC1/CCL18. Se muestra en rojo los aminoácidos únicos para la DC-CK1/CCL18 que están involucrados en la interacción ligando-receptor, así como los cuatro residuos de cisteína característicos de las quimiocinas. Tomado de Kodelja y Müller 1998.

Expresión de la DC-CK1/CCL18

1. En tejidos sanos

Se han realizado varias investigaciones con el fin de encontrar el patrón de expresión de la quimiocina DC-CK1/CCL18 en tejidos humanos, los resultados de dichas investigaciones sugieren que el mRNA de la DC-CK1/CCL18 se expresa constitutivamente a altos niveles en pulmón humano, a bajos niveles en tejidos linfoides, timo y apéndice y a niveles marginales en el intestino delgado y la médula ósea (9).

2. En células dendríticas

Varias investigaciones muestran que dicha quimiocina es expresada por células dendríticas que se encuentran en los centros germinales y en áreas de células T en los órganos linfoides secundarios y que el patrón de expresión de esta quimiocina depende del estado de progresión de los centros germinales (1, 9 y 13). Las células dendríticas al expresar la DC-CK1/CCL18 pueden atraer linfocitos B (CD38⁺) de la zona del manto, lo cual sugiere que dicha quimiocina está involucrada en el desarrollo de los centros germinales en los tejidos linfoides, así como en la formación de las células B de memoria (13); igualmente se ha observado que las células dendríticas al expresar la DC-CK1/CCL18 pueden atraer a los linfocitos T CD45RA⁺ (vírgenes).

Puesto que las células dendríticas tienen un papel principal en la iniciación de la respuesta inmunológica, ya que son muy eficientes como células presentadoras de antígeno y muestran habilidad para interactuar y sensibilizar a las células T vírgenes, se ha sugerido que la DC-CK1/CCL18 tiene un papel en la iniciación de la respuesta inmune (1,13 y 28).

3. En células epiteliales

Otros análisis muestran la expresión de la quimiocina DC-CK1/CCL18 en células epiteliales provenientes de lesiones con inflamación crónica, de pacientes con síndrome de Sjogren en fase primaria y secundaria (27). Esto sugiere un mecanismo de reclutamiento de linfocitos para la formación de estructuras tipo linfoides en lesiones de las glándulas salivares encontradas en los pacientes con este síndrome (27).

4. En macrófagos

Experimentos hechos sobre cultivos de monocitos sugieren que el paso de monocito a macrófago o a célula dendrítica es un requisito previo para la expresión de la DC-CK1/CCL18 (1 y 11). En un estudio realizado con placas ateroscleróticas se encontró la expresión de DC-CK1/CCL18 en zonas ricas en macrófagos CD68⁺, alrededor de zonas necróticas y de calcificación. Aunque no todos los macrófagos CD68⁺ la expresaban, su expresión en dichas células sugiere que la DC-CK1/CCL18 puede estar involucrada en los mecanismos de reclutamiento de linfocitos T, que son típicos en las placas ateroscleróticas y se les encuentra en todos los estados de desarrollo (18).

En un estudio realizado con muestras de hígado proveniente de pacientes con hepatitis C crónica se encontró que células mononucleares de la zona porta producían la quimiocina DC-CK1/CCL18. Dado que en la zona porta es donde se encuentra el mayor número de linfocitos T vírgenes y es la zona donde se inicia la respuesta inmune al darse la exposición inicial de los hepatocitos infectados y los linfocitos T, se sugiere que la quimiocina DC-CK1/CCL18 podría estar involucrada en los mecanismos de reclutamiento de dichos linfocitos (12).

Otras investigaciones han detectado la expresión del mRNA de DC-CK1/CCL18 en tejido de pulmón humano normal, en células identificadas morfológicamente como macrófagos alveolares, aunque no todos los macrófagos alveolares fueron positivos (9). Se encontró el

mismo patrón de expresión en células obtenidas de lavados bronquioalveolares de varios donadores, donde solo los macrófagos alveolares, de personas sanas, fumadores y pacientes asmáticos expresaron la quimiocina DC-CK1/CCL18 (11). También se observó que las células U937 tipo macrófago expresaban mRNA de DC-CK1/CCL18 cuando eran estimuladas con PMA (acetato miristato de forbol) (9). Como los macrófagos alveolares son las células no parenquimatosas más abundantes del pulmón (5 a 10 macrófagos por cada linfocito) (6) y desempeñan un papel muy importante en la inflamación pulmonar vía la producción de radicales libres de oxígeno, enzimas y un gran número de citocinas, incluyendo las quimiocinas, que activan otras células inflamatorias, se piensa que la DC-CK1/CCL18 podría estar involucrada en los procesos inflamatorios (9).

4.1 Macrófagos activados alternativamente

En contraste con la activación de macrófagos clásica vía LPS (lipopolisacáridos), IFN- γ e interleucina 12 (IL-12), la activación de macrófagos por agentes como IL-4, IL-10 e IL-13 es clasificada como alternativa (4). Los macrófagos que expresan DC-CK1/CCL18 están activados alternativamente vía citocinas producidas por linfocitos Th2 como la IL-4, aunque también es expresada por células dendríticas derivadas de monocito cuando son cultivadas *in vitro* con citocinas Th2. Sin embargo en las células dendríticas derivadas de monocito el nivel de expresión de DC-CK1/CCL18 es más bajo y decae con la maduración de la célula dendrítica (11), por la estimulación de la célula dendrítica inmadura o cuando se le agrega al cultivo TNF α o CD40L (3). En ambos casos la expresión de DC-CK1/CCL18 puede ser inducida por IL-4 o bien por otras citocinas producidas por linfocitos Th2 como IL-10 e IL-13 y su expresión puede ser inhibida por las citocinas producidas por los linfocitos Th1 como el IFN- γ (11). Mediante métodos bioinformáticos se han localizado a lo largo de la secuencia del gen de

DC-CK1/CCL18 sitios de unión para proteínas potenciadoras de la transcripción (C/EBP) y elementos de unión a factores de transcripción tipo STAT1 y STAT6. La IL-4 induce la unión del factor de transcripción STAT6 que junto con las proteínas potenciadoras promueve la transcripción del gen DC-CK1/CCL18, mientras que el INF- γ induce la unión del factor de transcripción STAT1 que inhibe la transcripción del gen DC-CK1/CCL18. Durante el análisis de la secuencia del gen se encontró un elemento que combinaba un sitio de unión STAT6/STAT1 localizado en la vecindad del sitio de inicio de la transcripción, por lo cual la IL-4 e INF- γ compiten por la unión a este sitio, lo que explica los efectos antagónicos de estas dos citocinas en cuanto a la expresión de la DC-CK1/CCL18 (16).

En general la inducción de macrófagos por IL-4 hace que estos adopten un fenotipo alternativo caracterizado por: una alta capacidad de endocitosis, estimulación de la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena, reducción de secreción de citocinas proinflamatorias y la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (11 y 24); por lo que los macrófagos activados alternativamente están involucrados en la supresión de las reacciones inmunes asociadas a linfocitos Th1 (17). La activación alternativa de macrófagos se presenta en la fase de saneamiento de las reacciones inflamatorias y en enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide (11).

Actividad quimiotáctica de DC-CK1/CCL18

Durante el proceso de inflamación se producen una serie de quimiocinas y moléculas de adhesión que permiten el reclutamiento de células del sistema inmunológico en las zonas afectadas. La quimiocina DC-CK1/CCL18 es quimiotáctica para linfocitos T (CD3⁺) activados y (CD14⁻) no activados, también atrae linfocitos T vírgenes (CD45 RA⁻) (1 y 9), linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ (7), así como linfocitos B

(CD38⁺) (13). Esto sugiere que la DC-CK1/CCL18 está involucrada tanto en la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células (7). Existen distintos tipos funcionales de linfocitos T CD4⁺ facilitadores (Th), el primer tipo son los linfocitos Th1, los cuales ejercen potentes efectos pro inflamatorios, que si se dejan sin control, pueden dar lugar a un daño tisular e inmunopatologías. Las citocinas producidas por los linfocitos Th2 como IL-4, IL-13 e IL-10 tienen importantes funciones antiinflamatorias, por lo tanto una de las principales funciones de los linfocitos Th2 es regular negativamente las respuestas mediadas por los linfocitos Th1 y limitar los efectos de daño tisular (4). Los linfocitos Th2 también promueven la producción de IgE y la función de los eosinófilos, los cuales a su vez juegan un papel en la patogénesis de las reacciones alérgicas (4).

