



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL  
PÉPTIDO *CDIP-2* DERIVADO DE LA QUIMIOCINA  
CCL13, EN UN MODELO MURINO DE ALERGIA  
PULMONAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:  
ERIKA HAIDE MÉNDEZ ENRÍQUEZ



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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

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.

---

**JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	Prof. Saturnino de León Chapa
<b>Vocal</b>	Prof. Constantino R. López Macías
<b>Secretario</b>	Prof. Eduardo A. García Zepeda
<b>1º. Suplente</b>	Prof. Mónica Heras Chavarria
<b>2º. Suplente</b>	Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia

El presente trabajo fue desarrollado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, en el laboratorio a cargo del Dr. Eduardo A. García Zepeda, perteneciente al departamento de Inmunología.

**ASESOR DEL TEMA**

Dr. Eduardo A. García Zepeda

**SUSTENTANTE**

Erika Haide Méndez Enríquez

---

**DEDICATORIA**

*A mis padres...*

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo A. García Zepeda por su confianza, paciencia, apoyo, por sus valiosas enseñanzas en Inmunología y en mi desarrollo dentro del campo de la investigación.

A la Dra. Teresa Fortoul van der Goes por su valioso apoyo, así como por su crucial contribución en la realización de este trabajo.

A la Dra. Gloria Soldevila por sus enseñanzas y apoyo en la realización de este trabajo, así como en mi formación como investigadora.

A la Dra. Sara Huerta Yépez y a las QFBs Guillermina Baay y Yahaira Meléndez por su contribución durante la realización de este trabajo.

A mis profesores de Inmunología: Prof. Saturnino de León Chapa y al Dr. Constantino R. López Macías, por la revisión y crítica del manuscrito de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio; así como a la QFB Gisela Dupont y al Biólogo Ramses Chávez.

El presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): No de proyecto 42554

---

## ABREVIATURAS

Alum	Hidróxido de Aluminio y Magnesio en emulsión
BSA	Albúmina sérica bovina
CCR	Receptor para quimiocina de la familia CC
CDIP-2	Chemokine Derived Inhibitory Peptide-2
cADN	Ácido desoxiribonucleico complementario
CXCR	Receptor para quimiocina de la familia CXC
CCR	Receptor para quimiocina de la familia CC
DCs	Células dendríticas
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
JAK	Cinasas de Janus
GAGs	Glicosaminoglicanos
HRP	Peroxidasa de rábano
I.P	Administración intraperitoneal
I.T.	Administración intratraqueal
IFN $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LBA	Lavado broncoalveolar
MCP	Proteína quimioatrayente de macrófagos
M-MLVRT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina-Moloney
MPPs	Metaloproteinasas
MTT	Bromuro de 3-(4, dimetiletetrazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OD	Densidad óptica
OVA	Ovo-albúmina
PAS	Ácido Periódico-Shift
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa
SFB	Suero fetal bovino
SSI	Solución salina isotónica
TAE	Solución de tris-acetato-EDTA
TGF- $\beta$	Factor transformante de crecimiento beta
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TCR	Receptor de linfocito T

# ÍNDICE

1.0 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 SISTEMA INMUNE.....	11
1.2 SISTEMA LINFOIDE.....	11
1.3 INMUNIDAD.....	12
1.4 RESPUESTA INMUNE INNATA.....	12
1.5 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	13
1.5.1 Generación de la respuesta inmune adaptativa.....	14
1.5.2 Linfocitos T y la respuesta inmune adaptativa.....	15
1.5.3 Cooperación de los linfocitos B y T CD4+.....	19
1.6 QUIMIOCINAS.....	19
1.6.1 Familia CXC: .....	21
1.6.2 Familia CC.....	21
1.6.3 Familia XC.....	21
1.6.4 Familia CX3C.....	21
1.7 UNIÓN DE LAS QUIMIOCINAS A GLICOSAMINOGLICANOS	
1.8 RECEPTORES DE QUIMIOCINA.....	23
1.9 PAPEL DE LAS QUIMIOCINAS EN EL TRÁFICO LEUCOCITARIO E INFLAMACIÓN.....	25
1.10 INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR.....	28
1.10.1 Alergia.....	28
1.10.2 Alérgenos.....	29
1.10.3 Factores involucrados en el desarrollo de alergia pulmonar.....	30
<b>1.11 GENERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ALÉRGICA PULMONAR.....</b>	<b>31</b>
1.11.1 Generación de anticuerpos IgE. ....	32
1.11.2 Receptores para IgE.....	33
1.12 ETAPA PRIMARIA DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR.....	34
1.12.1 Mediadores inflamatorios involucrados en la etapa primaria de la inflamación alérgica pulmonar.....	34
1.13 ETAPA SECUNDARIA.....	36
1.13.1 Células involucradas en la etapa secundaria del proceso inflamatorio.....	36
1.14 CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR	39
1.14.1 Hiperreactividad bronquial.....	39



1.14.2 Hipersecreción de moco.....	40
1.14.3 Remodelación.....	40
1.14.4 Resolución de la inflamación.....	41
1.15 MEDIADORES INFLAMATORIOS INVOLUCRADOS DURANTE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR.....	41
1.16 QUIMIOCINAS y SU PARTICIPACIÓN EN LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR	44
1.16.1 Quimiocinas CXC y su participación en la inflamación alérgica pulmonar.....	44
1.16.2 Quimiocinas CC.....	45
1.16.3 CCL13 y su importancia en procesos inflamatorios.....	46
1.17 PRINCIPALES RECEPTORES DE QUIMIOCINAS INVOLUCRADOS EN ALERGI A PULMONAR	47
1.18 MODELOS ANIMALES DE INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR.....	48
1.18.1 Modelos de asma alérgica en ratón.....	48
1.18.2 Características de los modelos murinos de inflamación alérgica pulmonar.....	50
2.0 ANTECEDENTES.....	51
3.0 JUSTIFICACIÓN.....	55
4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	55
5.0 HIPÓTESIS.....	55
6.0 OBJETIVO GENERAL.....	55
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
7.0 METODOLOGÍA.....	56
8.0 RESULTADOS.....	60
8.1 EL MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO PRESENTA CARACTERÍSTICAS DE UN PROCESO INFLAMATORIO ALÉRGICO. ....	60
8.2 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 DISMINUYÓ EL NÚMERO DE CÉLULAS PRESENTES EN LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES. ....	62
8.3 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 DISMINUYÓ EL INFILTRADO INFLAMATORIO PERIBRONQUIAL Y PERIVASCULAR Y LA CANTIDAD DE MOCO PRODUCIDA. ....	64
8.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL INFILTRADO INFLAMATORIO PERIVASCULAR Y PERIBRONQUIAL.....	66
8.5 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 MODIFICA LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN EL FLUIDO DE LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES.....	66
8.6 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 NO MODIFICA LOS NIVELES DE IgE E IgG1 24 HORAS DESPUÉS DE SU ADMINISTRACIÓN.....	67

8.7 EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE QUIMIOCINAS EN RATONES TRATADOS CON CDIP-2.....	68
8.8 EXPRESIÓN RELATIVA DE mARN MENSAJERO DE QUIMIOCINAS y CITOCINAS POR PCR TIEMPO REAL.....	69
9.0 DISCUSION.....	70
10.0 CONCLUSIONES.....	79
11.0 APÉNDICES.....	80
.....	81
APÉNDICE I METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES.....	79
APÉNDICE 11 REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	83
APÉNDICE 111 OLIGONUCLEOTIDOS y CONDICIONES DE REACCIÓN.....	86
APÉNDICE IV ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	87
REFERENCIAS.....	89

---

## RESUMEN

Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por el reclutamiento de leucocitos del torrente sanguíneo al tejido dañado. La inflamación es un proceso complejo que depende de la participación de diversos tipos celulares y mediadores solubles. La inhibición del reclutamiento celular representa una de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con inflamación crónica como el asma (1).

Las quimiocinas y sus receptores son las principales moléculas involucradas en el reclutamiento celular durante la homeostasis y el proceso inflamatorio. Participan en procesos de angiogenesis, adhesión, activación y maduración celular, esto mediante la unión a receptores de siete dominios transmembranales, acoplados a proteínas G. Más de 50 quimiocinas y 20 receptores se han descrito hasta el momento y su clasificación se basa en la posición de residuos de cisteína conservados en su secuencia de aminoácidos (2).

Las quimiocinas CC son una subfamilia de quimiocinas involucradas en procesos inflamatorios; activan monocitos, eosinófilos, células dendríticas, basófilos y linfocitos. Dentro de este grupo de quimiocinas se incluyen las quimiocinas CCL2, 7, 8, 13 y 12 o MCPs (Proteínas quimioatrayentes de macrófagos), así como CCL11, 24 y 26; (Eotaxinas) estas quimiocinas aumentan su expresión en procesos inflamatorios (3).

Diversas evidencias validan la propuesta de la generación de terapias basadas en la creación de antagonistas de la función de las quimiocinas y sus receptores. Moléculas que antagonizan receptores de quimiocinas como CCR3, quimiocinas modificadas como CCL5, CCL14 y CCL11 disminuyen el infiltrado celular en modelos murinos de alergia pulmonar (4).

En este trabajo se estudió el efecto *in vivo* de un péptido sintético CDIP-2 (*Chemokine Derived Inhibitory Peptide-2*), derivado de la estructura primaria de la quimiocina CCL13, en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar inducido por OVA; la administración de CDIP-2 disminuyó el infiltrado celular peribronquial y perivascular, la producción de moco y el número de eosinófilos presentes en los lavados bronco alveolares.

La expresión de mRNA, analizada por RT-PCR en tiempo real de receptores de quimiocina CCR2, CCR5 y CCR3 disminuyó de forma significativa en los animales tratados con CDIP-2. Por otro lado

---

la administración de CDIP-2 redujo la expresión de los transcritos para TNF $\alpha$ , e IL-5, además se observó una disminución en suero y en los lavados broncoalveolares de IL-4.

La expresión relativa del mensajero de CCR1 no se modificó de forma significativa después del tratamiento con el péptido esta misma tendencia se observó al analizar por el mismo método quimiocinas como CCL2, CCL11 y CCL12.

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos permiten sugerir que péptidos antagonistas derivados de quimiocinas como CDIP-2, representan una alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias antiinflamatorias.

---

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está compuesto por moléculas solubles, células y tejidos especializados que de forma coordinada impiden la entrada, diseminación y proliferación de patógenos al organismo; además de mantener la tolerancia por lo propio y hacia antígenos inocuos como las bacterias comensales y moléculas presentes en el ambiente. Entre las células que participan en el sistema inmune se encuentran los leucocitos, este conjunto de células son una población heterogénea clasificada en granulocitos y células mononucleares. Otras estirpes celulares como epitelio, endotelio y células musculares participan de forma activa con el sistema inmune al liberar o presentar en su superficie factores requeridos para responder de forma adecuada a un estímulo. Además de los componentes celulares del sistema inmune, existen moléculas solubles las cuales, están encargadas de regular las funciones celulares, mediante la activación de señales intracelulares al unirse a sus receptores específicos (7).

### 1.2 SISTEMA LINFOIDE

Las células que participan en las respuestas inmunes se organizan para formar tejidos y órganos. El sistema linfóide está compuesto por dos grandes grupos de órganos, los primarios o centrales y los secundarios o periféricos. Los órganos linfoides primarios son la médula ósea y el timo. En ellos se desarrollan y se diferencian los linfocitos, dando lugar a células maduras a partir de sus precursores, este proceso es denominado linfopoyesis. En la médula ósea, las células del sistema inmune se originan a partir de las células hematopoyéticas pluripotenciales, las cuales se diferencian a diversos linajes celulares como el linfóide y el mielóide (103).

Los linfocitos B maduran en la médula ósea y en el hígado fetal. En el timo, los timocitos se diferencian en linfocitos T maduros. Los órganos linfoides secundarios son los ganglios linfáticos, el bazo, el tejido linfóide asociado a mucosas y las placas de Peyer en el intestino.

El tejido linfóide asociado a mucosas de sus siglas en inglés: MALT, es una agrupación no encapsulada, situada en la lámina propia y en áreas submucosas del intestino (GALT) y de los aparatos genito-urinario y respiratorio, en este último se denomina BALT y NALT (5).

---

A los ganglios linfáticos llegan linfocitos desde la sangre, antígenos y células dendríticas de tejidos periféricos mediante los conductos linfáticos. Los ganglios linfáticos presentan dos vías: las de entrada o conductos linfáticos aferentes, venas y arterias postcapilares; y la de salida, conducto linfático eferente. Histológicamente pueden distinguirse dos zonas en los ganglios linfáticos la corteza y la médula. La corteza puede dividirse en paracorteza (zona de célula T) y un área superficial de linfocitos B (15).

El bazo filtra la sangre de forma similar a como los ganglios filtran la linfa captando antígenos del torrente sanguíneo, las arteriolas del bazo están rodeadas de linfocitos T y B formando estructuras similares a las presentes en los ganglios linfáticos (6).

La inmunidad se refiere a un estado de resistencia, natural o adquirida, que poseen los individuos a componentes de microorganismos o sustancias, hoy sabemos que la respuesta inmune se da en base al reconocimiento por receptores celulares hacia los antígenos y que de acuerdo al sistema celular utilizado para reconocer al antígeno esta respuesta se clasifica en respuesta inmune innata y adaptativa (7, 8).

El término “antígeno” es usado para definir a moléculas que pueden ser reconocidas por uno o más componentes del sistema inmune, estas pueden ser de diversa naturaleza química: moléculas orgánicas, carbohidratos simples o complejos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (6).

#### **1.4 RESPUESTA INMUNE INNATA**

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa del cuerpo y esta constituida por barreras mecánicas y químicas así como por componentes humorales y celulares; esta mediada por receptores que reconocen estructuras moleculares conservadas, presentes en los patógenos pero no en el organismo huésped, estas moléculas se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) también denominadas moléculas asociadas a microorganismos (MAM's), que representan los blancos de reconocimiento por parte de la respuesta innata, a través de los receptores que reconocen patrones (PRRs). Entre las principales funciones de los PRRs esta la opsonización, activación del complemento, cascadas de coagulación, fagocitosis, apoptosis y cascadas de señalización que llevan a una respuesta pro inflamatoria (9).

---

La respuesta inmune innata pulmonar incluye al moco, los movimientos mucociliares, opsoninas de la familia de las colectinas que interaccionan específicamente con patógenos, moléculas antimicrobianas, células fagocíticas e inmunoglobulinas (5).

Un ejemplo importante de moléculas involucradas con la respuesta inmune innata en pulmón son las proteínas surfactantes (SP), estas son lipoproteínas que reducen la tensión superficial de la interfase líquido-gas en pulmón, sin embargo, también se relacionan con la respuesta inmune innata, en particular SP-A y SP-D, ya que, se unen a carbohidratos presentes en varios patógenos favoreciendo así la fagocitosis de los microorganismos y su eliminación.

**1.5 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA-** La respuesta inmune adaptativa es un sistema de protección presente en vertebrados superiores que provee de una reacción rápida, específica contra patógenos, no está codificada en la línea germinal como la respuesta innata, es transferible e inducible. La respuesta se divide en fase de reconocimiento, de activación, fase efectora y retorno a la homeostasis, con retención de una memoria inmunológica para contactos posteriores con el antígeno. La respuesta humoral adaptativa está constituida por glicoproteínas de la familia de las inmunoglobulinas denominadas anticuerpos (7, 8, 10).

Los anticuerpos son proteínas presentes en el suero y fluidos, pueden encontrarse en forma soluble (anticuerpos) o anclados a la membrana de los linfocitos B (BCR). Cada molécula de anticuerpo está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas conocidas como cadenas pesadas y otras dos cadenas polipeptídicas conocidas como cadenas ligeras, unidas por puentes disulfuro. Tanto las cadenas pesadas como ligeras tienen una región variable y otra conservada. La región variable de los anticuerpos se conoce como fracción de unión al antígeno (Fab), y la región constante se conoce como fracción cristalizable (Fc). Se han descrito cinco clases o isotipos principales de cadenas pesadas  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\epsilon$  y dos de cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ . Las inmunoglobulinas formadas por estos tipos de cadena pesada se denominan IgM, IgD, IgG, IgA e IgE respectivamente y pueden contener cualquiera de los isotipos de cadena ligera. Variaciones dentro de las moléculas de los isotipos IgG e IgA permiten diferenciar cuatro subclases de inmunoglobulinas en humanos IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y dos de inmunoglobulinas IgA (IgA1 e IgA2), en ratón IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (6).

Los *locus* genéticos que codifican las cadenas de inmunoglobulinas presentan diversos segmentos genéticos que se recombinan durante la maduración del linfocito B. Los segmentos variables (V) los

---

cuales representan los dominios de unión al antígeno, los segmentos de unión (J) y los segmentos de diversidad (D) para la cadena pesada de las inmunoglobulinas y la recombinación de los segmentos (J) y (V) para la cadena ligera de la inmunoglobulina (11).

Una vez que el linfocito B madura, expresa en su superficie IgM e IgD, cuando migra a órganos linfoides periféricos y encuentra su antígeno específico vía activación de células T cuyo TCR es específico para el mismo antígeno, los linfocitos B sufren el proceso denominado cambio de clase e hipermutación somática.

El cambio de clase involucra la recombinación genética de los segmentos constantes de la inmunoglobulina, lo cual lleva a la producción de inmunoglobulinas con diferentes funciones efectoras, la hipermutación somática involucra la adición de mutaciones puntuales en la región variable de la inmunoglobulina, que lleva a la producción de anticuerpos de mayor afinidad para unión al antígeno. Aquellos linfocitos B que expresan receptores de mayor afinidad para un determinante antigénico son seleccionados para seguir su desarrollo hacia célula plasmática productora de anticuerpos de mayor afinidad que los receptores originales de membrana de los linfocitos B. La suma total de los anticuerpos que puede generar un individuo se conoce como repertorio de anticuerpos (12, 13).

### ***1.5.1 Generación de la respuesta inmune adaptativa***

Para que una respuesta inmune adaptativa humoral se genere, los antígenos deben ser transportados hacia los órganos linfoides periféricos por células dendríticas o en forma soluble, donde son procesados y presentados en la superficie de estas mismas células, mediante la formación de un complejo denominado MCH/péptido (14). Las moléculas de MHC son glicoproteínas de membrana codificadas por los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), estas moléculas se asocian con péptidos derivados de proteínas procesadas por diferentes rutas intracelulares. Existen dos tipos de moléculas del MHC involucradas en la presentación antigénica, estas moléculas varían en estructura, sitios de expresión y diferentes vías intracelulares de procesamiento del antígeno (15-16).