Alveolitis Alérgica Extrínseca (AAE)

La Alveolitis alérgica extrínseca (AAE), también conocida como neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad inflamatoria difusa que afecta al parénquima pulmonar y es provocada por la inhalación repetida de partículas orgánicas (22). Para que se produzca la AAE en un sujeto susceptible es esencial que se inhalen partículas orgánicas menores a 3 μm de diámetro ya que dicho tamaño le permite a las partículas llegar y depositarse en los bronquiolos terminales y alveolos; adicionalmente, algunas de estas partículas son difícilmente digeridas por los macrófagos alveolares, activan la vía alterna del complemento, y/o tienen actividad enzimática lo que incrementa su patogenicidad (5).

En México, la forma más común de AAE es la inducida por la inhalación de proteínas aviarias (15), dichas proteínas hacen que los pacientes se sensibilicen a un amplio rango de antígenos y habitualmente presenten concentraciones elevadas de anticuerpos específicos del tipo IgG, IgM e IgA contra diferentes proteínas que se encuentran en el suero, plumas y excretas de aves (21).

(CD38⁺) (13). Esto sugiere que la DC-CK1/CCL18 está involucrada tanto en la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células (7). Existen distintos tipos funcionales de linfocitos T CD4⁺ facilitadores (Th), el primer tipo son los linfocitos Th1, los cuales ejercen potentes efectos pro inflamatorios, que si se dejan sin control, pueden dar lugar a un daño tisular e inmunopatologías. Las citocinas producidas por los linfocitos Th2 como IL-4, IL-13 e IL-10 tienen importantes funciones antiinflamatorias, por lo tanto una de las principales funciones de los linfocitos Th2 es regular negativamente las respuestas mediadas por los linfocitos Th1 y limitar los efectos de daño tisular (4). Los linfocitos Th2 también promueven la producción de IgE y la función de los eosinófilos, los cuales a su vez juegan un papel en la patogénesis de las reacciones alérgicas (4).

Alveolitis Alérgica Extrínseca (AAE)

La Alveolitis alérgica extrínseca (AAE), también conocida como neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad inflamatoria difusa que afecta al parénquima pulmonar y es provocada por la inhalación repetida de partículas orgánicas (22). Para que se produzca la AAE en un sujeto susceptible es esencial que se inhalen partículas orgánicas menores a 3 μm de diámetro ya que dicho tamaño le permite a las partículas llegar y depositarse en los bronquiolos terminales y alveolos; adicionalmente, algunas de estas partículas son difícilmente digeridas por los macrófagos alveolares, activan la vía alterna del complemento, y/o tienen actividad enzimática lo que incrementa su patogenicidad (5).

En México, la forma más común de AAE es la inducida por la inhalación de proteínas aviarias (15), dichas proteínas hacen que los pacientes se sensibilicen a un amplio rango de antígenos y habitualmente presenten concentraciones elevadas de anticuerpos específicos del tipo IgG, IgM e IgA contra diferentes proteínas que se encuentran en el suero, plumas y excretas de aves (21).

Los pacientes con AAE presentan trastornos en la actividad supresora de la respuesta inmune (19) debido a la disminución de la función supresora antígeno específica, lo que se refleja en la hiperreactividad celular y humoral que caracteriza al desarrollo de este padecimiento (2). La reacción se desarrolla principalmente por una respuesta inmunológica exagerada que ocurre en individuos susceptibles, seguida de la formación de complejos inmunes, lo cual parece desempeñar un papel patogénico en las formas agudas (21). La inflamación es predominantemente mononuclear y está compuesta de linfocitos, células plasmáticas, monocitos y macrófagos (21). En el intersticio, donde la lesión es generalmente más prominente, la célula dominante es el linfocito, mientras que en los espacios alveolares la célula más abundante es el macrófago, el cual se encuentra muy activado, en especial en su función de célula presentadora de antígenos (8). Los linfocitos T predominan sobre los linfocitos B y con relación a las poblaciones de linfocitos T, aquellas identificadas con el marcador $CD8^+$ (supresora/citotóxica) son usualmente más abundantes que las $CD4^+$ (facilitadoras) y entre las subpoblaciones de $CD4^+$ la Th1 predomina sobre la Th2 (21). Entre los mecanismos inespecíficos de daño, destacan la activación de la vía alterna del complemento, y la liberación anormal de citocinas, enzimas proteolíticas y radicales libres de oxígeno, los cuales contribuyen al daño alveolar difuso y la inflamación. (21).

La AAE generalmente afecta al parénquima pulmonar que comprende los bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares, alveolos y espacio intersticial (6); aproximadamente el 30% de los pacientes con esta enfermedad evolucionan hacia la fibrosis intersticial e intraalveolar con la consecuente destrucción del parénquima pulmonar, lo cual resulta fatal para el individuo (15); esta enfermedad también puede afectar a las vías aéreas y provocar bronquitis crónica u obstrucción crónica de las vías aéreas (21).

Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial difusa, con grados variables de inflamación y fibrosis, sin compromiso sistémico y sin datos clínicos, de laboratorio o histológicos que puedan sugerir una etiología. Se trata de una enfermedad crónica, generalmente progresiva y que presenta una expectativa de vida promedio menor a cinco años (21).

La FPI se caracteriza por una proliferación anormal de las células mesenquimáticas, específicamente los fibroblastos y los miofibroblastos, y por la acumulación excesiva de proteínas de matriz, principalmente colágena. Las lesiones se producen por una persistencia fibroproliferativa, tanto en los espacios intersticiales como intraalveolares, además de una acumulación progresiva de proteínas de matriz que distorsionan irreversiblemente la arquitectura del pulmón. El excesivo depósito de colágena es el resultado de un desbalance debido a un incremento en la síntesis y una disminución de la degradación de esta proteína (23).

En la FPI las lesiones se presentan en parches, mostrando diferentes tiempos de evolución, pues en los pulmones se observan áreas inflamadas al lado de otras fibróticas y otras áreas que se ven prácticamente normales (21). Las áreas pulmonares que presentan inflamación difusa intersticial e intraalveolar, se desarrollan debido a la entrada de células inflamatorias a través del torrente sanguíneo, principalmente macrófagos y linfocitos, en donde los linfocitos T CD4⁺ Th2 predominan sobre los Th1. El reclutamiento de células inflamatorias dentro de las áreas dañadas se da por la liberación local de agentes quimiotácticos, y por la producción de algunas moléculas de superficie celular, conocidas como moléculas de adhesión (23).

Existe una gran variedad de factores quimiotácticos involucrados en la expansión de la inflamación tisular, uno de estos factores son las quimiocinas, que parecen participar en el desarrollo de la inflamación

intersticial crónica del pulmón. Estas proteínas quimiotácticas en conjunto con la expresión de moléculas de adhesión, permiten la migración transendotelial de las células inflamatorias a lo largo de los gradientes quimiotácticos establecidos. Una vez dentro del pulmón, tanto las células inflamatorias como las inmunocompetentes son capaces de producir una gran cantidad de mediadores que dañan seriamente las estructuras alveolares (23).

OBJETIVO

- **Analizar la presencia de la quimiocina DC-CK1/CCL18 en tejidos pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y alveolitis alérgica extrínseca (AAE), identificando las células que la expresan.**

HIPÓTESIS

- **Puesto que la quimiocina DC-CK1/CCL18 se produce en los pulmones humanos y se ha visto que tiene propiedades quimiotácticas para ciertas poblaciones de linfocitos, la producción de la DC-CK1/CCL18 podría jugar un papel importante en algún mecanismo de reclutamiento de linfocitos durante el desarrollo de enfermedades pulmonares como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y la alveolitis alérgica extrínseca (AAE).**

MATERIAL Y MÉTODOS

Amplificación del cDNA de DC-CK1/CCL18

Para la amplificación del cDNA de DC-CK1/CCL18 se trabajó con bacterias *E. coli* cepa DH5 α que portaban el plásmido pSPORT 1 de 4109 pb (GIBCO/BRL) con la secuencia de DC-CK1/CCL18 de 750 pb flanqueada por los sitios de restricción para Sal I y Not I (5'--3'), dichas bacterias se crecieron en medio de cultivo sólido Luria Bertani (LB) ampicilina (50 μ g/ml) a 37°C durante 24 horas, después de lo cual se obtuvieron colonias bacterianas, una de las cuales fue crecida en medio líquido LB ampicilina (50 μ g/ml) a 37°C durante 14 horas en agitación, para alcanzar una densidad bacteriana de 1×10^9 células/ml.