Las moléculas de clases I (MHC I) unen péptidos de 8-10 aminoácidos, esta interacción ocurre en el retículo endoplasmico, estos péptidos provienen principalmente de la proteólisis de proteínas citosólicas. La proteólisis ocurre en un complejo denominado “proteosoma” que es responsable de la degradación de proteínas nucleares y citosólicas previamente unidas a otra proteína denominada



---

ubiquitina. Las moléculas de clase II unen péptidos de 13-24 aminoácidos que derivan de la proteólisis de proteínas extracelulares, lisosomales o integrales de membrana, involucradas en la vía endocítica, que tiene como último destino el lisosoma. Las células que expresan moléculas de clase II se denominan células presentadoras de antígeno profesionales: DCs, macrófagos y linfocitos B (16, 17).

El complejo molecular MHC/péptido es reconocido por un receptor específico de linfocito T (TCR), que al igual que el BCR de los linfocitos B, es específico para un determinante antigénico y esta especificidad esta determinada por la recombinación de fragmentos génicos particulares, al igual que la producida para la generación del repertorio de anticuerpos. El TCR es un heterodimero de dos cadenas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ , las cuales se encuentran asociadas a la molécula CD3, que esta conformada por tres cadenas peptídicas ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) y una cadena  $\zeta$ . El TCR conformado por las cadenas  $\alpha\beta$  es el tipo de receptor expresado en el 90-95% de los linfocitos T tanto en humano como en ratón, las cuales representan a las subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos y ayudadores (7).

### ***1.5.2 Linfocitos T y la respuesta inmune adaptativa***

Los linfocitos T se dividen en dos grandes subpoblaciones celulares dependiendo de sus funciones efectoras, estas dos clases de linfocitos T pueden distinguirse, por la expresión diferencial de moléculas que se utilizan como marcadores de superficie, nombrando CD4+ y CD8+ a las poblaciones que expresan dichas moléculas. Durante el reconocimiento de antígenos dependientes de célula T, CD4+ se asocia a las moléculas MHC II y las T CD8+ a MHC I (16, 18).

Los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) intervienen en la muerte de células infectadas, y tienen una importante participación en la eliminación de partículas virales y bacterias intracelulares. Los linfocitos T CD4+ se especializan en la activación de otras células, por lo cual se les denomina linfocitos Th, del inglés *helper* (ayudador). Los linfocitos Th CD4+ se dividen en varias subpoblaciones celulares. Las células Th1 que principalmente activan macrófagos y secretan citocinas como:  $IFN\gamma$ , IL-2 y  $TNF\alpha$ , además de determinar el cambio de isotipo de inmunoglobulinas hacia la clase IgG2a en ratón y IgG1 y 3 en humano, estas células expresan receptores de quimiocina como CCR5, CCR1, CCR2 y CXCR3 (6).

En 1986 Tim Mossman y Robert F. Coffman encontraron en ratones la polarización de las células T en Th1 vs Th2, dependiendo del tipo de citocinas que cada población celular produce, las células

---

que producen ambos tipos de citocinas, las denominaron: Th0. Posteriormente se comprobó la regulación cruzada que ejercen esas citocinas al aumentar el desarrollo de su propio tipo celular mientras inhibe el desarrollo y la producción de citocinas del otro tipo celular.

Muy pronto las capacidades inmunoregulatorias de las células Th1 y Th2 se ligaron a múltiples observaciones hechas 30 años antes y registradas por Fundenberg (1967) y Parish en 1972 que indicaban la existencia de una relación inversa entre la Inmunidad celular y la humoral. En 1992 cuando Romagnani encontró esta polarización, en personas con enfermedades crónicas. Hoy en día es aceptada la polarización inmunológica Th1 Vs Th2 y su influencia en diversas situaciones clínicas, sin embargo, se ha descubierto la participación de otras poblaciones celulares como las Th3 y Th17.

Los linfocitos Th2, se relacionan principalmente con la activación de linfocitos B y el desarrollo de respuesta humoral protectora contra patógenos extracelulares y respuestas alérgicas, esta subpoblación se caracteriza por la secreción de: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13. Los linfocitos Th2 favorecen el cambio de isotipo hacia los anticuerpos de la clase IgE e IgG1 en ratón e IgG4 e IgE en humano. Los linfocitos Th2 expresan diferencialmente receptores de quimiocinas como CCR3, CCR4 y CCR8 (19).

Los linfocitos Th17, caracterizados por la producción de IL-17, esta citocina promueve la producción de otras citocinas como IL-6, IL-8, GM-CSF y CCL2 en fibroblastos, células epiteliales y endoteliales. Esta subpoblación de linfocitos Th se ha relacionado con procesos de autoinmunidad e inflamación crónica, y se distinguen por la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t (20, 21).

Otras poblaciones de linfocitos T denominadas células T reguladoras, se distinguen por bloquear la activación y función de otros linfocitos T, por lo que están involucradas en la tolerancia central y periférica. Actualmente se han identificado varios subtipos de células T reguladoras: células reguladoras naturales (N-Tregs), caracterizadas por los marcadores de superficie CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, estas células adquieren el fenotipo regulador durante su diferenciación en el timo. Otra subpoblación de células reguladoras denominadas Treg1 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>), adquieren el fenotipo regulador en periferia, debido a la estimulación por IL-10, citocina que posteriormente producen ellas mismas, además de TGF- $\beta$ . Otra subpoblación de células reguladoras que adquieren este fenotipo supresor en periferia son la subpoblación de linfocitos Th3, estas células se caracterizan por la producción de TGF- $\beta$ , y al igual que las células Treg1 resultan importantes para mantener la tolerancia oral (22).

---

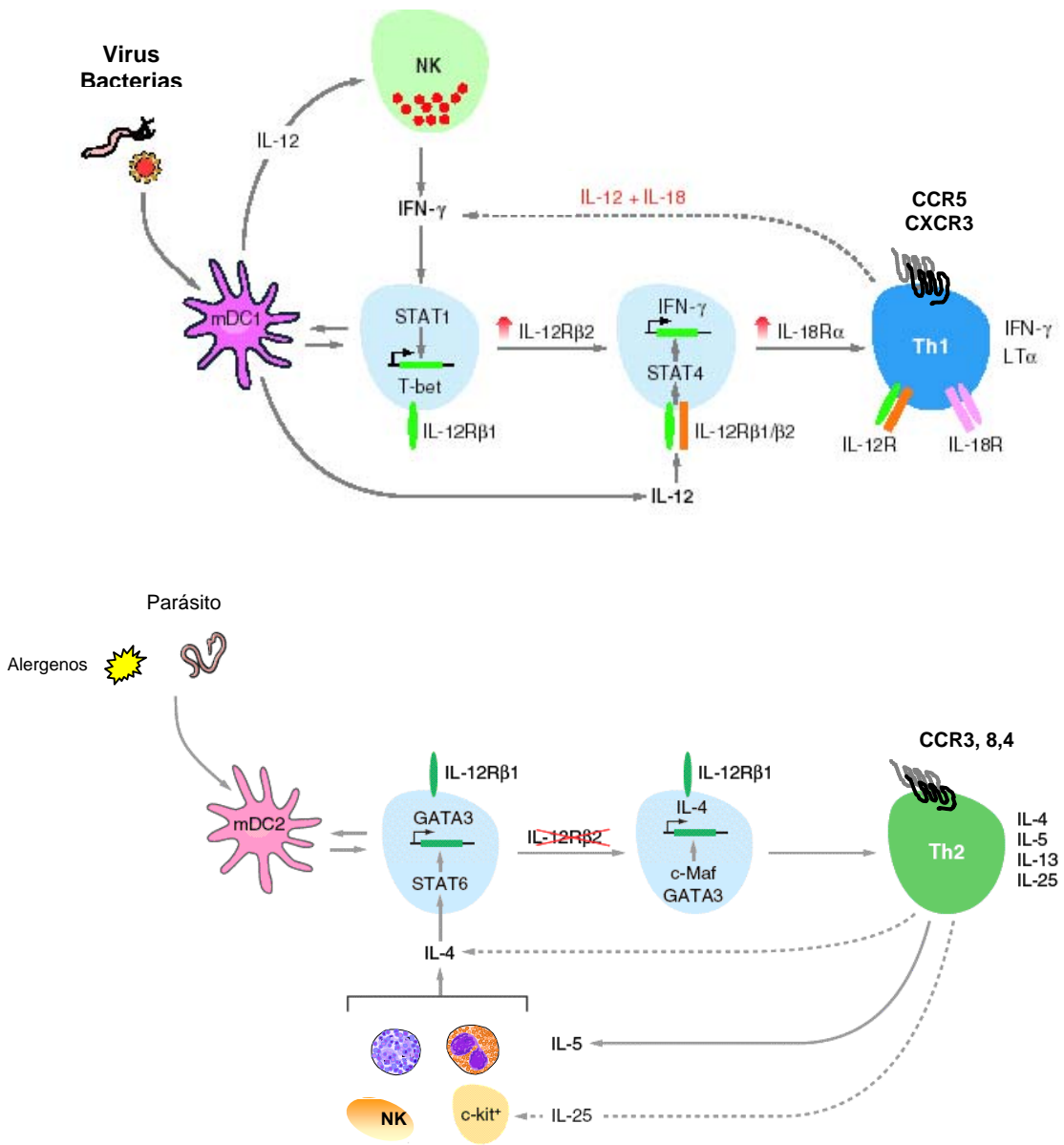
La polarización de las células Th0 hacia un linaje específico, esta determinada por la naturaleza de la estimulación antigénica, así como por las citocinas producidas durante la presentación de antígeno (23).

Se ha demostrado con modelos *in vivo* que subpoblaciones específicas de DCs denominadas DCs plasmocitoides tienen un papel crucial en el establecimiento de tolerancia, esta subpoblación se caracteriza por marcadores de superficie como GR1 y B220, y en su estadio inmaduro induce la generación de células T reguladoras o respuesta tipo Th1 dependiendo del tipo de antígeno. Otra subpoblación definida como células dendríticas mieloides son capaces de inducir una respuesta tipo Th2, estas células presentan un fenotipo maduro con una importante expresión de marcadores de activación y secretan bajas cantidades de IL-12. (24).

Las citocinas que regulan la diferenciación a Th1 o Th2 son IL-12 e IL-4 respectivamente, aunque la presencia o ausencia de otras citocinas puede influir en la diferenciación, por ejemplo en humanos el IFN $\gamma$ , puede inducir la diferenciación a Th1 aun en ausencia de IL-12 y en presencia de IL-4, otras citocinas como TGF- $\beta$ , mantienen a las células en un estado de semiproliferación con la capacidad de producir IL-2, pero sin la adquisición de un fenotipo específico (23).

Los linfocitos que adquieren el fenotipo Th1, requieren para su generación citocinas como IFN $\gamma$  e IL-12 y las proteínas de señalización STAT1 y 4 de sus siglas en inglés (*Signal Transducers and activator –Transcription Factors*), otro marcador característico de esta subpoblación es la expresión del factor de transcripción T-box expresado en las células T (T-bet) (25). IL-12 es requerida para la expresión de STAT4 la cual induce la expresión del gen de IFN $\gamma$  vía T-bet, el IFN $\gamma$  producido vía STAT1 induce T-bet produciendo un ciclo regulatorio de la expresión de citocinas. El interferón secretado por las células Th1 induce la producción de IgGs pero no de IgE por las células B (19).

Las células que adquieren el fenotipo Th2, se caracterizan por presentar factores de transcripción característicos como GATA-3 y c-maf, la activación de estos factores de transcripción resultan en la producción de IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13. La señalización intracelular dada por la IL-4 favorece la activación de STAT6, esto favorece la expresión del factor de transcripción GATA3 que regula su propia expresión, promoviendo además cambios epigenéticos, mediante remodelación en la cromatina, que favorecen la expresión de citocinas Th2 y suprime factores críticos para la expresión de citocinas Th1, como STAT4 y el receptor de la IL-12 (26).



**Fig1.** Modelo de diferenciación hacia los linajes Th1 y Th2 (Modificada de Harrington Et. al, 2007)

---

### ***1.5.3 Cooperación de los linfocitos B y T CD4+***

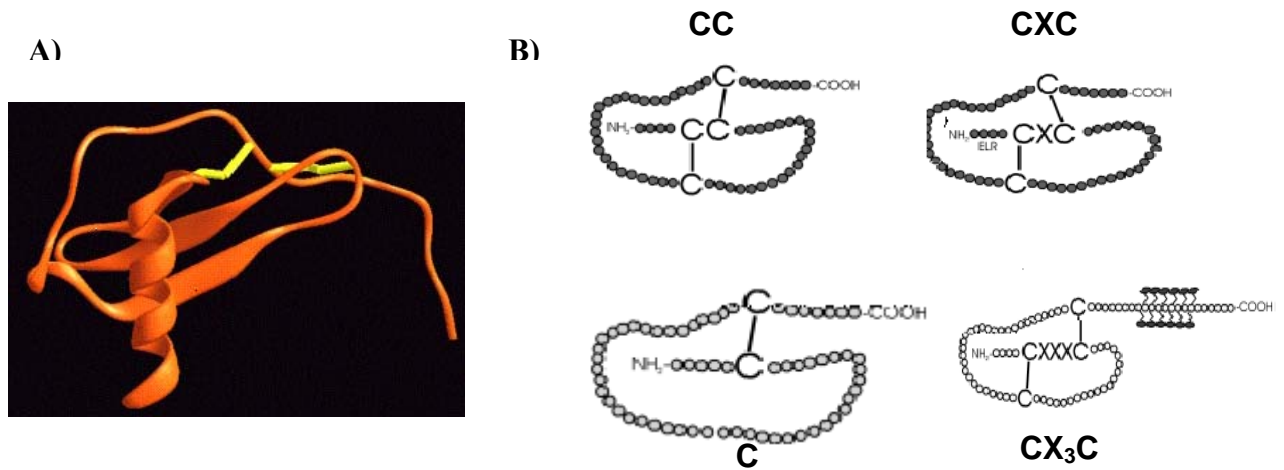
Cuando las características del antígeno no inducen el entrecruzamiento de varias moléculas de inmunoglobulinas, sino que solo comprometen a un receptor IgM, el linfocito B requiere de la cooperación de linfocitos T CD4+ para su activación. En este caso, los antígenos de naturaleza proteica unidos a un receptor IgM son endocitados, procesados y expuestos en la superficie celular por las moléculas MHC II del linfocito B. Este proceso permite iniciar la cooperación entre linfocitos T y B, proceso mediante el cual un linfocito T CD4+ cuyo TCR es específico para ese antígeno, reconoce al antígeno presentado por la célula B, lo que genera una serie de señales intracelulares que llevan a la activación del linfocito B. Estas interacciones ocurren en el ganglio linfático donde los linfocitos B migran hacia la zona T, esto determinado por la expresión de receptores de quimiocinas como CXCR5 y CCR7, lo que permite que las células migren de acuerdo a las quimiocinas expresadas en cada área del órgano linfoide (16).

Las señales intracelulares generadas cuando los receptores para el antígeno reconocen a su ligando, no son suficientes para la activación adecuada del linfocito B y se requiere la participación de moléculas co-receptoras tanto de célula B como T. Las moléculas co-receptoras expresadas por el linfocito B incluyen B 7.1 (CD80) y B 7.2 (CD86) cuyo ligando en célula T es CD28. El linfocito T CD4+ a su vez expresa la molécula co-estimuladora CD40L cuyo ligando en la célula B es CD40. Esta co-estimulación, o segunda señal, es indispensable para la activación mutua, ya que sin ella los linfocitos entran en un estado de anergia. Adicionalmente, la IL-2 secretada por el linfocito T CD4+ induce la activación y proliferación del linfocito B, transformándolo en célula plasmática productora de anticuerpos (27).

## **1.6 QUIMIOCINAS**

Las quimiocinas son un grupo de citocinas que regulan diversos procesos fisiológicos; entre ellos el control de la migración celular, activación de leucocitos, modulación de procesos angiogénicos, regulación del proceso inflamatorio y actividad antimicrobiana. Las quimiocinas son proteínas de un tamaño aproximado entre 8-10 kDa y presentan una homología entre ellas mismas de 20-90% en su secuencia. En su estructura terciaria presentan tres estructuras hojas  $\beta$ -plegada hacia el extremo amino terminal y una  $\alpha$ -hélice cerca del dominio carboxilo terminal. Se dividen en familias de acuerdo a la posición de residuos de cisteína conservados en la secuencia y cercanos al dominio amino terminal en: CC ( $\beta$ -quimiocinas), CXC ( $\alpha$ -quimiocinas), C ( $\gamma$ -quimiocinas), CX<sub>3</sub>C ( $\delta$ -

quimiocinas), la X indica la presencia de un aminoácido cualquiera entre las dos cisteínas. Estas diferencias estructurales también se relacionan con las diferentes funciones biológicas (2).



**Fig 2.** A) Modelo de la estructura terciaria clásica de una quimiocina CCL-2. B) Características estructurales de las diferentes familias de quimiocinas.

Las quimiocinas son producidas por una gran variedad de tipos celulares, algunas en forma constitutiva y otras en respuesta a un estímulo; de esta manera, las quimiocinas suelen ser clasificadas en forma arbitraria en quimiocinas constitutivas y proinflamatorias. Las quimiocinas señalizan a través de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas, una quimiocina puede unirse a diversos receptores de quimiocina, al igual que un receptor de quimiocina puede unir diferentes ligandos, por lo que tienen diversas funciones durante la respuesta inmune inflamatoria, dependiendo del receptor al que se unan y en que célula este expresado el mismo (2). Las quimiocinas originalmente se nombraron en base a su función o con nombres ligados a las circunstancias en que fueron descubiertas. En la actualidad la nomenclatura de las quimiocinas se basa en la clasificación por familias como CCL, CXCL, C y CX<sub>3</sub>CL seguida de un número por ejemplo CCL13 antes MCP-4, CCL11 antes eotaxina, L se refiere a ligando, en la nomenclatura de receptores de quimiocina esta L es sustituida por una R (28).

Las quimiocinas pueden sufrir modificaciones postraduccionales que modifican su actividad biológica y su función. Las modificaciones, son principalmente enzimáticas que resultan en la generación de derivados de quimiocinas con actividades agonistas o antagonistas sobre sus receptores originales, por ejemplo la enzima dipeptidil peptidasa IV (CD26) elimina los primeros dos aminoácidos de CCL5 produciendo la pérdida de actividad de esta quimiocina vía CCR1 pero

---

no CCR5, la modificación que produce CD26 sobre CLL11 produce la desensibilización de CCR3 (2).

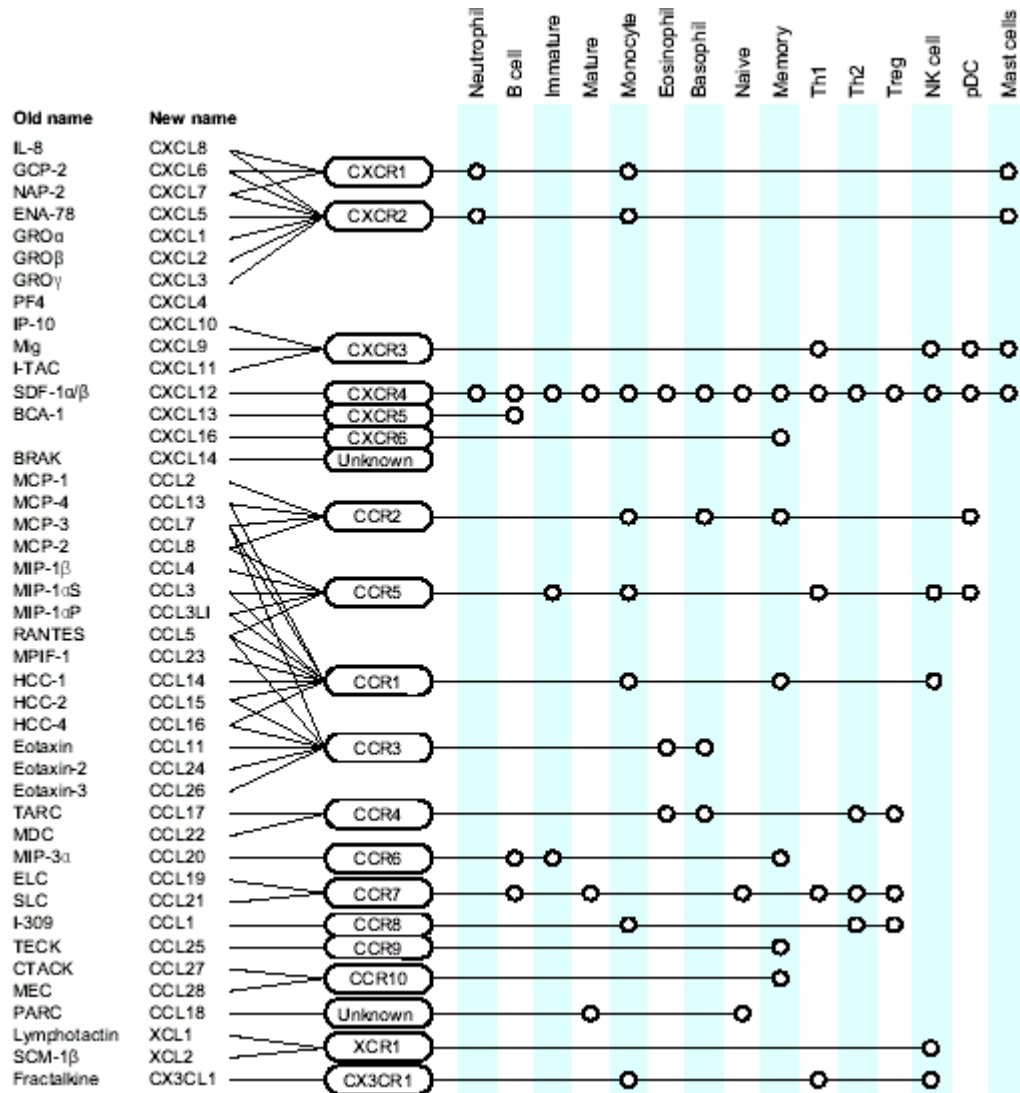
La modificación de la actividad de las quimiocinas, puede ser modulada por la proteólisis en el extremo amino terminal por metaloproteinasas (MMPs). Las quimiocinas de la subfamilia MCP (CCL2, CCL7, CCL8, CCL11 y CCL13) son modificadas por diferentes MMPs produciendo quimiocinas truncadas, que presentan actividad antagonista en modelos *in vivo* de inflamación (29-30).

**1.6.1 Familia CXC:** Estas quimiocinas actúan principalmente sobre granulocitos y se relacionan en forma directa con la inflamación aguda. Esta familia de quimiocinas se subdivide en dos grupos de acuerdo a la presencia o ausencia del motivo denominado ELR (glutamato-leucina-arginina), estos grupos se denominan quimiocinas ELR+ o ELR-. Las quimiocinas ELR + como CXCL8 (IL-8) atraen neutrófilos, y en menor cantidad monocitos, al sitio de inflamación induciendo la exocitosis de gránulos y el estallido respiratorio (31). Mediadores inflamatorios como IL-1, TNF- $\alpha$ , o productos bacterianos como LPS, inducen la producción de quimiocinas ELR+ por células epiteliales. Las quimiocinas de la familia CXC que no contienen el motivo ELR están ligadas con procesos de angiogénesis (32, 33).

**1.6.2 Familia CC.-**Las quimiocinas de la familia CC son funcionalmente diversas y en general se caracterizan por ser quimioatrayentes de monocitos, linfocitos T, células dendríticas, eosinófilos y basófilos. Las quimiocinas de esta familia participan en la respuesta que se produce durante la inflamación, además de controlar el reclutamiento celular activan a las células presentes en el infiltrado, induciendo así el daño local del tejido. Quimiocinas como CCL19, CCL21 están involucradas en la migración de células dendríticas a ganglios linfáticos donde se da la presentación de antígeno a linfocitos T (25).

**1.6.3 Familia XC-**Esta familia esta conformada por únicamente dos miembros XCL1 y XCL2. XCL1 fue aislada originalmente de progenitores murinos de linfocitos T y es estructuralmente similar a las quimiocinas CC excepto por la falta de una cisteína cerca del extremo amino terminal. XCL2 solo difiere por dos aminoácidos de XCL1 que induce la quimiotaxis vía el receptor XCR1 en linfocitos pero no de monocitos ni neutrófilos (34).

1.6.4 Familia CX3C-En esta familia se encuentra la fractalcina, neurotactina o CX<sub>3</sub>CL1 es una quimiocina que se encuentra embebida en la membrana plasmática y contiene una cola corta citoplasmática. Se une a CX<sub>3</sub>CR1 presente en polimorfonucleares, monocitos, linfocitos T y célula NK. La forma soluble de esta quimiocina presenta una potente actividad quimioatrayente hacia linfocitos T activos, células dendríticas, monocitos y neuronas (35).



**Fig 3.** Quimiocinas descritas por el momento, nombre nuevo y viejo, así como los receptores a los que se unen y células que expresan los mismos. (Tomada de Antonella Viola y Andrew D. Luster, 2007)

## 1.7 UNIÓN DE LAS QUIMIOCINAS A GLICOSAMINOGLICANOS



---

Debido a que las quimiocinas contienen regiones conservadas de aminoácidos básicos cercanos al extremo carboxilo terminal, principalmente lisina y arginina, que proveen de una carga positiva a la proteína, poseen la capacidad de unirse a moléculas ácidas como los glicosaminoglicanos (GAGs), que poseen polímeros de polisacáridos largos y lineales, en consecuencia cada cadena de GAG contiene cargas negativas debido a sus grupos sulfato y carboxilo. Los residuos básicos de las quimiocinas tienen interacciones electrostáticas con los GAGs, especialmente con el heparan sulfato; que se encuentra distribuido de forma ubicua en la matriz extracelular (36).

La unión de las quimiocinas con el heparan sulfato tiene relevancia en cuanto a la función de las quimiocinas, ya que esta interacción permite que las quimiocinas sean inmovilizadas en la superficie de las células endoteliales, formando un gradiente quimioatractivo creando interacciones estables con el endotelio, permitiendo la trasmigración de las células (37). La unión de las quimiocinas al heparan sulfato también las protege a las quimiocinas de la proteólisis, además de inducir su oligomerización. Otra función de la unión de las quimiocinas con los GAGs es el transporte activo de quimiocinas en vesículas a través de las células endoteliales (2).

## 1.8 RECEPTORES DE QUIMIOCINA

Los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G heterotráméricas de siete dominios transmembranales, presentan tres asas extracelulares y tres intracelulares, el dominio amino terminal se encuentra en la parte extracelular y el dominio carboxilo terminal rico en serina y treonina se encuentra en el espacio intracelular. La parte extracelular incluyendo el dominio amino terminal determina la unión por el ligando específico, mientras que la secuencia transmembranal y el extremo carboxilo terminal presentan una secuencia conservada (DRY) que están involucrada en la señalización intracelular y en la internalización del receptor. La unión de una quimiocina a sus receptores induce cambios en la forma de la célula, en la afinidad de las integrinas, activación de la transcripción de genes de otras quimiocinas y citocinas, proliferación celular, degranulación celular y estallido respiratorio (2). A nivel bioquímico, estos receptores actúan a través de la activación de los heterotrámicos de proteínas G (compuesta por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina que intercambian el GDP por GTP lo que promueve la disociación en las subunidades  $G\beta\gamma$  y  $G\alpha_i$ (26, 38).

---

La subunidad  $G\beta\gamma$  activa a la fosfolipasa C- $\beta$ 2 (PLC) y a la cinasa 3 de fosfoinositidos (PI3K) que cataliza la conversión de fosfoinositol bifosfato ( $PI_2P$ ) en fosfoinositol trifosfato ( $PI_3P$ ), el cual es subsecuentemente convertido en inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG).  $IP_3$  regula la liberación de calcio de compartimientos intracelulares que en conjunto con el DGA activan varias isoformas de proteína cinasa C (39) que llevan a la activación de diferentes cascadas de señalización como proteínas Ras, Rho y Cdc42 participan en la regulación del rearreglo del citoesqueleto de actina y en la adhesión celular (40). La subunidad  $G\beta\gamma$  también actúa como una proteína de anclaje que facilita la interacción del receptor con otras vías, como la de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (41), que están involucradas en la desensibilización del receptor. La subunidad Gai es una GTPasa, así cuando el GTP unido a esta subunidad es hidrolizado se induce la disociación de Gai de sus efectores y la reasociación de estas con la subunidad  $G\beta\gamma$ , apagando así las vías de señalización inducidas por las proteínas G (2). Similar a lo observado con otros receptores acoplados a proteínas G, algunos receptores de quimiocina como CCR2, CCR5 y CXCR4 se dimerizan con la unión de su ligando, esta dimerización induce la activación de varios miembros de la vía de las cinasas de Janus y de los factores de transcripción STATs, conocida como la vía Jak-STAT. Algunas de estas vías de señalización se ejemplifican brevemente en la figura 4.

A los receptores de quimiocina se pueden unir varios ligandos de la misma familia con diferente afinidad, se han identificado 18 receptores de quimiocinas, 10 receptores para quimiocinas CC (CCR1-CCR10), 6 receptores para quimiocinas CXC (CXCR1-6), 1 receptor para quimiocinas de la familia C (XCR1) y un receptor para las quimiocinas  $CX_3C$  ( $CX_3CR1$ ). Los receptores de quimiocina pueden ser desensibilizados de forma heteróloga u ortóloga, al ser internalizados puede ser degradados y/o reexpresado en la superficie celular (40).

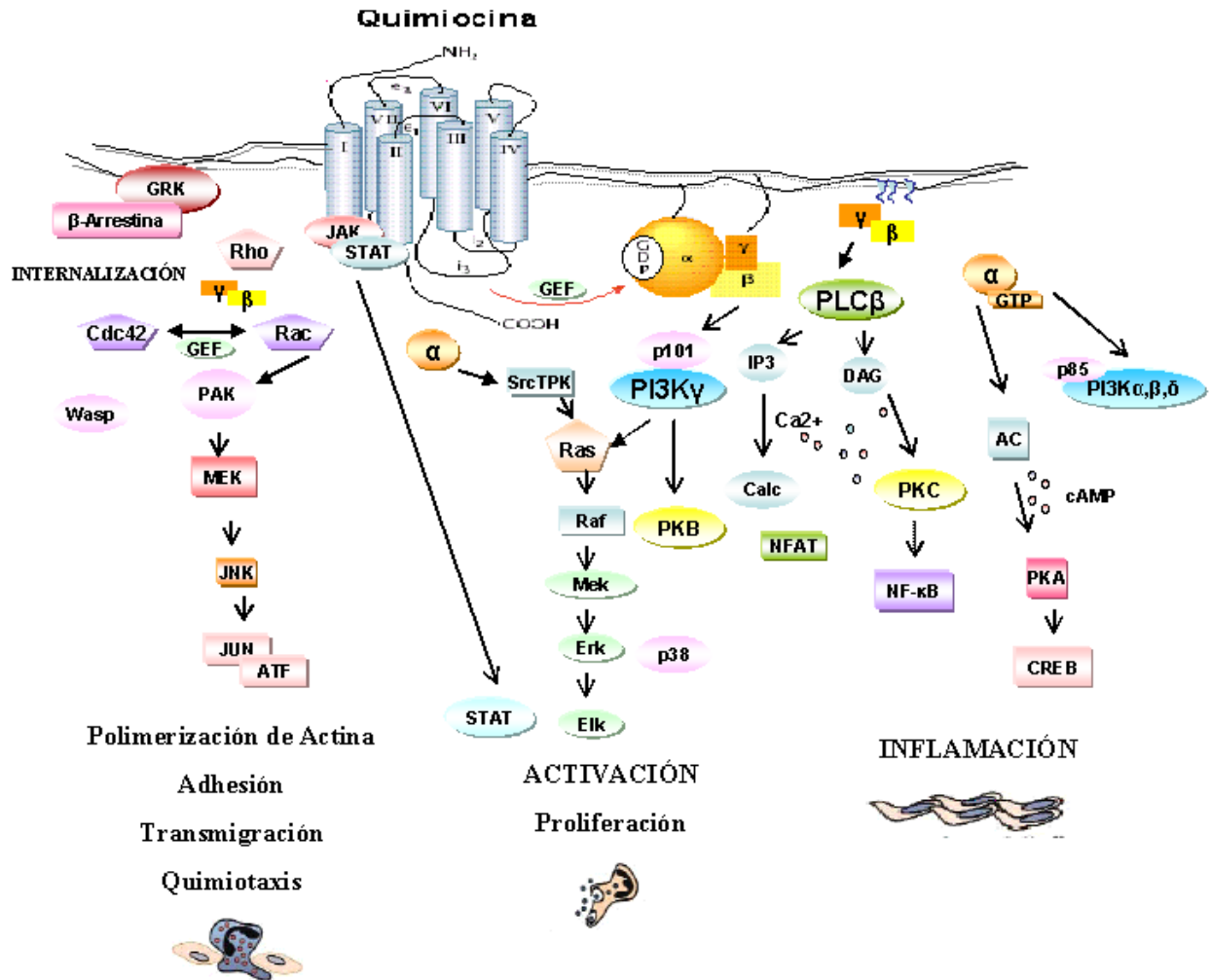


Fig 4.-Principales vías de señalización involucradas en la activación de receptores de quimiocinas.

### 1.9 PAPEL DE LAS QUIMIOCINAS EN EL TRÁFICO LEUCOCITARIO E INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta rápida a la infección por microbios o daño al tejido, que envuelve la activación de células endoteliales y epiteliales, así como el reclutamiento celular, con la finalidad de erradicar al patógeno en caso de infecciones y/o reparación del tejido dañado (26, 42). Las primeras células reclutadas en el sitio que sufrió el daño, son los neutrófilos, que se encargan de erradicar y remover células apoptóticas o *debris* celulares. Si la inflamación aguda se resuelve exitosamente, el tejido se renueva recuperando la arquitectura normal, sin embargo, si el estímulo no es eliminado, el proceso inflamatorio persiste y la composición del infiltrado inflamatorio cambia de neutrófilos a una mezcla de monocitos, macrófagos y linfocitos. Concomitantemente la

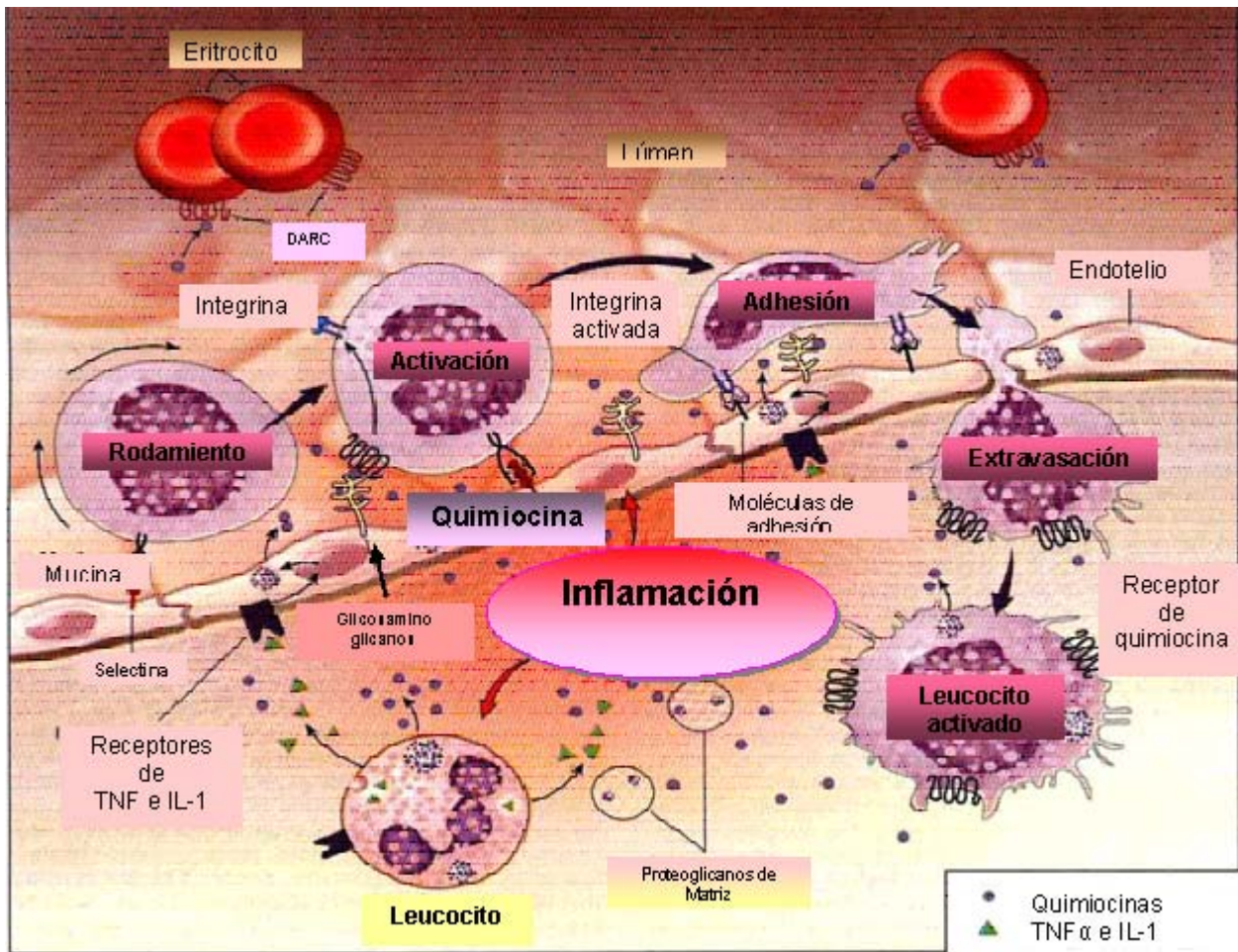
---

respuesta inmune innata montada hacia el antígeno cambia a una respuesta específica mediada por linfocitos T y B, que pueden aumentar las funciones efectoras de las células reclutadas o favorecer el reclutamiento de otros tipos celulares como los eosinófilos. La estimulación prolongada con el antígeno lleva a la inflamación crónica (26, 42). Hace más de 2000 años el filósofo y médico Romano A. Celsus describió los cuatro signos físicos que acompañan a la inflamación: hinchazón, calor, rubor y dolor. Los signos que caracterizan al proceso inflamatorio se deben a cambios en la microcirculación caracterizados por vasodilatación y apertura de capilares sanguíneos. La vasodilatación tiene como consecuencia un aumento del aporte sanguíneo que se traduce en los signos rubor y calor. Además se produce una disminución de la velocidad sanguínea de la que invierte el flujo normal de la sangre, permitiendo el acercamiento de los leucocitos a las células endoteliales. La cinética del proceso inflamatorio se regula por la expresión de diferentes moléculas solubles que controlan la presencia de diferentes poblaciones celulares durante la inflamación; así como su estado de activación (43).