Una vez crecidas las bacterias se tomaron 3 ml del cultivo y se centrifugaron para concentrar las bacterias en la pastilla, procediéndose a la extracción del plásmido pSPORT 1 según el protocolo de Minipurificación QIAGEN, que consiste en la resuspensión de la pastilla bacteriana en una solución que contiene RNasa A, seguido de una lisis alcalina con NaOH/SDS en donde el detergente SDS rompe los componentes fosfolipídicos y proteicos de la membrana celular y el NaOH desnaturaliza el DNA cromosomal y las proteínas, la reacción de lisis se detiene agregando acetato de potasio que debido a su contenido de sales precipita el SDS junto con las proteínas, la pared celular y el DNA cromosomal, no así el DNA plasmídico debido a su pequeño tamaño y su estructura circular cerrada covalentemente, que le permiten renaturalizarse y permanecer en solución (20). Después de una centrifugación a 15 000 x g (10 000 rpm) se recuperó el sobrenadante que fue filtrado por una columna de resina de intercambio de aniones QIAGEN previamente equilibrada, permitiendo que el DNA plasmídico se adhiriera a la columna por la alta afinidad de la resina positivamente cargada hacia el DNA, mientras que el RNA degradado, las proteínas y las sales fueron eluidas. Se procedió a lavar la columna

con una solución 1 M de NaCl con el fin de eliminar los contaminantes como restos de RNA, proteínas y carbohidratos. Después de los lavados se procedió a eluir el DNA plasmídico con un buffer que contenía 1.25 M NaCl, el eluido se sometió a una precipitación con isopropanol por centrifugación a 15 000 x g (10 000 rpm) lo cual permitió eliminar sales y concentrar el DNA plasmídico, lavándose la pastilla obtenida con etanol al 70% con el fin de remover los remanentes de sales y centrifugándose de nuevo a 15 000 x g (10 000 rpm) para obtener el DNA plasmídico en la pastilla, la cual se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de buffer TE pH 7.0.

Con el fin de comprobar la concentración del plásmido, su pureza y que éste contuviera el gen DC-CK1/CCL18 se tomaron 4 µl de DNA plasmídico purificado para hacer un análisis con las enzimas de restricción Sal I y Not I, las cuales reconocían un solo sitio de corte que se encontraba cada uno flanqueando la secuencia del gen de DC-CK1/CCL18. Se digirió 1 µl de DNA plasmídico con la enzima Not I, otro microlitro con la enzima Sal I y un microlitro mas de DNA plasmídico se digirió con ambas enzimas, corriéndose después en un gel de agarosa al 1%.

Elaboración de ribosondas (cRNA) sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18

Las ribosondas (sondas de RNA) para DC-CK1/CCL18 fueron preparadas a partir del DNA plasmídico purificado, que contenía la secuencia de DC-CK1/CCL18 y los promotores para las RNA polimerasas T7 y SP6 derivadas de bacteriófagos, una parte del DNA fue linearizado con la enzima Not I y la otra parte con la enzima Sal I, ambas enzimas cortaban una sola vez al plásmido en un sitio que flanqueaba al gen DC-CK1/CCL18 en uno de sus dos extremos.

De las macrodigestiones se obtuvieron dos linearizados del plásmido, dichos linearizados se purificaron mediante la técnica de extracción

con una solución 1 M de NaCl con el fin de eliminar los contaminantes como restos de RNA, proteínas y carbohidratos. Después de los lavados se procedió a eluir el DNA plasmídico con un buffer que contenía 1.25 M NaCl, el eluido se sometió a una precipitación con isopropanol por centrifugación a 15 000 x g (10 000 rpm) lo cual permitió eliminar sales y concentrar el DNA plasmídico, lavándose la pastilla obtenida con etanol al 70% con el fin de remover los remanentes de sales y centrifugándose de nuevo a 15 000 x g (10 000 rpm) para obtener el DNA plasmídico en la pastilla, la cual se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de buffer TE pH 7.0.

Con el fin de comprobar la concentración del plásmido, su pureza y que éste contuviera el gen DC-CK1/CCL18 se tomaron 4 µl de DNA plasmídico purificado para hacer un análisis con las enzimas de restricción Sal I y Not I, las cuales reconocían un solo sitio de corte que se encontraba cada uno flanqueando la secuencia del gen de DC-CK1/CCL18. Se digirió 1 µl de DNA plasmídico con la enzima Not I, otro microlitro con la enzima Sal I y un microlitro mas de DNA plasmídico se digirió con ambas enzimas, corriéndose después en un gel de agarosa al 1%.

Elaboración de ribosondas (cRNA) sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18

Las ribosondas (sondas de RNA) para DC-CK1/CCL18 fueron preparadas a partir del DNA plasmídico purificado, que contenía la secuencia de DC-CK1/CCL18 y los promotores para las RNA polimerasas T7 y SP6 derivadas de bacteriófagos, una parte del DNA fue linearizado con la enzima Not I y la otra parte con la enzima Sal I, ambas enzimas cortaban una sola vez al plásmido en un sitio que flanqueaba al gen DC-CK1/CCL18 en uno de sus dos extremos.

De las macrodigestiones se obtuvieron dos linearizados del plásmido, dichos linearizados se purificaron mediante la técnica de extracción

fenol/cloroformo y precipitación con etanol (20), con el fin de eliminar las enzimas de restricción, sales minerales y proteínas que pudieran interferir en la fabricación de las ribosondas.

La ribosonda sentido (igual en secuencia al mRNA de DC-CK1/CCL18) de 807 pb fue transcrita con el promotor SP6 para la RNA polimerasa derivada del bacteriófago SP6 y la ribosonda antisentido (secuencia complementaria al mRNA de DC-CK1/CCL18) de 796 pb fue transcrita con el promotor T7 para la RNA polimerasa derivada del bacteriófago T7. Durante la transcripción *in vitro* de ambas ribosondas se utilizó para el marcaje digoxigenina-11-UTP, además de ATP, CTP y GTP, así como las RNA polimerasas T7 y SP6, dejándose incubar por dos horas a 37°C. Una vez terminada la transcripción *in vitro* el DNA templete fue digerido con DNasa I libre de RNasa (Boehringer Mannheim) por 15 minutos a 37°C, posteriormente las ribosondas fueron precipitadas con etanol y disueltas en H₂O libre de RNasas, todo lo anterior según el protocolo DIG RNA Labeling (Boehringer Mannheim, Alemania).

El análisis de la calidad de las ribosondas se hizo corriendo una alícuota en un gel de agarosa al 1%. Mientras que la cuantificación de las ribosondas marcadas con DIG-11-UTP se hizo mediante la prueba DIG quantification teststrips según las indicaciones del proveedor (Boehringer Mannheim, Alemania) y que consistió en agregar un microlitro de una dilución 1:5 y 1:25 de cada ribosonda sobre una membrana de nilón cargada positivamente, aplicándose posteriormente un anticuerpo antidigoxigenina-AP y el sustrato para la reacción de color NBT/BCIP, la intensidad de la marca se comparó con una membrana de nilón control que poseía cantidades estandarizadas de 300, 100, 30, 10 y 3 pg de DNA marcado con DIG-11-UTP.

Hibridación in situ con las ribosondas sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE

La hibridación *in situ* se desarrolló de acuerdo al protocolo de Pardo (1996). Se trabajó con cortes de 4 μm de espesor provenientes de tejidos de pulmón humano incluidos en parafina de 7 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI), 9 pacientes con alveolitis alérgica extrínseca (AAE) y dos tejidos de pulmones sanos (obtenidos de biopsias que presentaban zonas sanas), todos los cuales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Dichos cortes fueron desparafinados mediante un tratamiento con xilol, rehidratados con tratamientos de etanol a concentraciones descendientes de 100%, 95% y 50%. Con el fin de hacer más accesible el RNA celular de los tejidos, éstos fueron tratados con 0.2 N HCl para el rompimiento de ribosomas y desproteinizados mediante tratamiento de 1 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K (Sigma Chemical Co., St Lous Mo) para facilitar la penetración de la sonda, posteriormente se trataron los tejidos con 0.25% (v/v) anhídrido acético (Sigma Chemical Co., St Lous Mo) para impedir la unión inespecífica de la sonda a los tejidos por la interacción de ésta con grupos amino libres cargados positivamente. Por último los tejidos se pusieron en buffer de hibridación suplementado con 1 M DTT.