Una característica esencial de la inflamación es el rápido reclutamiento de leucocitos del torrente sanguíneo al tejido dañado, este proceso de reclutamiento requiere que las células migren a través de los vasos sanguíneos y entren al tejido, este proceso ocurre en varias etapas y es denominada diapédesis o extravasación. En la superficie de las venas, vasos sanguíneos y capilares se encuentran moléculas de matriz extracelular que tiene como función adherir a los leucocitos circulantes (44).

Las quimiocinas dirigen el movimiento leucocitario durante la inflamación (45). La extravasación de los leucocitos de la sangre al tejido es un proceso regulado en varias etapas, la primera etapa del proceso está mediada por una corta unión que no retiene al leucocito circulante si no que promueve un rodamiento lento sobre el endotelio, esto está mediado por las selectinas, esta familia de glicoproteínas constituida por tres miembros; L-selectina (CD62L) expresada en granulocitos circulantes, monocitos y algunos linfocitos; E-selectina (CD62E) que se expresa exclusivamente en células endoteliales y es indetectable en ausencia de inflamación y P-selectina (CD62P) que se expresa en células endoteliales y plaquetas (46). Este rodamiento permite que los leucocitos interactúen a través de sus receptores de quimiocina, que se unen a quimiocinas adheridas a los glicosaminoglicanos, esta unión promueve el cambio de forma de la célula para atravesar el endotelio así como la activación de las integrinas presentes en los leucocitos, esto mediante un mecanismo conocido como *inside-outside*, donde la señal intracelular inducida por las quimiocinas, resulta en la activación de las integrinas hacia un estado de mayor afinidad (44). Las integrinas son glicoproteínas que consisten en dos subunidades, cadena  $\alpha$  y cadena  $\beta$ ; los miembros más relevantes

de este grupo de moléculas son las  $\alpha 4$  y las  $\beta 2$  integrinas que tienen como ligandos moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (47). Otros factores como la fuerza de estrés inducida por el aumento en el flujo sanguíneo son cruciales para el arresto firme al endotelio y la trasmigración, que puede ocurrir de forma transcelular o paracelular (44). En la figura cinco se muestran los principales pasos que debe seguir un leucocito para llegar al tejido inflamado.



**Figura 5.** Modelo de extravasación leucocitaria. (Modificada de Luster, 1998)

La secreción de quimiocinas se incrementa durante la inflamación, por lo que se relacionan con una amplia variedad de enfermedades inflamatorias ya que participan promoviendo el reclutamiento y la activación celular de leucocitos en forma selectiva (45). En la tabla 1 se mencionan algunas enfermedades inflamatorias relacionadas con las quimiocinas y el infiltrado predominante en cada caso.

<i>Proceso inflamatorio</i>	<i>Célula predominantes en el infiltrado celular</i>	<i>Quimiocinas</i>
Síndrome agudo respiratorio	Neutrófilos	CXCL8,CXCL2,CXCL1,CXCL5
Asma	Eosinófilos, linfocitos T , monocitos, basófilos	CCL 1,2,7,8,5,11,12,13,24,25,22
Neumonía bacteriana	Neutrófilos	CXCL8
Sarcodiosis	Linfocitos T, monocitos	CXCL10
Glomerulonefritis	Linfocitos T, monocitos, neutrófilos	CCL2,CCL5,CXCL10
Artritis reumatoide y Osteoartritis	Monocitos, neutrófilos	CCL3,CCL2,CCL4,CXCL8,CXCL5
Arteriosclerosis	Linfocitos T, monocitos	CCL2,7,8,13,CXCL10
Enfermedad intestinal inflamatoria	Linfocitos T, monocitos, neutrófilos, eosinófilos.	CCL2,CCL3,CCL11,CXCL8,CXCL10
Soriasis	Linfocitos T, neutrófilos,	CCL2,CXCL10,CXCL9,CXCL2,CXCL8
Meningitis bacteriana	Monocitos, neutrófilos	CXCL8,CXCL1,CCL2,CCL3,CCL4
Meningitis viral	Linfocitos T, monocitos	CCL2,CXCL10

**Tabla 1.** Enfermedades inflamatorias y tipo de infiltrado celular característicos regulados por quimiocinas. (Modificada de Luster, 1998).

### 1.10 INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR

La inflamación alérgica pulmonar (Asma alérgica) es un síndrome caracterizado por una obstrucción reversible de las vías respiratorias, esto debido a la presencia de un infiltrado inflamatorio, que promueve la sobreproducción de moco, el engrosamiento del epitelio y la pared muscular, lo que favorece la hiperreactividad bronquial (48).

La iniciativa global contra el asma (GINA) define a esta patología como un problema de salud pública a nivel mundial, que se caracteriza por la inflamación crónica de las vías aéreas, en la cual muchas células y moléculas solubles, intervienen en el proceso inflamatorio. La inflamación crónica se relaciona con la hiperreactividad bronquial, que lleva a episodios recurrentes de bronco obstrucción caracterizados por tos, silbidos y dificultad para respirar, esto particularmente durante la noche y mañana (49).

Los factores que lleva a la inflamación de las vías respiratorias durante el asma, involucra múltiples factores y resulta de la interacción entre las células inflamatorias, células residentes del pulmón y mediadores solubles relacionados con un proceso de alergia (49).

---

### 1.10.1 Alergia

El término alergia fue introducido por Clemens von Pirquet, el término atopía fue tomado del griego *atopos* que significa fuera de lugar, actualmente es usado para describir las enfermedades mediadas por anticuerpos IgE, las personas atópicas producen anticuerpos IgE contra moléculas que resultan inocuas para el resto de la población, presentando una o más enfermedades atópicas(6).

### 1.10.2 Alergenos

Los alergenos son moléculas que producen una respuesta alérgica en personas susceptibles. Un número incontable de moléculas pueden actuar como alergenos, motivo por el cual es difícil definir alguna característica en común entre ellas, sin embargo es posible agrupar a los alergenos en tres principales grupos: alergenos lipofílicos que penetran por la piel (*alergenos de contacto*), proteínas solubles que penetran por las mucosas (*alergenos inhalados o por ingestión de alimentos*) y glicoproteínas en venenos de insectos (108). En el caso de la inflamación alérgica pulmonar los alergenos inhalados representan a las moléculas causantes de este síndrome.

**Alergenos inhalados.**-Los alergenos que penetran por las vías respiratorias o aeroalergenos son generalmente proteínas de bajo peso molecular entre 10-50kDa solubles en solución acuosa, pueden provenir de variadas fuentes naturales como, partículas de polvo, polen, escamas de la piel de animales y personas, pequeñas fibras orgánicas que al contacto con las mucosas se solubilizan lo que les permite atravesar de forma rápida la barrera mucosa. Dentro de los principales alergenos se encuentran proteínas derivadas de ácaros domésticos que pertenecen a la subclase Acari y al orden *Astigmata*. Las especies más comunes son *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Euroglyphus maynei*, también es bastante común el *Dermatophagoides farinae*. Los alergenos de *D. pteronyssinus* son los más estudiados y hasta la fecha se han caracterizado siete (*Der p I* a *Der p VII*). De ellos, los alergenos I y II son los más relevantes desde el punto de vista clínico y también han sido detectados en otras especies, este tipo de alergenos se dividen en grupos. Los alergenos del grupo I son enzimas proteolíticas con actividad de cistein proteasas de 25kDa secretadas por el tracto digestivo del ácaro y que se encuentran en concentraciones importantes en las partículas fecales (108). Los alergenos del grupo II (*Der p II* y *Der f II*) son proteínas de 14kDa que se encuentran principalmente en el cuerpo del ácaro y no se les asocia con alguna actividad enzimática. *Der p I* y *Der f I* ejercen su actividad de cistein proteasa sobre receptores endógenos como CD25 y CD23 (50).

---

Los aeroalergenos derivados de vertebrados derivan de secreciones de animales como saliva, orina y descamación de la piel de animales, uno de los alergenos de este tipo que mas se asocia al desarrollo de alergias es la proteína *Fel d 1* que proviene de las glándulas salivares del gato (108).

### **1.10.3 FACTORES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE ALERGIA PULMONAR**

Existen postulados como “*La hipótesis de la higiene*”, la cual propone que la infección con virus y bacterias, así como la exposición a productos bacterianos como el LPS durante los primeros años de vida promueve el desarrollo de linfocitos con fenotipo Th1 lo cual regula negativamente la aparición de células Th2 y la respuesta de anticuerpos IgE, motivo por el cual se postula que los niños que habitan en la ciudad, tienen menor exposición a patógenos, que niños que habitan en áreas rurales o que están en contacto con animales. Sin embargo esta hipótesis no se cumple del todo debido a que en años recientes la prevalencia de asma ha aumentado exponencialmente en países del tercer mundo y en áreas rurales, donde incluso, las enfermedades parasitarias presentan una alta incidencia, además enfermedades como la diabetes tipo I y otras enfermedades relacionadas con una respuesta tipo Th1 también han aumentado en las últimas décadas. Por lo que la hipótesis de la higiene que se relaciona con países industrializados, podría explicarse mejor con la reducción de la activación de células T reguladoras causada por una disminución de la estimulación de la respuesta inmune, lo que explicaría el aumento no solo de enfermedades alérgicas, si no también las mediadas por células Th1(51).

En humanos existe una clara tendencia genética al desarrollo de asma y enfermedades atópicas, en ratón esta inclinación por el desarrollo de una respuesta alérgica esta determinada por la cepa, por ejemplo ratones de la cepa Balb/c tienen predisposición al desarrollo de respuesta tipo Th2 con altos niveles de IgE en respuesta a los antígenos, en comparación a otras cepas como C57Bl/6 que se caracteriza por el desarrollo de una respuesta predominantemente tipo Th1 con una baja respuesta de anticuerpos IgE.

Varios polimorfismos genéticos han sido relacionados con el desarrollo de enfermedades atópicas en humanos, por ejemplo polimorfismos en factores de transcripción como GATA3, NFAT, que regulan la diferenciación al fenotipo Th2. Otros factores genéticos involucrados en el desarrollo de alergia, son polimorfismos en los genes que codifican para los receptores de citocinas como IL-4 e IL-13 y para sus ligandos, otras citocinas como IL-9, TNF y alelos específicos del MHC (52).



---

En México el Estudio Internacional de Asma y Alergia (ISAAC) reportó una prevalencia de 6.6% en el 2000; por entidad federativa, los estados de Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Tamaulipas, presentan las tasas más altas de asma desde 1998, por lo que el asma parece asociarse a factores ambientales como la humedad y presión barométrica (53).

El asma se posiciona en México dentro de las 20 principales patologías causantes de morbilidad, su posición fluctúa entre el sitio 10-14, siendo los más afectados niños menores de 4 años y adultos mayores de 65 (53).

### **1.11 GENERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ALÉRGICA PULMONAR**

Las vías respiratorias inician en la nariz, donde barreras físicas, impiden la entrada de partículas dañinas al tracto respiratorio inferior, una vez que el aire inhalado atraviesa la nariz llega a la faringe y a la traquea. Posterior a la traquea el aire pasa a los bronquios que penetran en la parte posterior inferior de cada pulmón donde se dividen en conductos más pequeños denominados bronquiolos que a su vez se ramifican en alvéolos los cuales están compuestos por dos capas de células. En los pulmones existe una gran cantidad de vasos sanguíneos, venas y capilares, las arterias llevan sangre desde el corazón a los pulmones y las venas del pulmón al corazón, los capilares rodean a los alvéolos. Los pulmones también contienen gran cantidad de tejido conjuntivo así como una compleja interconexión con el sistema nervioso (53-54).

El intercambio gaseoso entre oxígeno y dióxido de carbono es la principal función del tejido pulmonar. Una capa de células epiteliales, dos basamentos membranales y una capa de células endoteliales separan al flujo sanguíneo de los gases inhalados.(5) La inmunidad en el pulmón está mediada principalmente por mecanismos presentes en la mucosa donde las células presentadoras de antígeno, linfocitos T y mediadores solubles influyen la respuesta inmune adaptativa. Los órganos linfoides secundarios están interconectados con los pulmones mediante los ganglios mediastinales que se localizan en el área traqueo bronquial y paratraqueal, éstos se encargan de drenar el tracto respiratorio inferior, mientras que el tracto respiratorio superior es drenado por los ganglios cervicales.

El proceso de sensibilización hacia un alérgeno que lleva a la proliferación de linfocitos con fenotipo Th2, está relacionado con la activación de células T “naive” por células presentadoras de

---

antígeno. Las células dendríticas están distribuidas en las diferentes porciones de las vías respiratorias, incluyendo los conductos, parénquima pulmonar, espacios alveolares, pleura y alrededor del sistema vascular (55).

Las células dendríticas representan el punto de control que determina la inducción de tolerancia o inducción de una respuesta inmune en pulmón. Las señales que determinan el tipo de respuesta después de la captura y procesamiento del antígeno a nivel pulmonar dependen del tipo de estimulación que las células dendríticas presenten a los linfocitos T en los ganglios mediastinales.(55) Una de las principales señales esta mediada por las citocinas secretadas por las DCs así como los estímulos que activan a respuesta inmune innata vía PRRs. Se ha demostrado con modelos *in vivo* que subpoblaciones específicas de DCs denominadas DCs plasmocitoides se encuentran presentes en el tejido pulmonar y representan un papel crucial en el establecimiento de tolerancia, esta subpoblación se caracteriza por marcadores como GR1 y B220, esta subpoblación en su estadio inmaduro induce la generación de células T reguladoras o respuesta tipo Th1 dependiendo del tipo de antígeno. Otra subpoblación definida como células dendríticas mieloides debido a su linaje de procedencia son capaces de inducir una respuesta tipo Th2, lo que lleva a la producción de IgE por las células B estas células presentan un fenotipo maduro con una importante expresión de marcadores de activación.(24)

### *1.11.1 Generación de anticuerpos IgE*

Los elevados títulos de anticuerpos IgE, representan una de las principales características de la respuesta alérgica pulmonar. En condiciones no atópicas la inmunoglobulina E es una de las menos abundantes en suero (150ng/mL), el nivel en suero de esta clase de inmunoglobulina refleja el número de células plasmáticas productoras de IgE. En individuos atópicos los niveles séricos de IgE se elevan alrededor de 10 veces en comparación con individuos no atópicos. El anticuerpo IgE tiene una vida media de tres días en circulación si no es secuestrada en algún tejido o mucosa, a diferencia de IgG que puede permanecer más de 20 días en circulación. La inducción del cambio de clase hacia anticuerpos IgE involucra tres acontecimientos previos; el primero es la señal que favorece la diferenciación de linfocitos Th0 a linfocitos con fenotipo Th2, el segundo es el dado por las citocinas IL-4 o IL-13 que mediante la interacción con sus receptores en el linfocito B, activan a las cinasas JAK1 y JAK3, las cuales fosforilan a STAT6 que en el núcleo celular inducen la expresión del transcrito inmaduro de la cadena  $\epsilon$ ; y el tercero es la interacción entre las moléculas CD40 en el linfocito B con su ligando CD40L expresado en el linfocito T activado, que promueven la expresión del transcrito maduro de la cadena  $\epsilon$ , que codifica para la IgE. Esto debido a que el

---

exón de la cadena  $\epsilon$ , contiene sitios de unión en su región promotora para factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 que se activa vía la unión CD40-CD40L (56).

Por otro lado, citocinas como IFN $\gamma$  inhiben el desarrollo de linfocitos Th2 y por lo tanto la producción de citocinas como IL-4 e IL-13, lo cual actúa directamente en células B, reprimiendo la transcripción del transcrito inmaduro de la cadena  $\epsilon$ . Otros factores que inhiben la producción de anticuerpos IgE son receptores como CD45 que es una fosfatasa transmembranal que desfosforila JAK1 y JAK3, bloqueando así la estimulación dada por la IL-4.

Durante la respuesta primaria dependiente de linfocitos T, se han descrito dos fases de activación de linfocitos B; una activación primaria y la recombinación somática ocurre fuera de los folículos en los ganglios linfáticos, lo que genera células plasmáticas con una vida media corta y secreción de anticuerpos de baja afinidad que no generan memoria, esto representa la aparición de anticuerpos de la clase IgM; una segunda fase de activación ocurre dentro de los centros germinales, donde el cambio de clase y la hipermutación somática, llevan a la producción de células plasmáticas de memoria y BCRs de alta afinidad. Para el caso de células IgE<sup>+</sup>, que dependen de la interacción CD40-CD40L, su generación se da por la maduración de células IgG1<sup>+</sup> en el centro germinal, donde la IL-4 predomina frente a otras citocinas como IL-21 que es producida por las células Th de los folículos y que inhibe la hipermutación somática a IgE<sup>+</sup>, en ausencia o niveles mínimos de IL-4. La producción de IgE, también es controlada por señales solubles como IL-2, IL-5, IL-6, IL-9, TNF $\alpha$ , CCL5, CXCL8, histamina y señales dadas por la interacción entre moléculas accesorias de linfocitos T y B, como CD21, CD54, CD58, CD44, CD86 que favorecen la producción de IgE. Las células B IgE<sup>+</sup> a diferencia de las células B IgG1<sup>+</sup> expresan mínimas cantidades del receptor de quimiocina CXCR5, el cual es requerido para la localización dentro de los folículos o los centros germinales en los ganglios linfáticos (56)

### ***1.9.2 Receptores para IgE***

IgE se une a FC $\epsilon$ RI y FC $\epsilon$ RII (CD23), FC $\epsilon$ RI es un receptor tetramérico compuesto por una cadena  $\alpha$  a la cual se une la IgE, una cadena  $\beta$  y un homodímero de cadenas  $\gamma$  unidas por puentes disulfuro. Los eventos que ocurren próximos a la activación del receptor no se comprenden del todo en la actualidad, sin embargo como otros miembros de receptores de inmunoglobulinas es claro que el inicio de la señal ocurren en micro dominios de la membrana plasmática conocidos como *lipid rafts*. FC $\epsilon$ RI se expresa también en células dendríticas, monocitos y células musculares lisas (88).

---

FCεRII (CD23) es un receptor de baja afinidad que no pertenece a la subfamilia de las inmunoglobulinas, CD23 es un receptor tipo II con un dominio extracelular de lectina que puede ser cortado produciendo fragmentos solubles, que se encargan de regular la síntesis de citocinas como IL-4 y la misma IgE, estos fragmentos también se unen a receptores del complemento como CR2, CR3 y CR4 y CD21 (57).

### **1.12 ETAPA PRIMARIA DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR**

Cuando una persona alérgica entra en contacto con el alérgeno contra el cual presenta anticuerpos IgE, minutos posteriores al encuentro, los mastocitos de las vías respiratorias se activan debido al entrecruzamiento de FCεRI que han unido a IgE, y al alérgeno multivalente, lo que lleva a la secreción de mediadores químicos presentes en los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos, principalmente aminas vasoactivas, proteasas, proteoglicanos, citocinas y factores de crecimiento, síntesis de novo de mediadores lipídicos como leucotrienos y prostaglandinas, la síntesis y secreción de citocinas y quimiocinas (48).

Los mastocitos son células derivadas de progenitores hematopoyéticos de médula ósea que presentan marcadores de superficie como CD13+, CD34+, CD117+, estas células migran a tejidos periféricos como la piel, las mucosas y las vías respiratorias, donde terminan de madurar. Se localizan predominantemente alrededor de los vasos sanguíneos y de los nervios y por debajo de los epitelios, también están presentes en los órganos linfoides.(58) En ratón hay una población de mastocitos en la mucosa intestinal, estas células contienen en sus gránulos condrotin sulfato y baja cantidad de histamina, el equivalente humano de esta población predominan en la mucosa intestinal y espacios alveolares del pulmón, otra subpoblación en ratón se localiza en el pulmón y en las serosas de todo el cuerpo (59).

Las citocinas producidas por los mastocitos también se encuentran preformadas en gránulos además de ser sintetizadas de novo después de la activación vía FCεRI, citocinas como IL-1, TNFα, son producidas por los macrófagos alveolares activados, estas citocinas activan al epitelio respiratorio, las células epiteliales en respuesta a este estímulo producen quimiocinas como CCL13, CCL11, CCL22, las cuales difunden a través del endotelio y son presentadas por las células endoteliales iniciando así el reclutamiento celular que caracteriza a la respuesta secundaria del proceso alérgico. Los productos oxidativos, eicosanoides y metaloproteinasas favorecen el daño del epitelio y la

---

permeabilidad del endotelio, la producción de estas moléculas se relaciona con la activación de neutrófilos en las primeras etapas del proceso inflamatorio. En la figura seis se resumen los acontecimientos derivados de la activación de mastocitos y macrófagos alveolares en la etapa temprana de la inflamación.

En ratón, los mastocitos también expresan FcγRIII, por lo que anticuerpos de la clase IgG1 al unirse con su receptor y entrecruzar con el antígeno también, puede producir degranulación de los mastocitos

### ***1.12.1 Mediadores inflamatorios derivados del ácido araquidónico y aminas biogénicas, involucrados en la inflamación alérgica pulmonar***

**Mediadores inflamatorios derivados del metabolismo del ácido araquidónico:** Los eicosanoides son un grupo de potentes mediadores solubles que se producen durante el proceso inflamatorio, en su conjunto derivan del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico, un ácido graso de 20 átomos de carbono anclado a la membrana citoplasmática mediante fosfolípidos, son generados por la acción de tres clases de enzimas intracelulares: las ciclooxigenasas (COX) que producen prostaglandinas y tromboxanos, las lipoxigenasas que generan leucotrienos, lipoxinas e hidroxiácidos y las epoxigenasas que producen epoxiácidos.(60)

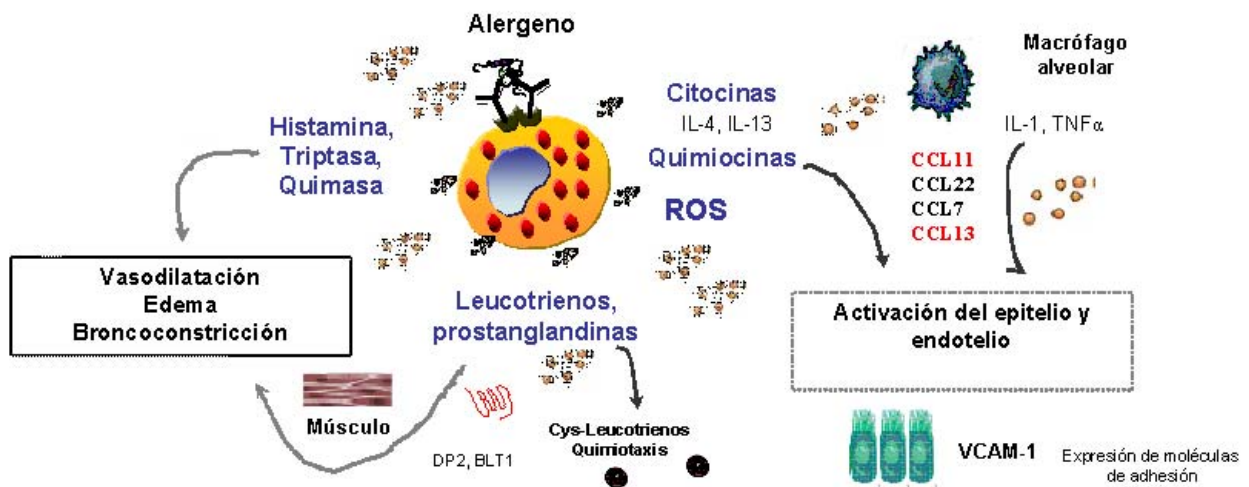
Los eicosanoides son potentes bronco constrictores, quimioatrayentes de eosinófilos y linfocitos activados producen bronco constricción del músculo liso, dilatación de vasos sanguíneos, incremento de la permeabilidad vascular y estimulación de las terminaciones nerviosas.(61) Los leucotrienos liberados por los mastocitos activan a sus receptores DP2 presentes en las células endoteliales promoviendo la liberación de quimiocinas (60).En la tabla 2 se mencionan a los mediadores lipídicos mas importantes durante el proceso de alergia pulmonar.

<b><i>Mediador</i></b>	<b><i>Funciones efectoras</i></b>
<b>Prostaglandina D2</b>	Vasodilatación , bronco constricción, quimiotaxis de neutrófilos
<b>Leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> , E<sub>4</sub></b>	Bronco constricción prolongada, secreción de moco, aumento de la permeabilidad vascular quimioatracción de eosinófilos y linfocitos T.

<b>Factor activador de Plaquetas (PAF)</b>	Quimioataxis y activación de leucocitos, bronco constricción, aumento de la permeabilidad vascular.
--	---

**Tabla 2.** Mediadores lipídicos mas importantes durante el proceso de alergia pulmonar.

**Aminas biogénicas:** En humanos el único mediador inflamatorio de esta clase es la histamina que se almacena en gránulos de mastocitos. En roedores la serotonina también se encuentra presente en los gránulos. Las acciones de las aminas biogénicas incluyen aumento en la permeabilidad vascular, producción de moco, inducen la producción de relajantes musculares, prostaciclina y oxido nítrico que producen vasodilatación y edema. La histamina se une a los receptores H1, H2 y H3 presentes en distintos tipos celulares, sin embargo, a nivel del tracto respiratorio el receptor H1 es el mas importante. La histamina también induce la proliferación de linfocitos y aumenta la actividad citolítica de las células NK.



**Fig 6.**Efectos derivados del mastocito y macrófagos alveolares en la etapa primaria de la inflamación alérgica pulmonar.

### 1.13 ETAPA SECUNDARIA DEL PROCESO INFLAMATORIO

---

La fase tardía o secundaria de la respuesta alérgica pulmonar, inicia después de las primeras horas del contacto con el alérgeno, está caracterizada por la presencia de un infiltrado inflamatorio, con presencia de eosinófilos, monocitos, basófilos, y linfocitos T principalmente de tipo Th2, que promueven la proliferación, activación y sobrevivencia de eosinófilos por medio de la secreción de citocinas (48).

### *1.13.1 Células involucradas en la etapa secundaria del proceso inflamatorio*

**Eosinófilos.-** En condiciones normales estas células se encuentran aproximadamente al 2% en sangre periférica en humanos y circulan transitoriamente por el torrente sanguíneo para después residir en diferentes órganos. Los eosinófilos maduros presentan gránulos en el citoplasma que contienen gran cantidad de enzimas citotóxicas, dentro de estas proteínas se encuentran: Proteína Básica Principal 1 y 2 (MBP1,2), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) con actividad de RNAsa 2, proteína catiónica eosinofílica (ECP) con actividad de RNAsa 3, la peroxidasa de eosinófilos (EPO) (62) Las sustancias tóxicas presentes en los gránulos de los eosinófilos tienen varios efectos al ser liberados, por ejemplo la MBP1 daña células y tejidos y su presencia en lavados broncoalveolares está directamente relacionada con el grado de hiperreactividad bronquial; la EPO también se relaciona con el daño al epitelio durante el asma, esta enzima tiene como blanco residuos de proteínas con motivos de tiocianato y bromo produciendo sustancias altamente oxidantes y en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activan a los mastocitos cercanos (63).

Cuando los eosinófilos se activan en respuesta a un estímulo migran al tejido inflamado por quimiocinas como CCL11, 24, 26, CCL13 y CCL5 que son producidas por células de las vías respiratorias (64). Para llegar al tejido respiratorio los eosinófilos primeramente se adhieren al endotelio vascular mediante moléculas de adhesión, en este caso β2 integrinas, las cuales se unen a las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1) presentes en el endotelio, facilitando la unión y la trasmigración al tejido inflamado donde liberan el contenido de sus gránulos por degranulación citolítica, secreción regulada por poros en la membrana o mediante vesículas, la degranulación se presenta por la activación vía IgG o IgA en el eosinófilo y/o el microambiente de citocinas como IL-5 y quimiocinas como CCL13. (62) Los eosinófilos producen una gran y variada cantidad de citocinas y quimiocinas lo que les confiere la capacidad de actuar en diversas respuestas biológicas como la remodelación de tejidos y el aumento del proceso inflamatorio alérgico (65).

**Linfocitos-** La inflamación alérgica se caracteriza por la presencia de linfocitos T CD4+ con fenotipo Th2 que secretan citocinas que se relacionan de forma directa con los procesos alérgicos.

---

La utilización de modelos animales sustenta el hecho de que la presencia de linfocitos Th2 son suficientes para inducir la inflamación y promueven la cronicidad.

En el pulmón las células efectoras se encuentran en el parénquima y los conductos respiratorios superiores, rodeando el basamento de la membrana, formando estructuras similares a la Lámina propia en intestino. Los linfocitos T presentes en pulmón presentan principalmente un fenotipo *naive* y efectoras de memoria.

La entrada de estas poblaciones linfocitarias al pulmón está altamente regulada debido a que las células T efectoras CD4+ y CD8+ de memoria que rodean el epitelio, protegen contra virus o bacterias respiratorias, pero también pueden participar en procesos inflamatorios que exacerbaban la respuesta inmune dañando la estructura pulmonar como es el caso del asma alérgica.

La participación de los linfocitos Th1 durante la respuesta alérgica, se relaciona con la producción de citocinas como IFN $\gamma$ , el cual se encuentra elevado en el suero de los pacientes asmáticos durante la fase aguda de la crisis asmática. El IFN $\gamma$ , promueve la sobrevivencia de los eosinófilos, además de favorecer la expresión de moléculas de activación como CD69, HLA-DR e ICAM-1. El IFN $\gamma$ , producido por las células Th1 también estimula la producción de quimiocinas como CXCL10 que se ha descrito como necesaria para montar una respuesta inflamatoria en pulmón (53, 66).

**Células residentes del pulmón.**-En la inflamación alérgica pulmonar el epitelio es anormal debido a las células epiteliales activadas que incrementan la expresión de genes de moléculas proinflamatorias en las mismas células epiteliales así como aumento en la secreción de moco por las células mucos productoras. El daño al epitelio produce desnudamiento de las vías respiratorias que promueve la entrada de alérgenos o virus y bacterias que pueden complicar el cuadro inflamatorio. Las interacciones que existen entre las células epiteliales, endoteliales, musculares y fibroblastos inducen un complejo proceso inflamatorio que involucra en gran medida a las células residentes del pulmón. Las células residentes del tejido son la principal fuente de quimioatrayentes durante las primeras etapas de la respuesta inflamatoria, lo que se muestra en la tabla 3.

<b>TIPO CELULAR</b>	<b>QUIMIOCINA PRODUCIDA</b>
Macrófagos alveolares	CCL2,3,5,6,7,11,22,24 CXCL1,2,3,8,9,10,11
Células epiteliales	CCL2,5,11,22,24,26 CXCL5,8,9,10,11,15,13
Células musculares lisas	CCL2,5,11,24,26



	CXCL1,2,3,4,8
Mastocitos	CCL1,2,3,4,5,17,22 CXCL5,8
Fibroblastos	CCL2,3,4,5,6,7,8,11 CXCL1,2,3,5,8,10

**Tabla 3** .Secreción de quimiocinas por las células residentes del pulmón.

**Monocitos y macrófagos.**-Los monocitos y macrófagos son células mononucleares fagocíticas. Los promonocitos salen de médula ósea y se diferencian a monocitos en la sangre, posteriormente migran a su tejido residente donde maduran a macrófagos. En el caso de las vías respiratorias se denominan macrófagos alveolares. Los monocitos y macrófagos expresan receptores para IgG1, IgG3, IgA, IgM, IgE, receptores para moléculas del complemento CR1, CR3, estas células también producen una gran variedad de enzimas y mediadores inflamatorios. Los macrófagos son las células fagocíticas por excelencia y están involucrados en la reparación del tejido dañado durante el proceso inflamatorio pulmonar, su actividad es regulada por citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF $\alpha$ , M-CSF y IFN- $\gamma$ . La activación de los macrófagos alveolares contribuye al proceso inflamatorio durante el asma debido a su capacidad de secreción de mediadores inflamatorios derivados del estallido respiratorio, metabolitos del ácido araquidónico y quimiocinas como CCL2, 3, 5, 6, 7, 11, 22, 24 (67).

**Células NKT.**-Desde 1986 cuando el paradigma Th1/Th2 fue propuesto, las células con un fenotipo efector Th2 se relacionan con la patología alérgica, sin embargo, el marcador CD4 es también expresado por NKT ,estos linfocitos comparten varias características con los linfocitos T CD4 + convencionales como la producción de citocinas Th2 y la expresión de un receptor invariable de células (TCR) a estas células se les conoce como iNKT, el reconocimiento del antígeno se da vía la molécula CD1 que une glicolípidos y se expresa en el epitelio respiratorio, hepatocitos, células T, linfocitos B ,macrófagos y células dendríticas; a diferencia de los linfocitos T convencionales que solo reconocen moléculas de origen proteico. Cuando estas se activan se liberan de forma rápida grandes cantidades de IL-4 e IFN $\gamma$ , estudios en animales deficientes en este subtipo celular demuestran que no se desarrolla hiperreactividad bronquial en ausencia de iNKT, cuando se utiliza como alérgeno un lípido que activa directamente a esta población celular (68).

#### **1.14 CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS DE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR**

---

Las características histológicas de pulmones de pacientes asmáticos presentan, un incremento en la deposición de colágeno en el basamento de la membrana, desnudamiento del epitelio respiratorio y un infiltrado inflamatorio principalmente de eosinófilos. La inflamación alérgica pulmonar se clasifica de acuerdo a la frecuencia de aparición de los episodios de crisis y el tratamiento varia dependiendo de las características clínicas.(69)

#### ***1.14.1 Hiperreactividad bronquial***

La hiperreactividad bronquial es una de las principales características del asma, es una respuesta bronco constrictora exagerada, que induce bronco espasmos más intensos que los observados en individuos sanos al ser sometidos a un estímulo inespecífico, de naturaleza química, física o farmacológica. El grado de hiperreactividad bronquial se correlaciona casi siempre con la gravedad del proceso inflamatorio. Clínicamente se determina por la respuesta a estímulos inhalados de constrictores del músculo liso como la metacolina, que permiten determinar el daño en la función pulmonar y la gravedad del paciente (49, 53)

#### ***1.14.2 Hipersecreción de moco***

El moco es una secreción viscosa y adherente, que se sintetiza por células especializadas denominadas células muco productoras o caliciformes, que se localizan principalmente entre el epitelio de todas las mucosas expuestas al ambiente exterior. El moco es una barrera primaria de defensa que impide la entrada de patógenos o sustancias extrañas, sin embargo, su exacerbada producción en patologías como el asma representan un problema que contribuye con la obstrucción de las vías aéreas. El moco esta compuesto en un 95% de agua, otro componente importante son las glicoproteínas denominadas mucinas; las mucinas son una familia de glicoproteínas altamente glicosiladas lo que las protege de la proteólisis a la que están expuestas al estar en contacto con el exterior. Las mucinas son codificadas por los genes MUC. El moco también contiene, sales, ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y proteínas con actividad antimicrobiana como las defensinas, lisosima e inmunoglobulinas.