Los tejidos de pulmón humano con FPI, AAE y sanos se dividieron cada uno en cuatro grupos, a un grupo se le colocó la solución de hibridación que contenía la sonda de RNA sentido para DC-CK1/CCL18 marcada con digoxigenina, a otro grupo de tejidos se le agregó la solución de hibridación que contenía la sonda de RNA antisentido para DC-CK1/CCL18 marcada con digoxigenina, a un tercer grupo se le agregó la solución de hibridación sin sonda de RNA (control negativo) y a un cuarto grupo se le agregó la solución de hibridación con una sonda de RNA antisentido para α -actina la cual se sabía que daba positiva en

dichos tejidos (control positivo). Todos los tejidos fueron incubados a 42°C durante toda la noche, después de lo cual se lavaron con SSC, para luego incubarse con un anticuerpo policlonal de oveja anti-digoxigenina acoplado a una fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim Co, Indianapolis IN) durante toda la noche a 4°C. La reacción de color fue revelada por la incubación con el cromógeno Fast-Red/Naphthol AS-Mx (Biomedica Corp, Foster City CA) donde el Naphthol AS-Mx actúa como sustrato para la fosfatasa alcalina y el cromógeno Fast Red se precipita en los sitios donde ocurre la reacción enzimática. Las secciones fueron contrateñidas con 1% de hematoxilina acuosa (Biomedica Corp, Foster City CA) y montadas en Crystal/Mount (Biomedica Corp, Foster City CA).

Producción del anticuerpo monoclonal anti-DC-CK1/CCL18

Se trabajó con hibridomas que producían un anticuerpo monoclonal para la DC-CK1/CCL18 (donado por DNAX, Palo Alto CA), los hibridomas eran resultado de la fusión de linfocitos B de ratones de la línea BALB/c inmunizados con la DC-CK1/CCL18 y células de mieloma de ratones de la línea SP2/0. Los hibridomas se crecieron en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino y 2mM de L-glutamina, además de los antibióticos penicilina 100 u/ml y estreptomina 100 µg/ml, manteniéndose a 37°C en una mezcla gaseosa con 5% de CO₂ en cajas T75, hasta obtener una densidad celular de 2 x 10⁵ células por mililitro. La viabilidad celular fue monitoreada mediante la tinción de una alícuota de células con azul tripano y su posterior conteo en hemocitómetro. Cada tercer día se les cambiaba de medio a las células, mediante una centrifugación de 10 minutos a 1800 rpm a temperatura ambiente, guardando el sobrenadante que contenía el anticuerpo anti DC-CK1/CCL18, el cual se congelaba a -70°C, para posteriormente liofilizarse con el fin de concentrar el anticuerpo y que éste pudiera ser precipitado con sulfato de amonio.

dichos tejidos (control positivo). Todos los tejidos fueron incubados a 42°C durante toda la noche, después de lo cual se lavaron con SSC, para luego incubarse con un anticuerpo policlonal de oveja anti-digoxigenina acoplado a una fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim Co, Indianapolis IN) durante toda la noche a 4°C. La reacción de color fue revelada por la incubación con el cromógeno Fast-Red/Napthol AS-Mx (Biomedica Corp, Foster City CA) donde el Napthol AS-Mx actúa como sustrato para la fosfatasa alcalina y el cromógeno Fast Red se precipita en los sitios donde ocurre la reacción enzimática. Las secciones fueron contrateñidas con 1% de hematoxilina acuosa (Biomedica Corp, Foster City CA) y montadas en Crystal/Mount (Biomedica Corp, Foster City CA).

Producción del anticuerpo monoclonal anti-DC-CK1/CCL18

Se trabajó con hibridomas que producían un anticuerpo monoclonal para la DC-CK1/CCL18 (donado por DNAX, Palo Alto CA), los hibridomas eran resultado de la fusión de linfocitos B de ratones de la línea BALB/c inmunizados con la DC-CK1/CCL18 y células de mieloma de ratones de la línea SP2/0. Los hibridomas se crecieron en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino y 2mM de L-glutamina, además de los antibióticos penicilina 100 u/ml y estreptomina 100 µg/ml, manteniéndose a 37°C en una mezcla gaseosa con 5% de CO₂ en cajas T75, hasta obtener una densidad celular de 2 x 10⁵ células por mililitro. La viabilidad celular fue monitoreada mediante la tinción de una alícuota de células con azul tripano y su posterior conteo en hemocitómetro. Cada tercer día se les cambiaba de medio a las células, mediante una centrifugación de 10 minutos a 1800 rpm a temperatura ambiente, guardando el sobrenadante que contenía el anticuerpo anti DC-CK1/CCL18, el cual se congelaba a -70°C, para posteriormente liofilizarse con el fin de concentrar el anticuerpo y que éste pudiera ser precipitado con sulfato de amonio.

Inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal para DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE

Se trabajó con cortes de 4 μm de espesor provenientes de tejidos de pulmón humano incluidos en parafina de 7 pacientes con FPI, 9 pacientes con AAE y dos tejidos de pulmones sanos (obtenidos de biopsias que presentaban zonas sanas), todos los cuales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los tejidos fueron desparafinados en xilol, rehidratados con etanol en concentraciones descendientes de 100%, 95% y 50% y bloqueados con 3% de H_2O_2 en metanol para eliminar la peroxidasa endógena, seguido por un buffer de citratos 0.1 M pH 6.0 por 5 minutos en horno de microondas con el fin de desenmascarar el antígeno. Los tejidos fueron incubados con un bloqueador universal (Dako, Carpinteria, CA) diluido 1/100 en PBS con el fin de disminuir reacciones inespecíficas entre el tejido y el anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal anti-DC-CK1/CCL18 se aplicó a 7 cortes de tejidos con FPI y 9 cortes de tejidos con AAE, a los cortes elegidos como control negativo de cada uno de los casos se les dejó en bloqueador universal, mientras que a los cortes elegidos como control positivo se les incubó con un anticuerpo que reconocía α -actina, todos los cortes se incubaron a 4°C durante toda la noche. De acuerdo al protocolo de BioGenex los cortes fueron expuestos a un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina biotinilado (BioGenex, San Ramon CA) que reconocía al anticuerpo primario, después de lo cual se agregó una fosfatasa alcalina conjugada con estreptoavidina (BioGenex, San Ramon CA), siendo la estreptoavidina la que reconocía a la biotina, posteriormente para la reacción de color se utilizó como sustrato el 3-amino-9-etil-carbazol o AEC (BioGenex, San Ramon CA) en buffer de acetato que contenía 0.05% de H_2O_2 . Los tejidos fueron contrateñidos con 1% de hematoxilina acuosa (Biomedica Corp, Foster City CA) y montados en SuperMount

(BioGenex, San Ramon CA). Para identificar macrófagos y células dendríticas, secciones consecutivas de los cortes fueron teñidas con los anticuerpos HAM56 (7.5 µg/ml) y S-100 (11 µg/ml) (DAKO, Carpintería CA).

PCR con iniciadores (primers) para la DC-CK1/CCL18 con cDNA de pulmones sanos y con FPI

En la PCR (replicación en cadena de la polimerasa) para la DC-CK1/CCL18 se utilizó una cantidad constante de cDNA para cada una de las muestras, lo cual se hizo con base en la concentración del Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual es un gen constitutivo, por lo que su concentración en condiciones normales es constante. Se utilizaron 4.5 pg de cDNA de 4 casos de pulmones humanos con fibrosis pulmonar idiopática y un caso de pulmón normal, en 25 µl del buffer de reacción que contenía dATP, dTTP, dGTP, dCTP, MgCl₂, Tris-HCl además de la enzima DNA polimerasa TaqGold (Perkin Elmer, Alemania.) y los iniciadores: F1 (primer 5'): 5' TGA CCA CTT CTC TGC CTG ACC AG 3' y R1 (primer 3'): 5' GTT GAA GGG AAA GGG GAA AGG ATG A 3' (GIBCO BRL). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un pretratamiento de 95°C por 10 minutos, seguido de: 95°C por 30 segundos para la desnaturalización: 62°C por 30 segundos para la alineación de los iniciadores: y 72°C por 2 minutos para la síntesis; todo lo anterior durante 35 ciclos, finalmente un solo postratamiento de 72°C por 10 minutos. Con base en la posición que reconocían los iniciadores (primers) en la secuencia para el cDNA de DC-CK1/CCL18 se esperaba obtener un fragmento de 564 pb.

Con el fin de saber la especificidad de la PCR y el tamaño del fragmento amplificado, se tomó una alícuota de cada caso y se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, el cual fue visualizado bajo luz UV. Los productos específicos fueron identificados por su tamaño

(BioGenex, San Ramon CA). Para identificar macrófagos y células dendríticas, secciones consecutivas de los cortes fueron teñidas con los anticuerpos HAM56 (7.5 µg/ml) y S-100 (11 µg/ml) (DAKO, Carpintería CA).