La IL-13 es el principal factor involucrado con la sobre expresión de moco, este mecanismo de protección trata de proteger al epitelio dañado disolviendo mediadores inflamatorios, substancias inhaladas y *debris* celulares. La IL-13 disminuye el movimiento ciliar promoviendo la acumulación y episodios de tos para tratar de evitar la obstrucción de las vías respiratorias. IL-13, IL-4 y IL-9 incrementan la expresión de genes que culminan en la producción de mucina.(70)

#### ***1.14.3 Remodelación***

La inflamación crónica produce un cambio estructural en el tejido pulmonar por la constante reparación del tejido inflamado, este proceso es conocido como remodelación y está caracterizado

---

por la presencia de hiperplasia e hipertrofia de las células mucoproducidas, fibrosis subepitelial, hiperplasia e hipertrofia del músculo liso. La remodelación del tejido es un mecanismo de reparación que provoca disminución de la función pulmonar (59).

La hiperplasia de las células mucoproducidas está relacionada con citocinas como IL-13 e IL-9. En la formación de nuevos vasos sanguíneos están involucrados factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); en este proceso se involucran quimiocinas como CXCL4 que promueve la angiogénesis, la producción temprana de quimiocinas ELR+ como CXCL8, CXCL5, CXCL1, CXCL2 que inducen la diferenciación de fibroblastos y CXCL10 antagonizan la angiogénesis, mientras que quimiocinas ELR- producidas posteriormente regulan en forma negativa este proceso deteniendo la formación de nuevo tejido. La fibrosis epitelial se produce por la deposición de proteínas de matriz principalmente colágena tipo I, III y V.

#### ***1.14.4 Resolución de la inflamación***

La resolución del proceso inflamatorio se inicia pocas horas después que la inflamación comienza. El fin del proceso inflamatorio involucra la movilización de diferentes productos derivados del metabolismo de ácidos grasos, la producción de estos compuestos regula la duración y magnitud de la inflamación. Después de entrar al tejido los granulocitos promueven un cambio en la producción de mediadores derivados del ácido araquidónico como las lipoxinas, estos eventos coinciden con la biosíntesis de ácidos grasos omega 3 polinsaturados, que son precursores de mediadores resolutivos como las protectinas y resolvinas. Estos mediadores lipídicos retardan la entrada de célula al tejido inflamado, disminuyen la permeabilidad vascular y favorecen la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos (73).

La fagocitosis de las células apoptóticas por los macrófagos, favorece la limpieza de granulocitos, así como la producción de citocinas reguladoras como TGF $\beta$ 1 y factores como VEGF que resultan cruciales para la reparación del tejido. Durante el programa de resolución algunos macrófagos migran a los ganglios linfáticos, sin embargo hasta el momento se desconoce que moléculas están involucradas en la migración de estas células (74).

#### **1.15 MEDIADORES INFLAMATORIOS INVOLUCRADOS DURANTE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR**

---

Los mediadores inflamatorios involucrados en la respuesta alérgica pulmonar son diversos y se producen debido a estímulos que reciben las células, un ejemplo es la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual es considerado el factor de transcripción maestro de la respuesta inflamatoria.

NF- $\kappa$ B es un heterodímero u homodímero de las proteínas p65 y p50, en su forma inactiva se encuentra en el citoplasma unido a un inhibidor denominado I $\kappa$ B, el cual impide que el complejo de NF- $\kappa$ B entre al núcleo. Cuando las células son estimuladas por la activación de diversos receptores expresados en su membrana, cinasas específicas fosforilan I $\kappa$ B, causando su rápida degradación en el proteosoma, lo que permite que los dímeros de p65 o p50, entren al núcleo celular, donde se unen a secuencias específicas del DNA que promueven la transcripción de diversos mediadores inflamatorios, como citocinas, quimiocinas y enzimas.

**Citocinas.**- Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares, son los agentes responsables de la comunicación intercelular. Estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación, maduración celular, inflamación, respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis y apoptosis.

Cada citocina se une a un receptor de superficie celular específico generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular. Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción que resultan en la producción de otras citocinas, o un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retroregulación(6, 53).

Los linfocitos TCD4+ con fenotipo Th2 contribuyen al proceso inflamatorio vía la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 también son producidas por otras células como linfocitos CD8, eosinófilos, mastocitos, T  $\gamma/\delta$  y subtipos de NK CD4+. Las citocinas que participan durante el proceso inflamatorio alérgico son producidas en oleadas durante diferentes etapas, por ejemplo la IL-4 producida por los linfocitos T CD4+ activa a los eosinófilos que posteriormente producen esta misma citocina, otras citocinas como IL-25 promueve el microambiente Th2(75).

La IL-4 e IL-13 son citocinas con actividades pleiotropicas, durante el proceso de inflamación alérgica pulmonar, ya que ejercen su efecto en un rango importante de células. IL-4 e IL-13 se unen

a receptores formados por las subunidades: IL-4R $\alpha$ , IL-13 R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2 y la cadena gamma común ( $\gamma_c$ ). La cadena gamma común es una glicoproteína integral de membrana (Receptores de citocina Tipo I) subunidad que forma complejos con los receptores específicos de varias citocinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21). La  $\gamma_c$  se encuentra expresada en diferentes tipos celulares.

Otras citocinas como involucradas en el proceso alérgico como IL-5 se unen a receptores específicos formados por IL-5R $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , que solo se expresan en poblaciones celulares específicas como los eosinófilos, basófilos y precursores de células B.

En la tabla 4 se muestran las principales citocinas involucradas durante el proceso de inflamación alérgica pulmonar.

<i>Citocina</i>	<i>Fuente</i>	<i>Papel durante la inflamación alérgica pulmonar</i>
<b>IL-4</b>	Linfocitos T (Th2), mastocitos, basófilos y eosinófilos	Activa STAT6 lo que promueve el cambio de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en los linfocitos B hacia el isotipo IgE, inhibe el cambio de isotipo hacia IgG2a y IgG3 en ratones. Antagonista de los efectos de activación de los macrófagos por IFN- $\gamma$ .
<b>IL-13</b>	Linfocitos Th2	Se presenta en cantidades incrementadas en las vías respiratorias de asmáticos y tiene actividades biológicas similares a la IL-4, es producida por linfocitos Th2 y células epiteliales.
<b>IL-5</b>	Linfocitos Th2, mastocitos y eosinófilos	Factor de crecimiento y diferenciación de eosinófilos, induce la liberación de histamina en basófilos y mastocitos.
<b>IL-9</b>	Linfocitos T	Estimula la proliferación de linfocitos T activos, aumenta la producción de IgE por las células plasmáticas, promueve la proliferación y diferenciación de mastocitos, expresión del receptor FC $\epsilon$ RI, además induce la expresión de quimiocinas de la familia CC por las células del epitelio respiratorio.
<b>IL-25</b>	Linfocitos T CD4+ y mastocitos	Esta citocina de la subfamilia de la IL-17 promueve el microambiente Th2.
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Linfocitos T y células	Relacionado con respuesta de tipo Th1, sin embargo en modelos animales de asma atópica y en aislados clínicos de pacientes asmáticos esta citocina parece ser uno de los

	NK, macrófagos	mediadores involucrados en el proceso inflamatorio, se relaciona en mayor proporción con etapas crónicas de la enfermedad, induce la expresión de genes de quimiocinas como CXCL10.
<b>TNF<math>\alpha</math>, IL-1</b>	Macrófagos activados y células somáticas	Induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y la síntesis de quimiocinas como CCL13 y citocinas que estimulan a los fibroblastos y células musculares lisas participando de forma activa en las primeras etapas del proceso inflamatorio y en proceso de remodelación del tejido.
<b>IL-10</b>	Linfocitos Th2, T CD8+, B activados y macrófagos.	Inhibe la producción de citocinas Th1 y promueve la respuesta de anticuerpos, suprime la inmunidad celular

**Tabla 4.-** Principales citocinas involucradas durante el proceso de inflamación alérgica pulmonar.

**Metaloproteinasas de matriz extracelular.-** Las metaloproteinasas (MMPs) son una familia de proteinasas que aumentan su expresión durante el proceso inflamatorio pulmonar. Las MMPs tienen una actividad catalítica dependiente de un predominio y un sitio de unión a Zinc, se clasifican de acuerdo al sustrato al cual proteolisan como las colagenasas, gelatinasas etc. Las MMPs son responsables de la remodelación de la matriz extracelular de forma normal, sin embargo, durante el proceso inflamatorio contribuyen de forma importante con el desarrollo de fibrosis y la migración de leucocitos del espacio vascular al sitio de inflamación mediante la ruptura de uniones intercelulares (29).

MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-12 son las MMPs que se encuentran elevadas de forma importante en asma. MMP-9 en el pulmón es producida por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos, mastocitos y células dendríticas. MMP-9 inhibe la migración de neutrófilos pero no participa de forma directa en la eosinofilia, sin embargo, junto con el TGF- $\beta$ 1 inducen fibrosis pulmonar; también es importante en la activación de células T mediada por células dendríticas. ADAM 33 es una metaloproteína con función desconocida que es expresada por fibroblastos, miofibroblastos y células musculares pero no en linfocitos u otras células inflamatorias, por lo cual, se relaciona con el proceso de remodelación (30).

**Adenosina.-** La adenosina es generada por la desfosforilación de nucleótidos de adenina liberados por las células presentes en el infiltrado inflamatorio, en asma la adenosina se encuentra aumentada en torrente sanguíneo y vías respiratorias induciendo broncoconstricción y daño directo al epitelio.

---

La adenosina se une a receptores acoplados a proteínas G presentes en eosinófilos, mastocitos, macrófagos, células epiteliales, musculares lisas y neuronas. La adenosina es removida normalmente por la enzima adenosina desaminasa (ADA) o la adenosina cinasa, la expresión de estas enzimas es inhibida de forma importante por la IL-13 promoviendo la acumulación de adenosina que a su vez estimula la producción de IL-13. (66).

## **1.16 QUIMIOCINAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR**

Las quimiocinas controlan el reclutamiento de célula inflamatorias al pulmón, y su sobre expresión en las vías respiratorias de pacientes asmáticos indican la relación que existe entre el proceso inflamatorio y la presencia de estas moléculas.

*1.16.1 Quimiocinas CXC y su participación en la inflamación alérgica pulmonar:* Quimiocinas de esta familia han sido identificadas en aislados clínicos de pacientes asmáticos, especialmente CXCL8 (IL-8) que se relaciona con la acumulación de neutrófilos horas después del contacto con el alérgeno, además de ser producida por eosinófilos presentes en el infiltrado inflamatorio; otras quimiocinas CXC como CXCL10, CXCL5 se ven aumentadas en las primeras horas posteriores al contacto con el alérgeno, principalmente CXCL5 que es producida por los mastocitos después de ser activados. CXCL10 es una quimiocina producto de un gen inducible por IFN $\gamma$ , atrae monocitos, linfocitos T y célula NK. CXCL12 esta relacionada con la remodelación del tejido vía angiogénesis que ocurre durante el proceso de inflamación crónica en asma, esta quimiocina también se relaciona con el aumento de vascularización de las vías respiratorias en pacientes asmáticos.

*1.16.2 Quimiocinas CC.-*Las quimiocinas de la familia CC se relacionan directamente con procesos de inflamación crónica, en el caso de asma alérgica diversas quimiocinas de esta familia resultan involucradas en el desarrollo y prolongación de la inflamación, principalmente CCL11, CCL24, CCL5, CCL20, CCL1, CCL3, CCL19 y la subfamilia de las MCPs (76).

La eotaxina-1/CCL11 es una de las quimiocinas más relevantes ligadas al reclutamiento de eosinófilos y por lo tanto involucrada en procesos alérgicos como el asma, esta quimiocina fue aislada por primera vez en lavados broncoalveolares de cobayos sometidos a modelos de inflamación alérgica pulmonar, los homólogos murino y humano fueron clonados posteriormente (77, 78).

---

Eotaxina 1,2 y 3 activan y reclutan eosinófilos vía CCR3, los diferentes papeles de estas quimiocinas no están bien establecidos, se cree que CCL11 es un importante mediador en el reclutamiento y activación de eosinófilos durante la fase temprana de la inflamación mientras que CCL24 y 26 podrían tener un papel importante en la persistencia de la eosinofilia (79).

En la tabla 5 se resumen las principales quimiocinas involucradas en la respuesta alérgica pulmonar así como sus principales implicaciones durante este proceso inflamatorio.

<i>QUIMIOCINA</i>	<i>ACTIVIDAD</i>
<b>CCL2</b>	Reclutamiento de monocitos, célula dendríticas, célula T de memoria, basófilos, mastocitos y célula NK ,activa a los basófilos promoviendo la liberación de histamina e IL-4 ,la síntesis de colágeno y producción de factores como TGF- $\beta$ , contribuyendo en el desarrollo de fibrosis.(80)
<b>CCL5</b>	Quimioatrayente de eosinófilos y linfocitos T activos relacionada con procesos alérgicos, es expresada por célula residentes del tejido respiratorio. (81)
<b>CCL7</b> <b>CCL8</b>	Estas quimiocinas fueron aisladas por primera vez de una línea celular humana de osteosarcoma, atraen monocitos, activan basófilos y a diferencia de CCL2 son quimioatrayentes y activadores de eosinófilos, CCL7 también atrae célula dendríticas.(80)



<b>CL11,24,26</b>	Eotaxina 1,2 y 3 activan y reclutan eosinófilos vía CCR3, los diferentes papeles de estas quimiocinas no están bien establecidos, CCL11 es un importante mediador en el reclutamiento y activación de eosinófilos durante la fase temprana de la inflamación.(82)
<b>CCL13</b>	Induce la migración de eosinófilos, basófilos, célula dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos T. Activa el estallido respiratorio en eosinofilos y la expresión de CD11b. Promueve la liberación de histamina en basófilos. (83)

**Tabla 5.** Quimiocinas involucradas en la respuesta alérgica pulmonar.

### ***1.16.3 CCL13 y su importancia en procesos inflamatorios***

CCL13 (*MCP-4*) es una quimiocina capaz de activar células mediante su interacción con los receptores de quimiocina CCR1, CCR2 y CCR3; CCL13 induce la migración de eosinófilos, basófilos, células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos T, su expresión se ve aumentada en diversas enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios incluyendo el asma (83). CCL13 fue clonada utilizando una sonda derivada de la quimiocina CCL11. CCL13 promueve la liberación de histamina de mastocitos y basófilos y el estallido respiratorio en eosinófilos. Ensayos de quimiotaxis *in vitro* demuestran que CCL13 es capaz de promover la migración de eosinófilos murinos. (77)

El gen de CCL13 se localiza en el cromosoma 17. El cADN humano de CCL13 contiene 294pb, la quimiocina contiene 75 aminoácidos con un residuo de glicina en el extremo amino terminal que es característico de las quimiocinas de la subfamilia MCP, tiene un peso de 8599Da y un punto isoeléctrico de 10. CCL13 se relaciona en un 65 % de identidad con la eotaxina y entre 53-54% con las MCPs. CCL13 se expresa de forma constitutiva en intestino delgado, colon, pulmones y en bajos niveles en corazón, placenta y timo. En pulmones CCL13 se expresa constitutivamente, lo que supone que esta quimiocina regula el tráfico leucocitario basal en estos órganos (83).

CCL13 es considerado un biomarcador presente en lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos, esta quimiocina es un participante importante durante la respuesta inflamatoria pulmonar debido a su potente actividad como quimioatrayente de eosinófilos, además de promover la liberación de histamina en mastocitos y basófilos.(83, 84, 85, 86) La producción de CCL13 se

relaciona con la etapa secundaria del proceso inflamatorio después de la disminución del máximo de expresión de CCL11, CCL13 junto con CCL24 y 26 parecen ser responsables del establecimiento prolongado de la eosinofilia. La producción de CCL13 en células circulantes es inhibida por IL-4, mientras que en células epiteliales pulmonares la IL-4 favorece la expresión de CCL13, lo que regula el establecimiento de un gradiente quimiotáctico en el tejido inflamado. CCL13 también es expresada por células endoteliales y epiteliales activadas por TNF e IL-4, además de expresarse en la pared del endotelio vascular donde promueve la migración (83, 86, 87, 88).

### 1.17 PRINCIPALES RECEPTORES DE QUIMIOCINAS INVOLUCRADOS EN ALERGIA PULMONAR

CCR3 es el principal receptor de quimiocina expresado en células inflamatorias durante el proceso alérgico, esta expresión se da principalmente en eosinófilos, basófilos, mastocitos y linfocitos con fenotipo Th2 CD4+; este receptor se ha identificado en humanos, monos, ratones, ratas y cobayos.(89) CCR3 une varias quimiocinas como CCL11, CCL24, CCL26 y CCL13 con alta afinidad, y a CCL5 y CCL7 con menor afinidad (90, 91). Los ligandos de CCR3 son producidos por una gran variedad de célula durante el proceso de inflamación, incluyendo los fibroblastos, células epiteliales, células del endotelio vascular, músculo liso, macrófagos, mastocitos y eosinófilos. Además de CCR3 gran variedad de receptores de quimiocinas resultan involucrados durante el proceso alérgico.(92) En la tabla 6 se resumen los principales receptores de quimiocina involucrados en al respuesta inflamatoria pulmonar.

<i>Receptor</i>	<i>Evidencias clínicas de su papel en la inflamación alérgica pulmonar</i>	<i>Ratones deficientes o transgénicos sometidos a modelos de inflamación alérgica pulmonar</i>
CCR2	Incremento en la expresión de sus ligandos	CCR2 <sup>-/-</sup> presenta hiperreactividad elevada , mayor eosinofilia y mayores niveles de IgG1 e IgE comparado con la cepa silvestre sometida a un protocolo similar de inflamación
CCR3	Incremento en la expresión de sus ligandos en aislados de esputo, biopsias de tejidos, LBA. Principal receptor involucrado en la eosinofilia en pacientes asmáticos	Disminución en el infiltrado de eosinófilos y disminución en la hiperactividad bronquial
CCR4	Incremento en los niveles séricos de CCL17 en pacientes asmáticos, colocalización de linfocitos T CCR4+ con CCL22 y CCL17 en biopsias bronquiales.	Disminución en la inflamación, hiperreactividad bronquial y remodelación del tejido

CCR5	Incremento en la expresión de sus ligandos	Disminución en el infiltrado de eosinófilos y disminución en la hiperactividad bronquial
CCR8	Receptor presente en linfocitos Th2 aislados de biopsias o LBA	Disminución no significativa en la producción de citocinas Th2 y eosinofilia.
CXCR4	Expresión incrementada de este receptor en eosinófilos aislados de LBA de pacientes asmáticos	Reducción de los parámetros relacionados con la inflamación

**Tabla 6.** Principales receptores de quimiocina involucrados en la inflamación alérgica pulmonar. (Modificada de Zimmermann, N et al, 2003)

## 1.18 MODELOS ANIMALES DE INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR

Las características del proceso de inflamación alérgica pulmonar se han reproducido en diversos modelos animales utilizando principalmente: ratones, ratas, cuyos, conejos, perros, gatos, ovejas, puercos y algunos primates. Varias de estas especies desarrollan un proceso comparable con lo que ocurre en humanos, sin embargo en algunos casos los modelos resultan poco viables debido al tamaño de los animales y el costo que representa la manutención. Por estas razones el modelo animal de inflamación alergia pulmonar más utilizado y estudiado en la actualidad es el desarrollado en ratones (93).

### 1.18.1 Modelos de asma alérgica en ratón

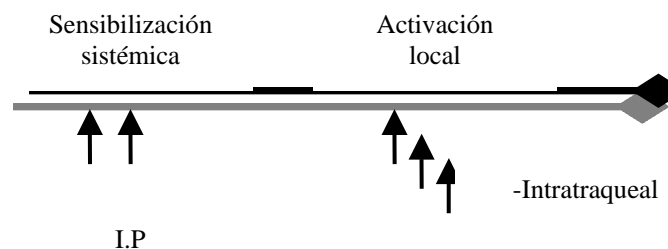
En la actualidad existen un gran variedad de modelos de inflamación alérgica pulmonar en ratón, sin embargo todos estos protocolos se basan en una sensibilización sistémica con el alergeno en compañía o ausencia de un adyuvante para generar memoria inmunológica, que permite el desarrollo de la respuesta inflamatoria en posteriores contactos locales con el alergeno en forma localizada en las vías respiratorias. (94).

***Alergenos y adyuvantes utilizados en los modelos murinos de asma.***-El alergeno más comúnmente utilizado en los modelos murinos de inducción de asma la ovo-albúmina, que como antígeno modelo y por si sola presenta una baja inmunogenicidad y requiere ser administrada junto con adyuvantes (94). El concepto clásico de adyuvante los describe como sustancias capaces de “potenciar” la respuesta inmune ya sea de anticuerpos o celular. Sin embargo actualmente se están comenzando a utilizar alergenos que comúnmente causan asma en humanos como pólenes de flores y moléculas purificadas derivadas de ácaros como *Der p 1* y *Der p 2*.(50)

---

El adyuvante comúnmente utilizado en los modelos murinos de inflamación alérgica pulmonar es el hidróxido de aluminio (Alum) en emulsión, la capacidad de este compuesto de incrementar las propiedades inmunogénicas fueron descubiertas en 1926 al ser administrado junto con la toxina diftérica. Alum fue el primer adyuvante aceptado para uso humano. Al administrar OVA junto con Alum este induce la formación de granulomas en el sitio de aplicación, lo cual incrementa la fagocitosis del antígeno por los macrófagos. Estudios del perfil de isotipo han mostrado que la administración de Alum es IgG1 e IgE así como linfocitos con fenotipo Th2 (95).

**Vía de administración y dosis del alérgeno.**-En la mayoría de los protocolos se inicia con una sensibilización intraperitoneal de OVA emulsificada en Alum seguida de una o varias reexposiciones (activación o *challenge*) del alérgeno vía intranasal, intratraqueal o vía aerosoles por nebulización. En la figura 7 se muestra un esquema del protocolo para inducir una inflamación alérgica pulmonar en ratón (94).



**Fig 7.** Esquema del protocolo clásico para la inducción de inflamación alérgica pulmonar en ratón.

**1.16.2 Características de los modelos murinos de inflamación alérgica pulmonar.**-Los modelos de asma inducida en ratón presentan generalmente hiperreactividad bronquial, inflamación broncopulmonar, incremento de IgE en suero, hipersecreción de moco, eosinofilia, niveles elevados de quimiocinas pro inflamatorias, citocinas Th2 y cambios estructurales de las vías respiratorias en modelos crónicos. Todas estas características se comparten con las que se presentan en humanos, sin embargo la inflamación en los animales es inducida por grandes cantidades de alérgeno mientras que en humanos el proceso alérgico se desarrolla al contacto con concentraciones menores del antígeno y de forma espontánea.(96)

---

## 2.0 ANTECEDENTES

El desarrollo de una respuesta caracterizada por anticuerpos IgE se comenzó a comprender hasta que las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ Th1 y Th2 fueron descubiertas. Los elevados niveles de citocinas producidas por los linfocitos Th2 presentes tanto en pacientes atópicos como en modelos animales demostraron que la inflamación alérgica pulmonar es dependiente de la presencia de linfocitos TCD4+ con fenotipo Th2, esto se confirmó posteriormente con la utilización de ratones deficientes en genes de citocinas como IL-4 e IL-13 (75).

La inflamación alérgica pulmonar se caracteriza por la presencia de eosinofilia pulmonar. La importancia de los eosinófilos en el daño al tejido pulmonar esta basado en observaciones clínicas que correlacionan con el número de eosinófilos y su acumulación en el epitelio con la gravedad del síndrome (97). Los eosinófilos están implicados de forma importante en la patofisiología de la inflamación alérgica pulmonar y quimiocinas como CCL11, CCL13, tienen la capacidad de inducir el reclutamiento de eosinófilos vía unión a su receptor CCR3 (64).

Para el tratamiento del asma alérgica se emplean diversos fármacos como  $\beta$ -agonistas, glucocorticoides inhalados y anticolinérgicos. Los fármacos utilizados actualmente para tratar el síndrome asmático no son muy eficientes, causan efectos secundarios y pueden generar tolerancia en algunos pacientes (98).

La creación de nuevos fármacos basados en el conocimiento de la respuesta inmune local han sido investigados, desde la inhibición de citocinas y sus receptores utilizando anticuerpos monoclonales, principalmente sobre citocinas secretadas por células Th2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, bloqueo de receptores de IgE, así como neutralización de IgE soluble, inhibidores de leucotrienos, etc (61, 75, 99).

Hasta el momento, los inhibidores de vías de síntesis de leucotrienos se utilizan con éxito en el tratamiento, sin embargo la utilización de esta “nueva generación” de fármacos no reduce de forma rápida y efectiva los síntomas del síndrome asmático si no son administrados junto con algún otro antiinflamatorio inespecífico (61).

---

Actualmente, más de 50 quimiocinas y 20 receptores han sido caracterizados. Los receptores de quimiocina, resultan importantes blancos para la creación de antagonistas, ya que pertenecen al grupo de receptores mas exitosamente bloqueados farmacológicamente (4).

La producción de antagonistas de CCR3 fueron los primeros candidatos en desarrollo de terapias para el asma. Esto sustentado en estudios previos utilizando ratones deficientes en el receptor CCR3 sometidos a protocolos de alergia pulmonar, en donde se observó una disminución en la eosinofilia (100).

El extremo amino terminal de las quimiocinas juega un papel crucial sobre su actividad biológica. Estudios de función-estructura realizados con la quimiocina MCP-1/CCL2 demostraron la importancia de la integridad del extremo amino terminal principalmente los aminoácidos del 1-10 para MCP-1. En este mismo estudio se observa que variaciones de la quimiocina truncada presentan una actividad antagonista en ensayos de quimiotaxis *in vitro* utilizando monocitos humanos de la línea celular THP-1. (101) Estas observaciones con MCP-1 se comparan con resultados obtenidos estudiando quimiocinas de la familia CXC principalmente CXCL8, en donde los residuos 4, 5 y 6 son esenciales para la unión al receptor y función de esta quimiocina (37).

*In vivo* la proteólisis de quimiocinas por proteasas de la familia de las MMPs valida la utilización de quimiocinas modificadas o péptidos derivados de las mismas como agentes antiinflamatorios, ya que esta proteólisis natural parece tener una importante participación en la pérdida de actividad quimioatrayente de quimiocinas (30).

En estudios realizados *in vitro*, se demuestra la actividad proteolítica de MMPs recombinantes sobre las quimiocinas de la subfamilia MCPs, los productos sintéticos obtenidos de estas proteólisis no presentan actividad quimioatrayente en células pre-B transfectadas con CCR2 y CCR3, así mismo productos de las quimiocinas CCL7, CCL8 y CCL13 presentaron una actividad antagonista en ensayos *in vitro* de quimiotaxis. La quimiocina CCL13 es cortada por MMP2 en el aminoácido 8 generando una proteína incompleta que es capaz de unirse a CCR2 sin generar señales de activación actuando como antagonista (30).

Quimiocinas modificadas sintéticamente como Met-RANTES/CCL5, que solo difiere de la molécula original en la adición de una metionina en el extremo amino terminal y AOP-RANTES/CCL5 que presenta un grupo aminopentano en el extremo N-terminal de CCL5, no pierde

---

la capacidad de unión a sus receptores, sin embargo no son capaces de inducir señalización vía CCR1 y CCR5 no así para CCR3 y al ser administrado en modelos *in vivo* de inflamación como artritis inducida por colágena, glomerulonefritis y alergia pulmonar inducida por OVA, previenen de forma considerable la acumulación del infiltrado inflamatorio (102).

Otras quimiocinas modificadas en los dominios de unión a GAGs como CCL7 y 5 presentan una actividad inhibitoria sobre el infiltrado celular en modelos *in vivo* de inflamación, sin embargo *in vitro* conservan la misma actividad que la quimiocina silvestre. Dentro de las quimiocinas involucradas en procesos inflamatorios se encuentra CCL13, cuando se describió, la quimiocina que se genero de manera recombinante contenía una cola de histidina en el extremo amino terminal, esto como estrategia para poder ser purificada por cromatografía en columnas de afinidad. Esta proteína con las histidinas adicionadas presentó una actividad muy reducida en ensayos de quimiotaxis *in vitro* comparada con la proteína silvestre; la eliminación de la cola de histidina utilizando el factor Xa resultó en la recuperación de actividad clásica de CCL13. Estos estudios indican el efecto importante en cuanto a actividad que se produce al modificar el extremo amino terminal de las quimiocinas (83).

Para estudiar como modificaciones en la estructura primaria de CCL13 podrían modular respuestas biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*, así como para estudiar el mecanismo por el cual CCL13 se une a sus receptores (CCR1, 2 y 3), ya que no se conocen por completo, en el laboratorio se estudiaron diversos péptidos derivados de la estructura primaria de CCL13. Los péptidos derivados de esta quimiocina fueron estudiados en pruebas de quimiotaxis *in vitro* y activación de flujo de calcio intracelular. En este trabajo se muestra la actividad de un péptido derivado de la estructura primaria de CCL13. CDIP-2, este péptido fue capaz de antagonizar la función de quimiocinas *in vitro* y reducir el infiltrado celular en modelos *in vivo* de inflamación.

Ensayos de quimiotaxis *in vitro* realizados en el laboratorio, utilizando líneas celulares de monocitos humanos y monocitos humanos aislados de sangre periférica, demostraron que CDIP-2 no presenta actividad agonista sobre la quimiotaxis de estas células (10-10000 ng/mL) utilizando CCL13 como control. Este péptido tampoco indujo flujos de calcio intracelulares en células THP-1 (0-20 µg/mL). En experimentos de quimiotaxis *in vitro* para estudiar la actividad antagonista de los péptidos, células THP-1 fueron preincubadas con diferentes concentraciones de CDIP-2 antes de ser expuestas al quimioatrayente, se obtuvo un porcentaje de inhibición de la migración cercano al 90% a concentraciones arriba de 10µg/mL del péptido.

---

En ratones sometidos a un modelo de peritonitis inducida por tioglicolato, la administración de CDIP-2 (25µg totales por animal), 24 horas después de la inyección del tioglicolato presentaron una importante reducción en el número de células obtenidas del peritoneo, 72 horas después de la administración del agente inflamatorio, con respecto a los animales no tratados con CDIP-2, en estos experimentos también se incluyó un grupo de animales tratados con CDIP-1, sin embargo el efecto en la reducción del infiltrado inflamatorio no fue tan significativo.

Estudios de citotoxicidad en células mononucleares humanas obtenidas de sangre periférica así como de líneas celulares incubadas con diferentes concentraciones de CDIP-2 a diferentes tiempos de incubación, no se observó una reducción en el % de viabilidad celular.

Para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas en asma se recurre al uso de modelos animales. Las quimiocinas modulan la activación y reclutamiento de eosinófilos y células T CD4+ dentro de los pulmones de animales sometidos a protocolos de inflamación alérgica pulmonar, por lo cual estos modelos animales resultan importantes en el estudio del proceso inflamatorio (103).

El protocolo de alergia pulmonar utilizado en este trabajo se caracteriza por una inflamación con infiltrado celular perivascular y peribronquial, presencia de citocinas Th2 (Inmunohistoquímica) IL-4, IL-13, IL-5, quimiocinas como CCL2, CCL24, CCL12, producción exacerbada de moco (tinción de PAS), así como anticuerpos IgE e IgG1 específicos anti OVA en suero (102).

En experimentos previos al que se muestra en este trabajo se incluyeron grupos experimentales tratados con CDIP-1 y CCL13 sin embargo no se observó una modificación significativa del proceso inflamatorio.



---

### **3.0 JUSTIFICACIÓN**

La inhibición del reclutamiento celular representa una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios como el asma. Las quimiocinas y sus receptores son las principales moléculas involucradas en el reclutamiento celular durante el proceso inflamatorio, por lo que representan un blanco para investigar la generación de nuevas terapias antiinflamatorias.

### **4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a la actividad antagonista sobre la migración celular producida por el péptido CDIP-2 en experimentos *in vitro*, se plantea investigar el posible efecto antiinflamatorio que tendría la administración de CDIP-2, durante un proceso alérgico pulmonar *in vivo* inducido por OVA.

### **5.0 HIPÓTESIS**

La administración del péptido antagonista CDIP-2 en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar tendrá un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento celular a nivel pulmonar.

---

## **6.0 OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar el efecto producido por la administración de CDIP-2 en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.

### **6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto inhibitorio de CDIP-2 sobre el reclutamiento celular de eosinófilos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos.
- Estudiar el efecto de CDIP-2 sobre la expresión a nivel mRNA de citocinas y quimiocinas como: IL-4, IL-5, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , CCL2, ICC, CCL12.
- Estudiar el efecto de CDIP-2 sobre la expresión a nivel mRNA de receptores de quimiocina: CCR1, CCR2, CCR3, CCR5.

---

## 7.0 METODOLOGÍA

En el Apéndice I se describen en detalle cada una de las metodologías experimentales empleadas. En el Apéndice II se describen los reactivos y soluciones utilizadas durante el desarrollo de este trabajo.

### MODELO EXPERIMENTAL:

El modelo animal utilizado en este trabajo se caracteriza por la presencia de una inflamación alérgica pulmonar, con una duración de 16 días, las características que se generan, en este protocolo experimental fueron previamente caracterizadas (102).

En cada experimento se utilizaron 30 ratones hembras de la cepa Balb/c, los cuales se dividieron en tres grupos con 10 animales cada uno: Grupo 1 tratamiento con el vehículo SSI, Grupo 2 tratamiento con OVA, Grupo 3 tratamiento con OVA y administración de CDIP-2 (<sup>19</sup> KISLQRLKSYVITTSRCPQ<sup>37</sup>).

El protocolo consistió en la administración intraperitoneal de 10 µg de OVA emulsificados en 1 mg de Alum (Pierce) como adyuvante los días 0 y 5 del experimento lo que sensibilizó de forma sistémica contra el antígeno modelo, posteriormente (día 12), se aplicó, vía intratraqueal una solución de OVA al 0.75% en SSI (102). El tratamiento con CDIP-2 se realizó 72 horas después del reto local con OVA (50 µg de CDIP-2 en un volumen total de 100 µL de SSI) por vía intratraqueal.

A continuación se describe en detalle el protocolo experimental utilizado en el modelo de alergia pulmonar inducido por OVA lo que se resume en la figura 8.

**Día 0 y 5:** Se administró por vía intraperitoneal 10 µg de OVA emulsificados en 1 mg de Alum como adyuvante en volumen final de 100µL con SSI (Un total de 20 animales). A un grupo de 10 animales solamente se les administró SSI.

**Día 12:** Se administró por vía intratraqueal en un volumen total de 100 µL una solución de OVA 0.75% en SSI a 20 animales y a los 10 restantes únicamente se les administró SSI.

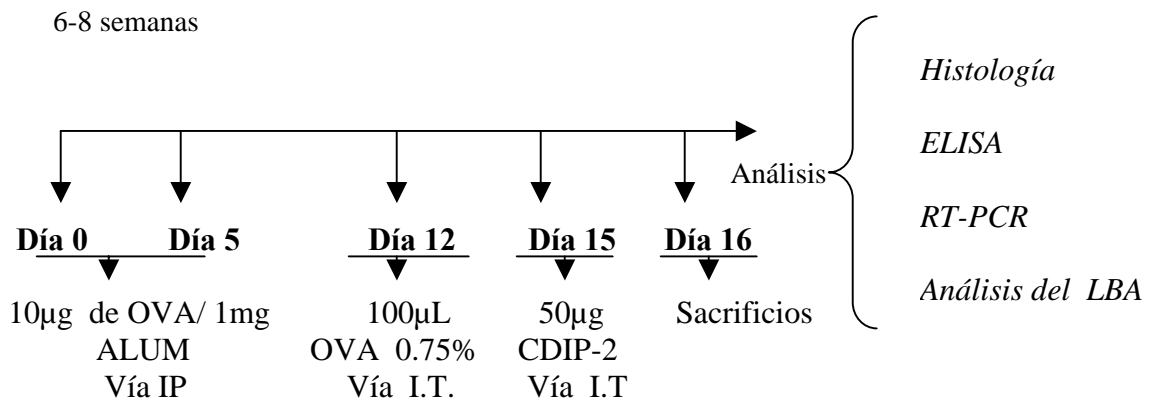
**Día 15** Se administró al grupo 3 por vía I.T CDIP-2, 50 µg de péptido en un volumen total de 100 µL, se utilizó SSI como vehículo, al resto de los animales se les administró únicamente SSI.

---

**Día 16:** Análisis del efecto de CDIP-2: Se administró por vía I.P. Fenobarbital sódico, una vez anestesiados los animales se sangraron por punción cardiaca.

En la siguiente figura se resume el protocolo empleado durante el desarrollo experimental del modelo animal.

Ratones Balb/c hembras



**Fig 8.** Esquema del protocolo empleado durante el desarrollo experimental del modelo animal.

Posteriormente se obtuvieron para su análisis (Ver detalles en Apéndice I):

- A) Sueros.
- B) Lavados broncoalveolares: Fluido y células.
- C) Tejido pulmonar.