PCR con iniciadores (primers) para la DC-CK1/CCL18 con cDNA de pulmones sanos y con FPI

En la PCR (replicación en cadena de la polimerasa) para la DC-CK1/CCL18 se utilizó una cantidad constante de cDNA para cada una de las muestras, lo cual se hizo con base en la concentración del Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual es un gen constitutivo, por lo que su concentración en condiciones normales es constante. Se utilizaron 4.5 pg de cDNA de 4 casos de pulmones humanos con fibrosis pulmonar idiopática y un caso de pulmón normal, en 25 µl del buffer de reacción que contenía dATP, dTTP, dGTP, dCTP, MgCl₂, Tris-HCl además de la enzima DNA polimerasa TaqGold (Perkin Elmer, Alemania.) y los iniciadores: F1 (primer 5'): 5' TGA CCA CTT CTC TGC CTG ACC AG 3' y R1 (primer 3'): 5' GTT GAA GGG AAA GGG GAA AGG ATG A 3' (GIBCO BRL). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un pretratamiento de 95°C por 10 minutos, seguido de: 95°C por 30 segundos para la desnaturalización: 62°C por 30 segundos para la alineación de los iniciadores: y 72°C por 2 minutos para la síntesis; todo lo anterior durante 35 ciclos, finalmente un solo postratamiento de 72°C por 10 minutos. Con base en la posición que reconocían los iniciadores (primers) en la secuencia para el cDNA de DC-CK1/CCL18 se esperaba obtener un fragmento de 564 pb.

Con el fin de saber la especificidad de la PCR y el tamaño del fragmento amplificado, se tomó una alícuota de cada caso y se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, el cual fue visualizado bajo luz UV. Los productos específicos fueron identificados por su tamaño

con relación a un marcador de peso molecular para DNA (Clontech) que se corrió en el mismo gel.

RESULTADOS

Amplificación del cDNA de DC-CK1/CCL18

Se obtuvieron 2 µg de la amplificación de DNA plasmídico que contenía la DC-CK1/CCL18, éste DNA purificado fue sometido a un análisis con enzimas de restricción y su corrimiento en un gel de agarosa al 1% demostró la integridad del DNA plasmídico, su pureza y que contenía inserto el cDNA de la DC-CK1/CCL18 (Fig. 3).



Figura 3. *Electroforesis en gel de agarosa al 1%, que muestra el DNA plasmídico que contiene inserto el cDNA de DC-CK1/CCL18. Se muestra el marcador de peso molecular lambda(λ), en el carril 1 el DNA plasmídico circular, en el carril 2 la linearización del DNA plasmídico con la enzima Sal I (4859 pb), en el carril 3 la linearización del DNA plasmídico con la enzima Not I (4859 pb) y en el carril 4 la liberación del cDNA de DC-CK1/CCL18 con las enzimas Sal I y Not I, que posea un tamaño de 750 pb.*

Elaboración de ribosondas (cRNA) sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18

Una alícuota de las ribosondas se corrió en un gel de agarosa al 1% pudiéndose visualizar dos bandas de RNA correspondientes al tamaño esperado de 807 y 796 pb, por otra parte con la cuantificación de los riboprobe marcados con DIG-11-UTP utilizando la prueba DIG quantification teststrips (Boehringer Mannheim, Alemania) se obtuvieron 375 pg/µl de RNA marcado con digoxigenina.

con relación a un marcador de peso molecular para DNA (Clontech) que se corrió en el mismo gel.

RESULTADOS

Amplificación del cDNA de DC-CK1/CCL18

Se obtuvieron 2 μ g de la amplificación de DNA plasmídico que contenía la DC-CK1/CCL18, éste DNA purificado fue sometido a un análisis con enzimas de restricción y su corrimiento en un gel de agarosa al 1% demostró la integridad del DNA plasmídico, su pureza y que contenía inserto el cDNA de la DC-CK1/CCL18 (Fig. 3).

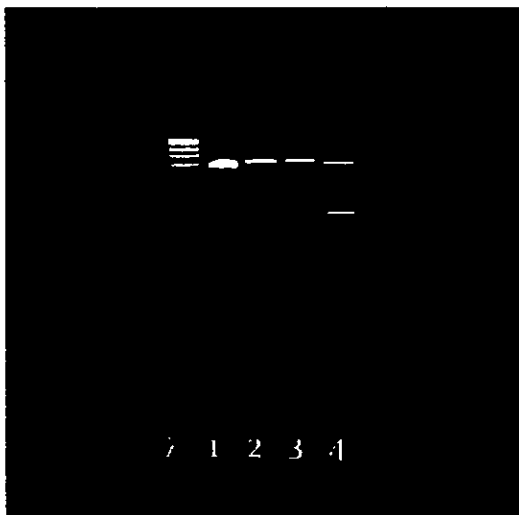


Figura 3. *Electroforesis en gel de agarosa al 1%, que muestra el DNA plasmídico que contiene inserto el cDNA de DC-CK1/CCL18. Se muestra el marcador de peso molecular lambda(λ), en el carril 1 el DNA plasmídico circular, en el carril 2 la linearización del DNA plasmídico con la enzima Sal I (4859 pb), en el carril 3 la linearización del DNA plasmídico con la enzima Not I (4859 pb) y en el carril 4 la liberación del cDNA de DC-CK1/CCL18 con las enzimas Sal I y Not I, que posee un tamaño de 750 pb.*

Elaboración de ribosondas (cRNA) sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18

Una alícuota de las ribosondas se corrió en un gel de agarosa al 1% pudiéndose visualizar dos bandas de RNA correspondientes al tamaño esperado de 807 y 796 pb, por otra parte con la cuantificación de los riboprobos marcados con DIG-11-UTP utilizando la prueba DIG quantification teststrips (Boehringer Mannheim, Alemania) se obtuvieron 375 μ g de RNA marcado con digoxigenina.

Hibridación *in situ* con las sondas sentido y antisentido de DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE

La hibridación *in situ* para los casos AAE y FPI dio positiva tanto para el control positivo que fue tratado con una sonda de RNA antisentido para α -actina, como para el grupo de tejidos que se hibridaron con la sonda de RNA antisentido de DC-CK1/CCL18, en estos últimos las células que dieron reacción positiva para la hibridación fueron en su gran mayoría de tipo macrófago intersticial, aunque también se observaban algunas células del epitelio alveolar. Se observó que la expresión de DC-CK1/CCL18 fue encontrada principalmente en las zonas de inflamación pulmonar severa. En los grupos de tejidos que fueron tratados con la sonda de RNA sentido de DC-CK1/CCL18, el control negativo que no fue tratado con las sondas y el tejido de pulmón normal que fue tratado con sondas sentido y antisentido para DC-CK1/CCL18 no se observó reacción positiva para la hibridación *in situ* (Fig. 4).

Inmunohistoquímica con el anticuerpo para DC-CK1/CCL18 en tejidos de pulmones sanos, con FPI y AAE

Los tejidos de pulmones humanos con AAE y FPI que fueron sometidos a inmunohistoquímica usando como anticuerpo primario una inmunoglobulina anti-DC-CK1/CCL18 dieron positivos para ambos tipos de enfermedades, tiñéndose en específico células inflamatorias intersticiales, que mediante el uso del anticuerpo HAM-56 se identificaron como macrófagos intersticiales, aunque algunas células positivas fueron identificadas con un anticuerpo anti S-100 como células dendríticas. Las células positivas en ambos casos se encontraban frecuentemente rodeadas de linfocitos o cerca de cúmulos de linfocitos y comparativamente se encontraron más células positivas para los casos de AAE que para los casos de FPI (Fig.5). La

inmunohistoquímica fue negativa en el caso de los tejidos de pulmón sano, al igual que los controles negativos incubados con suero no inmune en lugar del anticuerpo primario.

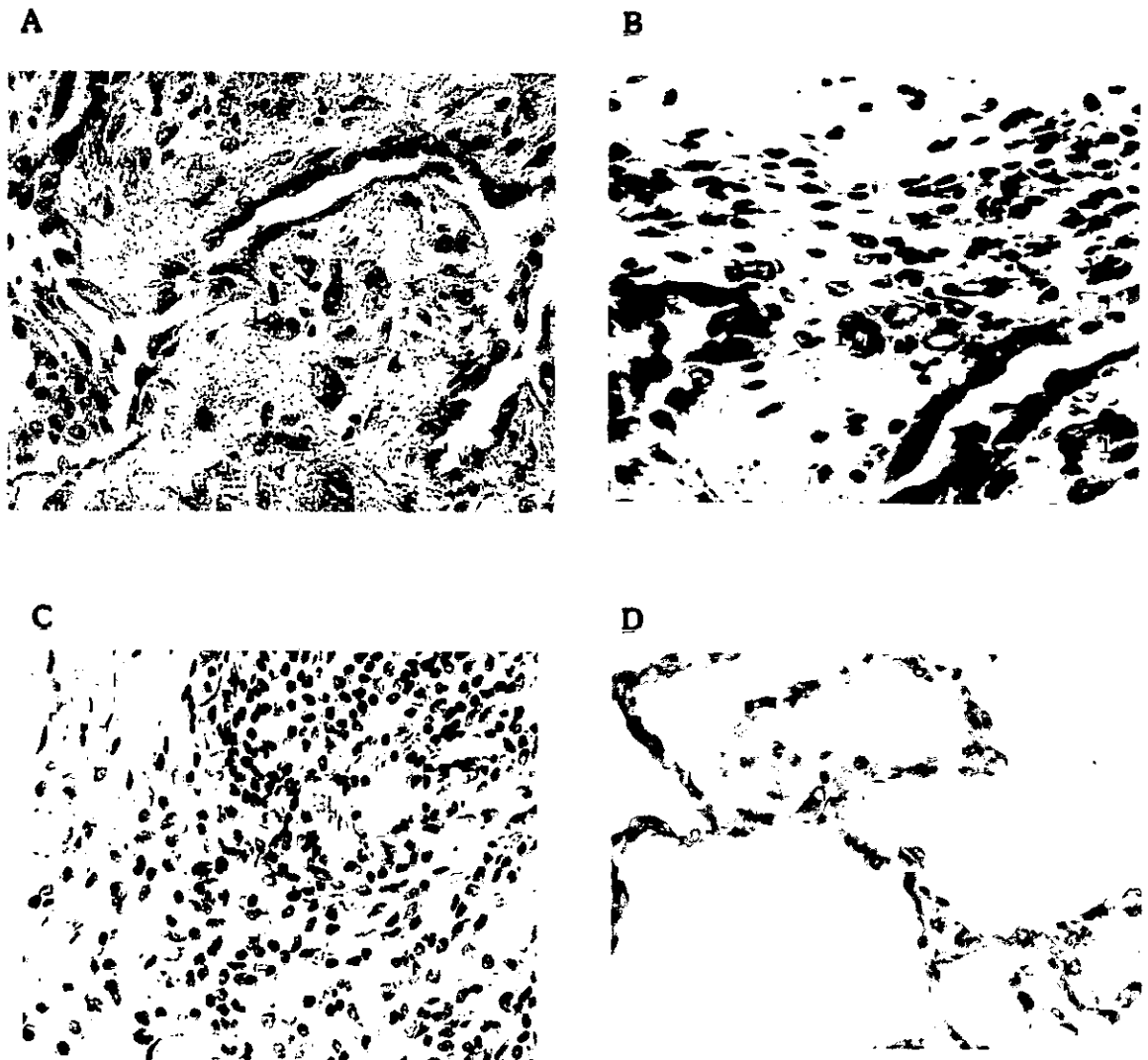


Figura 4. Hibridación *in situ* de tejidos de pulmón humano con FPI, AAE y pulmón normal. Hibridación *in situ* con muestras de FPI (A) y muestras de AAE (B) utilizando una sonda de RNA antisentido para la quimiocina DC-CK1/CCL18, donde se observan de color morado las células que expresan el mRNA de dicha quimiocina, siendo células inflamatorias intersticiales (i) y células del epitelio alveolar (e) probablemente neumocitos tipo 2. C. Muestra control de FPI utilizando una sonda de RNA sentido para la DC-CK1/CCL18, donde se observa que el tejido no presenta células positivas. D. Pulmón sano expuesto a una sonda de RNA antisentido para la DC-CK1/CCL18 donde se muestra que dicho tejido no presenta células positivas. Todas las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina con el fin de contrastar los núcleos.

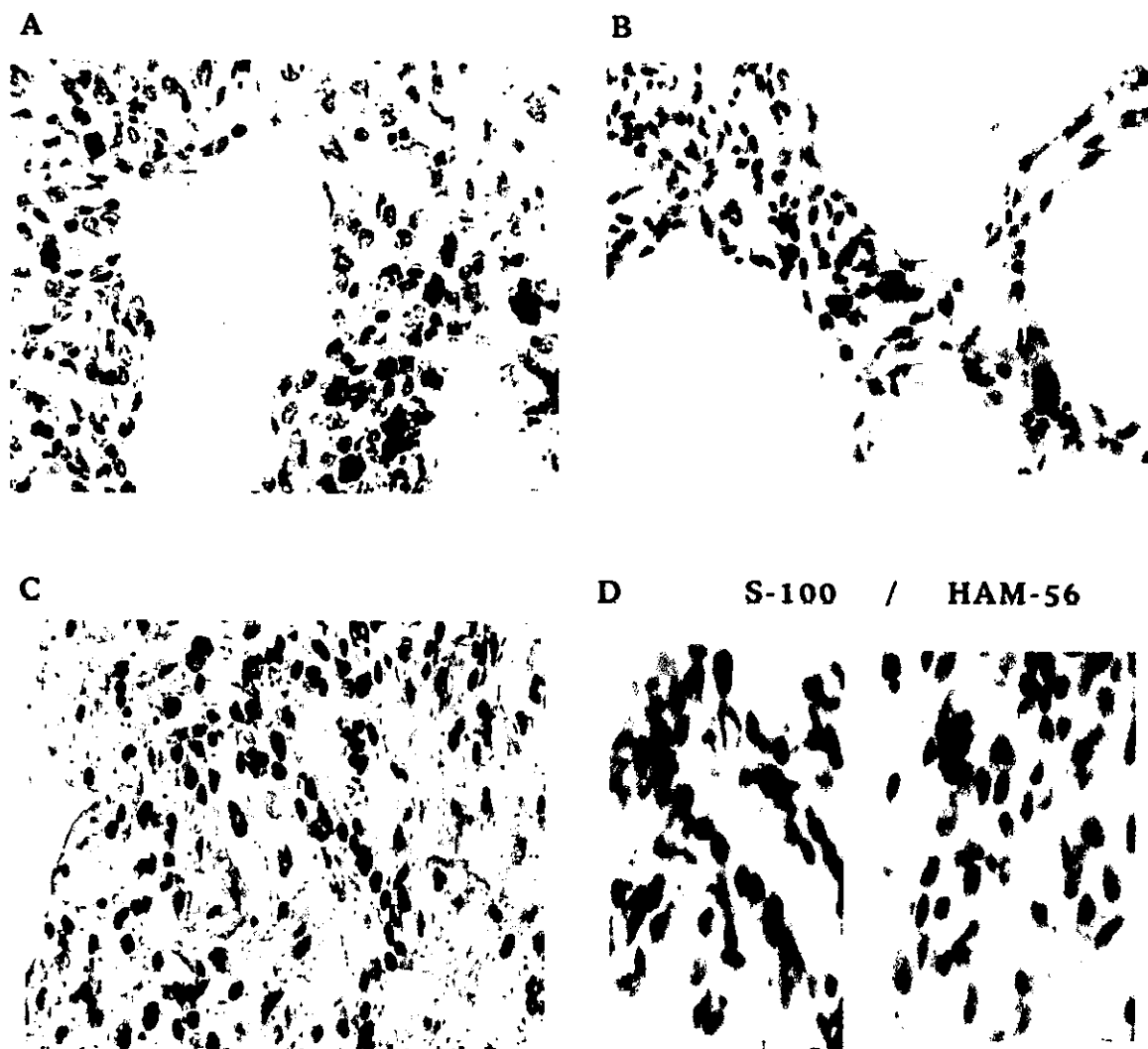


Figura 5. Inmunohistoquímica de muestras de pulmón humano con FPI, AAE y pulmón normal. Inmunohistoquímica de pulmón humano con FPI (A) y con AAE (B) utilizando un anticuerpo monoclonal anti DC-CK1/CCL18 en donde se muestran de color rojo las células que producen esta proteína, siendo macrófagos intersticiales (m) y algunas células dendríticas (d), como se comprueba con la localización de células dendríticas con el anticuerpo S-100 y macrófagos con el anticuerpo HAM-56 (D). También se muestra un tejido control de AAE (C) en el cual se usó suero no inmune, mostrándose que no existen células positivas en el tejido. Todas las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina con el fin de contrastar los núcleos.

PCR con iniciadores (primers) para la DC-CK1/CCL18 con cDNA de pulmones humanos sanos y con FPI

La PCR con iniciadores (primers) para DC-CK1/CCL18 y cDNA de pulmones humanos sanos y con FPI generó un segmento amplificado que se correspondía con el tamaño esperado para el segmento de DC-CK1/CCL18 de 564 pb, según se observa en el gel de agarosa al 1% (Fig. 6), donde también se observa que la PCR fue específica puesto que no aparecen secuencias inespecíficas amplificadas y que tanto en los casos de fibrosis pulmonar idiopática como el caso de pulmón normal se amplificó el fragmento de la DC-CK1/CCL18.

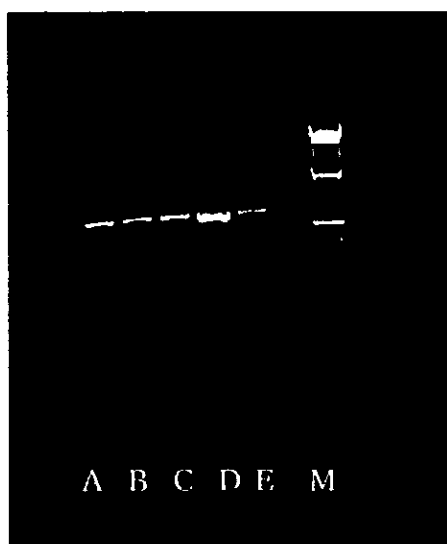


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra los fragmentos amplificados de la PCR para la DC-CK1/CCL18. Se muestran los fragmentos de 564 pb amplificados durante la PCR con iniciadores para la DC-CK1/CCL18 utilizando cDNA de pulmón normal (carril C) y cDNA de pulmones con FPI (carriles A, B, D, E). Se observa que tanto en el pulmón normal como en los pulmones con FPI se expresa el mRNA de la DC-CK1/CCL18.

DISCUSIÓN

La AAE en su etapa avanzada y la FPI son enfermedades pulmonares que hasta ahora no tienen algún tratamiento que pueda curarlas, en parte porque en ninguno de los dos casos se han terminado de entender sus mecanismos patogénicos (21 y 23). En este marco es importante conocer los mecanismos que involucran el tráfico y acumulación de linfocitos T en las lesiones pulmonares típicas de estas enfermedades, para lo cual es necesario entender cuales son las moléculas responsables de atraer por quimiotaxis a las células inflamatorias en el lugar del daño pulmonar.

Dada la importancia de las quimiocinas en el reclutamiento de células inflamatorias, se decidió probar la presencia de la quimiocina DC-CK1/CCL18 en pulmones con AAE y FPI, con el fin de saber si dicha quimiocina estaba involucrada en los mecanismos de reclutamiento de linfocitos T que se presentan en las zonas de inflamación de la FPI (23), así como la AAE que se caracteriza por una acumulación significativa de linfocitos en el parénquima pulmonar (21).

Mediante hibridación *in situ* no se encontró expresión de esta quimiocina en pulmones normales. En contraste, en los pulmones con AAE y FPI se demostró la presencia de numerosas células que expresaban el mRNA de la DC-CK1/CCL18, fundamentalmente células inflamatorias intersticiales y ocasionalmente células del epitelio alveolar. Por inmunohistoquímica se corroboró la presencia de la proteína DC-CK1/CCL18 en estas células inflamatorias intersticiales. Posteriormente, mediante el uso de HAM-56, un anticuerpo que reconoce específicamente macrófagos humanos, pudimos identificar a estas células inflamatorias como macrófagos. Estos hallazgos son similares a los reportados en investigaciones previas que muestran que los macrófagos expresan la DC-CK1/CCL18 tanto en cultivos *in vitro* (1 y

9), como en placas ateroscleróticas (18), y células de lavado bronquioalveolar de fumadores, asmáticos y personas sanas (11).

En nuestro estudio encontramos también que tanto en pulmones con FPI como con AAE la quimiocina DC-CK1/CCL18 se expresaba en algunas células dendríticas, identificadas por su positividad para el anticuerpo anti S-100, lo cual coincide con otras investigaciones en las cuales se ha encontrado que dicha quimiocina es expresada por células dendríticas en los centros germinales y áreas de células T en los órganos linfoides secundarios (1, 9, 13).

Comparativamente al total de células inflamatorias intersticiales que expresaban DC-CK1/CCL18, las células dendríticas productoras de DC-CK1/CCL18 eran escasas. Como se ha demostrado anteriormente solo las células dendríticas derivadas de monocito expresan la quimiocina DC-CK1/CCL18 (1, 11) y en ellas el nivel de expresión de DC-CK1/CCL18 es más bajo y disminuye con la maduración de la célula dendrítica (11), por la estimulación de la célula dendrítica inmadura o cuando está en presencia de $TNF\alpha$ o CD40L (3), lo cual podría explicar el por qué las células dendríticas que expresan DC-CK1/CCL18 en los tejidos de FPI y AAE son escasas con relación a los macrófagos que expresan dicha quimiocina.

Como se mencionó previamente, tanto para las muestras de tejido de AAE como FPI que se sometieron a hibridación *in situ*, se encontró ocasionalmente la expresión del mRNA de la DC-CK1/CCL18 en células del epitelio alveolar, comprobándose dicho fenómeno en algunos tejidos sometidos a inmunohistoquímica con el anticuerpo para DC-CK1/CCL18. Estos resultados parecen concordar con hallazgos reportados en otra investigación que muestra la expresión de la quimiocina DC-CK1/CCL18 en células epiteliales de lesiones con inflamación crónica, de pacientes con síndrome de Sjogren en fase primaria y secundaria (27).

Aunque la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica no son técnicas cuantitativas, en ambos estudios observamos un mayor número de células que expresaban la DC-CK1/CCL18 en los casos de AAE en

comparación con los casos de FPI. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en un análisis realizado con biopsias de pulmón humano de pacientes con FPI y AAE sometidas a PCR cuantitativo en tiempo real, donde la DC-CK1/CCL18 se encontró significativamente sobreexpresada en los casos de AAE en comparación a los casos de FPI y controles (14). En este estudio, las concentraciones del mRNA de la DC-CK1/CCL18 normalizadas con la expresión de ubiquitina fueron de 2085 ± 392 para AAE, 1023 ± 110 para FPI, y 466 ± 94 para el caso de pulmones sanos (14). En conjunto, estos hallazgos parecen apuntar a que la DC-CK1/CCL18 desempeña un papel importante especialmente en el desarrollo de la AAE puesto que se sobreexpresa en esta enfermedad en células inflamatorias y tiene capacidad de atraer por quimiotaxis a los linfocitos, que son típicos en las zonas de inflamación; de igual manera puede estar involucrada en el control de la inflamación vía quimiotaxis de linfocitos a las zonas de inflamación encontradas en los pulmones de pacientes con FPI.

Por el contrario, en nuestro estudio no se encontró expresión de la DC-CK1/CCL18 en los tejidos de pulmón sano ni por hibridación *in situ* ni por inmunohistoquímica. Estos hallazgos son diferentes a resultados obtenidos en investigaciones previas que encuentran la expresión del mRNA de la DC-CK1/CCL18 en macrófagos alveolares de pulmones de personas sanas (9, 11). Sin embargo, también en nuestra investigación los resultados obtenidos por la PCR muestran la expresión de la DC-CK1/CCL18 en cDNA de pulmón normal, lo cual concuerda con los resultados de las investigaciones mencionadas; la discrepancia entre los resultados obtenidos por PCR y los de localización tisular se pueden explicar por el grado de sensibilidad de los experimentos a que fueron sometidas las muestras de pulmón, ya que la PCR es una prueba más sensible en comparación a la hibridación *in situ*. En este contexto, si en pulmón normal se expresa menos el mRNA de DC-CK1/CCL18 será más difícil localizarlo. Este mismo argumento puede explicar que las muestras de pulmón normal sometidas a inmunohistoquímica también

dieran negativas para la DC-CK1/CCL18. Así, la producción de la quimiocina puede ser muy baja en pulmón normal y por lo tanto la prueba no fue lo suficientemente sensible para localizar la quimiocina, o bien, puede existir algún mecanismo de inhibición de la traducción que impide la síntesis de la DC-CK1/CCL18 en las células de los pulmones sanos y que por ello no se pueda encontrar la expresión de dicha quimiocina.

Si bien con este trabajo se demuestra que la quimiocina DC-CK1/CCL18 se expresa principalmente en macrófagos intersticiales, y ocasionalmente en células dendríticas y del epitelio alveolar, tanto en la AAE como en la FPI, hace falta saber el tipo de linfocitos que atraen hacia el pulmón las células que expresan DC-CK1/CCL18. Para esto es necesario que se realicen nuevos experimentos en los que se hagan colocalizaciones de la quimiocina DC-CK1/CCL18 y algún marcador específico que distinga las poblaciones de linfocitos, así como las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ Th1 y Th2 con el fin de entender mejor el papel que desempeña esta quimiocina en el desarrollo de la inflamación típica en la AAE y la FPI.

Aún existen dudas en cuanto a si el efecto de la DC-CK1/CCL18 es proinflamatorio o antiinflamatorio, pues algunos autores sugieren que al ser expresada por macrófagos activados alternativamente Th1-supresores, la función de la quimiocina DC-CK1/CCL18 es la inhibición de los linfocitos Th1 y por ende la inducción de la tolerancia (10). Esta postura parece ser apoyada por los resultados obtenidos por otros investigadores en los que se observa *in vitro* que la expresión de la DC-CK1/CCL18 por parte de las células dendríticas decae con la maduración de la célula (11), por la estimulación de la célula dendrítica inmadura o cuando se le agrega al cultivo TNF α o CD40L (3). En términos generales, estos hallazgos parecen indicar que la expresión de esta quimiocina en las células dendríticas no desempeña un papel importante en la función de dichas células como presentadoras de antígeno y por ende como activadoras de los linfocitos Th1

proinflamatorios. Este concepto es a su vez apoyado por el hecho de que las células de Langerhans epidérmicas (un tipo de células dendríticas) no expresa *in vivo* a la DC-CK1/CCL18 (10) y por la ausencia de expresión de DC-CK1/CCL18 por parte de las células dendríticas en las placas ateroscleróticas, no así en los macrófagos de las mismas (18).

Por el contrario algunos investigadores sugieren que la DC-CK1/CCL18 tiene efectos proinflamatorios ya que es parte del arsenal inmunoestimulador de las células dendríticas durante el desarrollo de las células T vírgenes hacia células Th1 efectoras (1) cuestión que concuerda con la asociación de la expresión de dicha quimiocina por células mononucleares de muestras de hígado con hepatitis C con la infiltración de linfocitos T vírgenes (12). Asimismo, se ha observado una correlación directa entre los niveles de DC-CK1/CCL18 en los casos de AAE y el número de linfocitos en el lavado bronquioalveolar de pacientes con ésta misma enfermedad, lo cual sugiere que la DC-CK1/CCL18 está asociada al desarrollo de la AAE debido al reclutamiento de linfocitos T (14).

Por lo anteriormente citado, no queda claro el efecto de la DC-CK1/CCL18 y hacen falta más experimentos que se enfoquen a analizar las interacciones entre los macrófagos activados alternativamente que expresan DC-CK1/CCL18 y los linfocitos a los que atraen, con el fin de conocer el efecto que los macrófagos causan a dichos linfocitos, ya sea de activación o inhibición de la respuesta inflamatoria.

REFERENCIAS

1. Adema G, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon K y Figdor C. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997; 387: 713-717.
2. Barquin N, Sansores R, Chapela R, Perez-Tamayo R, Selman M. Immunoregulatory abnormalities in patients with pigeon breeder's disease. *Lung* 1990; 168: 103-114.
3. Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, Reichardt V, Möhle R, Kanz L y Brugger W. Generation of Functional Human Dendritic Cells From Adherent Peripheral Blood Monocytes by CD40 Ligation in the Absence of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1998; 92: 4238-4247.
4. D'Ambrosio D, Iellem A, Colantonio L, Clissi B, Pardi R y Sinigaglia F. Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunology Today* 2000; 21: 103-107.
5. Fink JN. Hypersensitivity pneumonitis. *Clin Chest Med* 1992; 13:303.
6. Gaxiola M, Zepeda A, Valdez C. Población celular del pulmón. *Neumología y cirugía de tórax* 1997; 56: 5-28.
7. Guan P, Burghes A, Cunningham A, Lira P, Brissette W, Neote K y McColl S. Genomic Organization and Biological Characterization of the Novel Human CC Chemikine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18. *Genomics* 1999; 56: 296-302.
8. Haslam PL, Parker DJ, Townsend PJ. Increases in HLA-DQ, DP, DR, and transferrin receptors on alveolar macrophages in sarcoidosis and allergic alveolitis compared with fibrosing alveolitis. *Chest* 1990; 97: 651-663.

9. Hieshima K, Imai T, Baba M, Shoudai K, Ishizuka K, Nakagawa T, Tsuruta J, Takeya M, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Opdenakker G, Van Damme J, Yoshie O y Nomiyama H. A Novel Human CC Chemokine PARC that is most homologous to Macrophage-Inflammatory Protein-1 α /LD78 α and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. *The Journal of Immunology* 1997; 159: 1140-1149.
10. Kodelja V, Kraft S, Politz O, Hakij N, Treudler R, Orfanos CE, Bieber T y Goerdt S. Langerhans cells do not express alternative macrophage activation-associated CC chemokine (AMAC)-1. *Res Immunology* 1998; 149: 633-637.
11. Kodelja V, Müller C, Politz O, Hakij N, Orfanos C y Goerdt S. Alternative Macrophage Activation-Associated CC-Chemokine-1, a novel structural homologue of Macrophage Inflammatory Protein 1 α with Th2-Associated expression pattern. *The Journal of Immunology* 1998; 160: 1411-1418.
12. Kusano F, Tanaka Y, Marumo F y Sato C. Expresión of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2000; 80: 415-422.
13. Lindhout E, Vissers JL, Hartgers FC, Huijbens RJ, Scharenborg NM, Figdor CG y Adema GJ. The Dendritic cell-specific cc-chemokine dc-ck1 is expressed by germinal center Dendritic cells and attracts cd38-negative mantle zone b lymphocytes. *J Immunology* 2001; 166: 3284-3289.
14. Pardo A, Smith M, Abrams J, Coffman R, Bustos M, McClanahan T, Grein J, Murphy E, Zlotnik A y Selman M. CCL18/DC-CK1/PARC upregulation in hypersensitivity pneumonitis. *J Leucocyte Biology*. En impresion.
15. Perez-Padilla R, Salas J, Chapela R. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those

- with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 49-58.
16. Politz O, Kodolja V, Guillot P, Orfanos C y Goerdts S. Pseudoexons and regulatory elements in genomic sequence of the α -chemokine, alternative macrophage activation-associated cc-chemokine (AMAC)1. *Cytokine* 2000; 12: 120-126.
 17. Poulter L, Janossy G, Power C. Immunological/physiological relationships in asthma: potential regulation by lung macrophages. *Immunol. Today* 1994. 15: 258-266.
 18. Reape J, Rayner K, Manning C, Gee A, Barnette M, Burnand K y Groot P. Expression and Cellular Localization of the CC Chemokines PARC and ELC in Human Atherosclerotic Plaques. *American Journal of Pathology* 1999; 154: 365-374.
 19. Salvaggio JE. Recent advances in pathogenesis of allergic alveolitis. *Clin Exp Allergy* 1990; 20: 137-145.
 20. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
 21. Selman M. Neumopatías intersticiales difusas. México, D.F. Panamericana. 1997. 65-104.
 22. Selman M, Chapela R, Raghu G. Hypersensitivity pneumonitis: Clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Seminars Resp Med* 1993;14:353-368.
 23. Selman M, Pardo A. Pathogenic mechanisms in the development of diffuse pulmonary fibrosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1996; 29: 1117-1126.
 24. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M y Extron M. Influence of Alternatively and Classically Activated Macrophages on Fibrogenic Activities of Human Fibroblasts. *Cellular Immunology* 2000; 204: 19-28.

25. Sozzani S, Locati M, Allavena P, Van Damme J y Mantovani A. Chemokines: a superfamily of chemotactic cytokines. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26: 69-82.
26. Tasaki Y, Fukuda S, Lio M, Miura R, Imai T, Sugano S, Yoshie O, Hughes A y Nomiyama H. Chemokine PARC Gene (SCYA18) Generated by Fusion of Two MIP-1 α /LD78 α -like Genes. *Genomics* 1999; 55: 353-357.
27. Xanthou G, Polohroins M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P y Moutsopoulos HM. "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 408-418.
28. Zlotnik A y Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127.