### **OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES**

Las células obtenidas de los LBA se contaron en una cámara de Neubauer. Con una centrífuga citospin se realizaron citopreparaciones que fueron teñidas con colorante de Wright ajustando a un número total de  $2 \times 10^4$  células por laminilla; de estas preparaciones se diferenciaron por morfología los macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos en un microscopio óptico, contando 300 células totales por muestra analizada.

### **DETERMINACIÓN DE IL-4 EN SUERO Y LBA**

---

Por el método de ELISA, utilizando un paquete comercial (Opt EIA, BD®), se determinó tanto en suero como en LBA la cantidad de IL-4. Para los sueros se utilizó en todos los experimentos una dilución 1:10 y para el caso del LBA se utilizaron por cada pozo de la placa 100µL sin diluir del primer mililitro de fluido del LBA recuperado. Cada muestra se analizó por triplicado.

## **DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS ANTI OVA EN SUERO**

La sangre obtenida de los animales se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm, el suero obtenido se separó del paquete celular y se almacenó a -70°C. Los sueros se utilizaron para determinar mediante ELISA la presencia de IgE, IgG1 e IgG2a, específicos contra OVA (Ver detalles en Apéndice I).

## **ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO PULMONAR**

Después que los animales fueron sacrificados, los pulmones se fijaron con 1mL de etanol absoluto, los pulmones fueron embebidos en parafina y procesados para su análisis. Las secciones de tejido obtenidas se tiñeron por las tinciones de hematoxilina/eosina y ácido periódico Schiiff (PAS).

Para el análisis cuantitativo del infiltrado inflamatorio se utilizó el software Motic Image Plus 2.0 (Motic Instruments Inc., British Columbia, CA).

## **RT-PCR PARA QUIMIOCINAS, RECEPTORES DE QUIMIOCINA Y CITOCINAS**

La cantidad de ARN mensajero de las quimiocinas, receptores de quimiocina y citocinas en el tejido pulmonar de animales tratados y no tratados, se analizó por RT-PCR. A partir de tejido pulmonar se extrajo ARN total por el método de Trizol. Un total de 5 µg de dicho ARN previamente tratado para eliminar restos de ADN se empleó para sintetizar cADN de una cadena, utilizando la enzima M-MLVRT. Para la reacción de RT-PCR se emplearon pares de oligonucleótidos específicos para cada receptor, citocina y quimiocina analizada así como de la β-Actina como control interno.

Para el análisis por PCR tiempo real se utilizaron 2 µL de cADN obtenido por muestra, utilizando como reportero fluorescente el reactivo SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems). Este compuesto se intercala entre la doble cadena de ADN dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto amplificado.

---

El análisis de los resultados se realizó con el software ABI Prisma 7000 SDS. Para analizar la expresión de los diferentes genes estudiados se utilizó la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , donde el 2 expresa la máxima eficiencia de amplificación de un par de oligonucleótidos bajo las condiciones experimentales utilizadas (106). El valor de  $\Delta\Delta CT$  se obtiene a partir de la ecuación:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\beta\text{-Actina}} - CT_{\text{Gen analizado}})_{\text{OVA u OVA +CDIP-2}} - (CT_{\beta\text{-Actina}} - Ct_{\text{Gen analizado}})_{\text{Control de SSI}}$$

Donde CT se refiere al ciclo de amplificación exponencial de cada par de oligonucleótidos, el cual se determinó a partir de la gráfica de amplificación de fluorescencia (106), con respecto al ciclo de amplificación presentada por el Software ABI Prism 7000 al final de cada experimento.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron analizados utilizando la prueba de *t de student*. Para determinar la diferencia significativa entre grupos. Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como significativos.

---

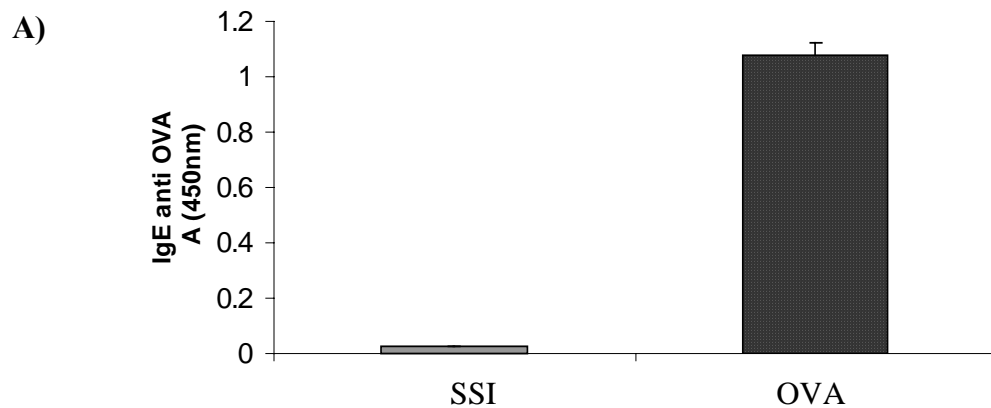
## 8.0 RESULTADOS

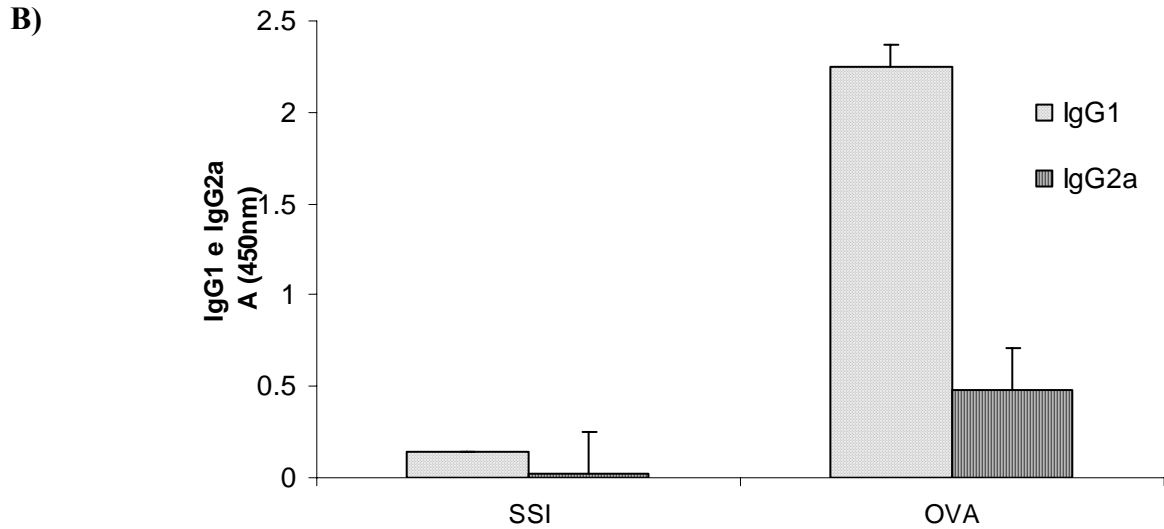
### 8.1 EL MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO PRESENTA CARACTERÍSTICAS DE UN PROCESO INFLAMATORIO ALÉRGICO.

En sueros de los ratones sometidos al modelo de alergia pulmonar y sueros de ratones tratados solo con SSI, se determinó la presencia de los anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos anti OVA (Fig 8.1). Se observaron diferencias significativas en los niveles de IgE e IgG1 obtenidos entre el grupo de OVA y el grupo de SSI. Estos resultados representan a dos experimentos independientes.

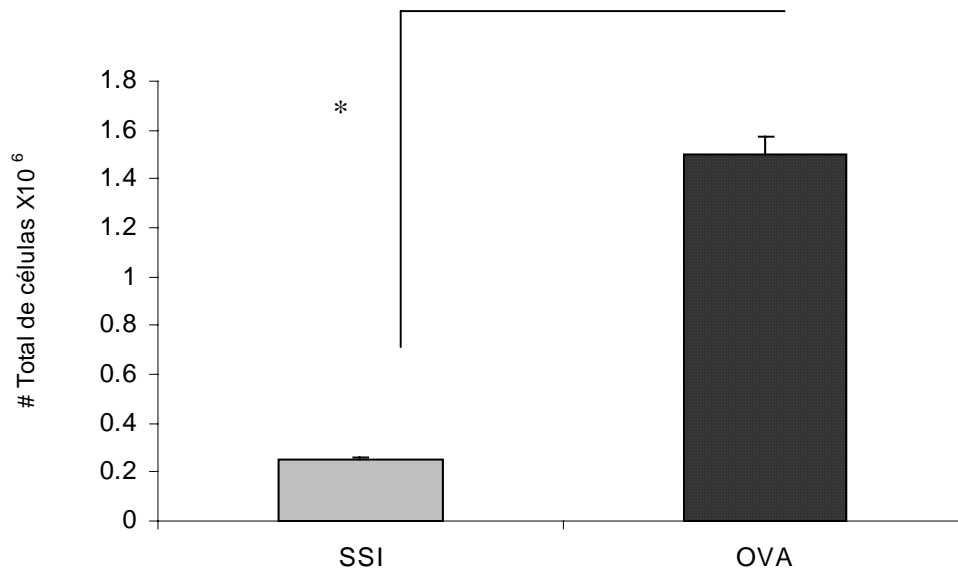
En la figura 8.2 se muestran el número total de células presentes en los LBA de animales tratados con OVA y con SSI; observando un aumento significativo en el número total de células recuperadas en los LBA de animales alergenizados con OVA.

En la figura 8.3 se presenta el número de eosinófilos obtenidos de los LBA, de los animales alergenizados con OVA, lo que demuestran la presencia de eosinofilia, en los LBA, característica importante de los modelos de alergia pulmonar, con respecto a los animales tratados con SSI, donde el número de eosinófilos es mínimo.



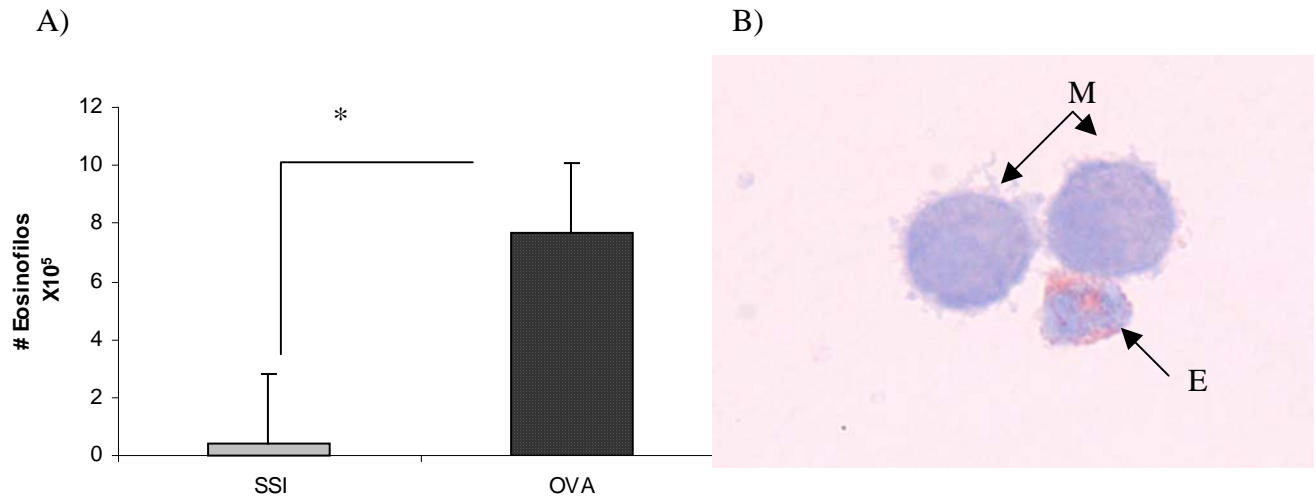


**Fig. 8.1** Los animales alergenizados con OVA presentan inmunoglobulinas antigeno específicas en suero: A) IgE, B) IgG1 e IgG2a, en el suero de los ratones sometidos al modelo de inflamación alérgica pulmonar con respecto a los animales tratados únicamente con solución salina isotónica. Se presenta gráficamente la Absorbancia (A) obtenida a 450 nm. Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los animales tratados con SSI \* ( $P < 0.05$ ).



**Fig 8.2** Los animales alergenizados con OVA presentan un aumento en el número de células en los LBA: Ratones sometidos al modelo de alergia pulmonar con respecto a los animales tratados únicamente con SSI, diferencia estadísticamente significativa \* ( $P < 0.05$ ).





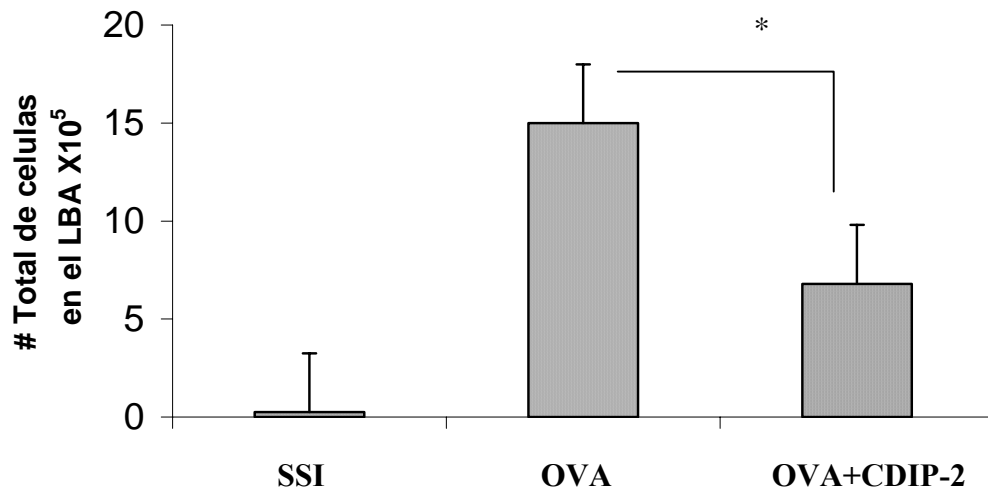
**Fig 8.3** A) Los animales sometidos al modelo experimental presentan eosinofilia en LBA. \*Diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). B) En la figura se muestra un eosinófilo (E) y macrófagos (M) recuperados de LBA.

## 8.2 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 DISMINUYE EL NÚMERO DE CÉLULAS PRESENTES EN LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES.

Para evaluar el efecto de CDIP-2 sobre el proceso inflamatorio alérgico, el péptido se administró vía intratraqueal 72 horas después del reto con OVA. En la figura 8.4, se presentan los resultados del número total de células de LBA. Estos resultados corresponden al promedio de 2 experimentos independientes.

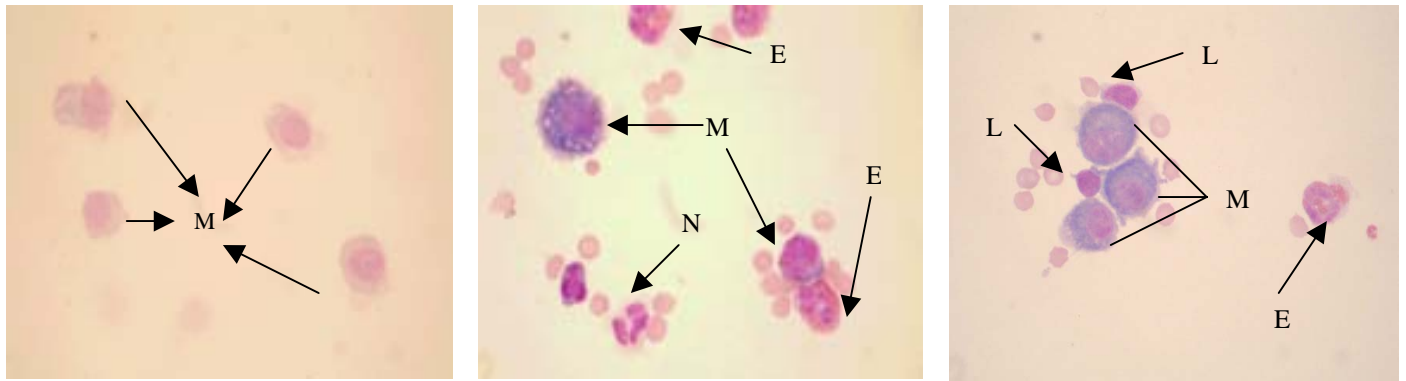
En la figura 8.5 se muestran fotografías de las células obtenidas de LBA de cada grupo experimental, indicando con flechas las diferentes poblaciones celulares diferenciadas.

En la fig 8.6 se presentan gráficamente los resultados obtenidos de la cuenta diferencial de células recuperadas de LBA. Se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de eosinófilos, monocitos/macrófagos así como linfocitos en LBA de los animales tratados con CDIP-2 con respecto a los animales no tratados con el péptido y alerginizados con OVA.

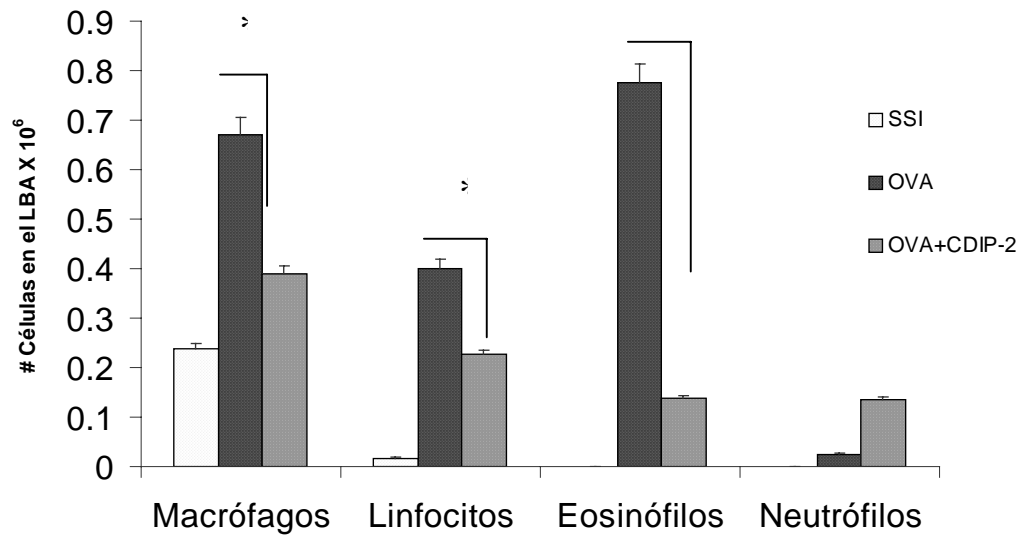


**Fig. 8.4: A) El tratamiento con CDIP-2 disminuyó el número de células totales presentes en los LBA**

\*Diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).



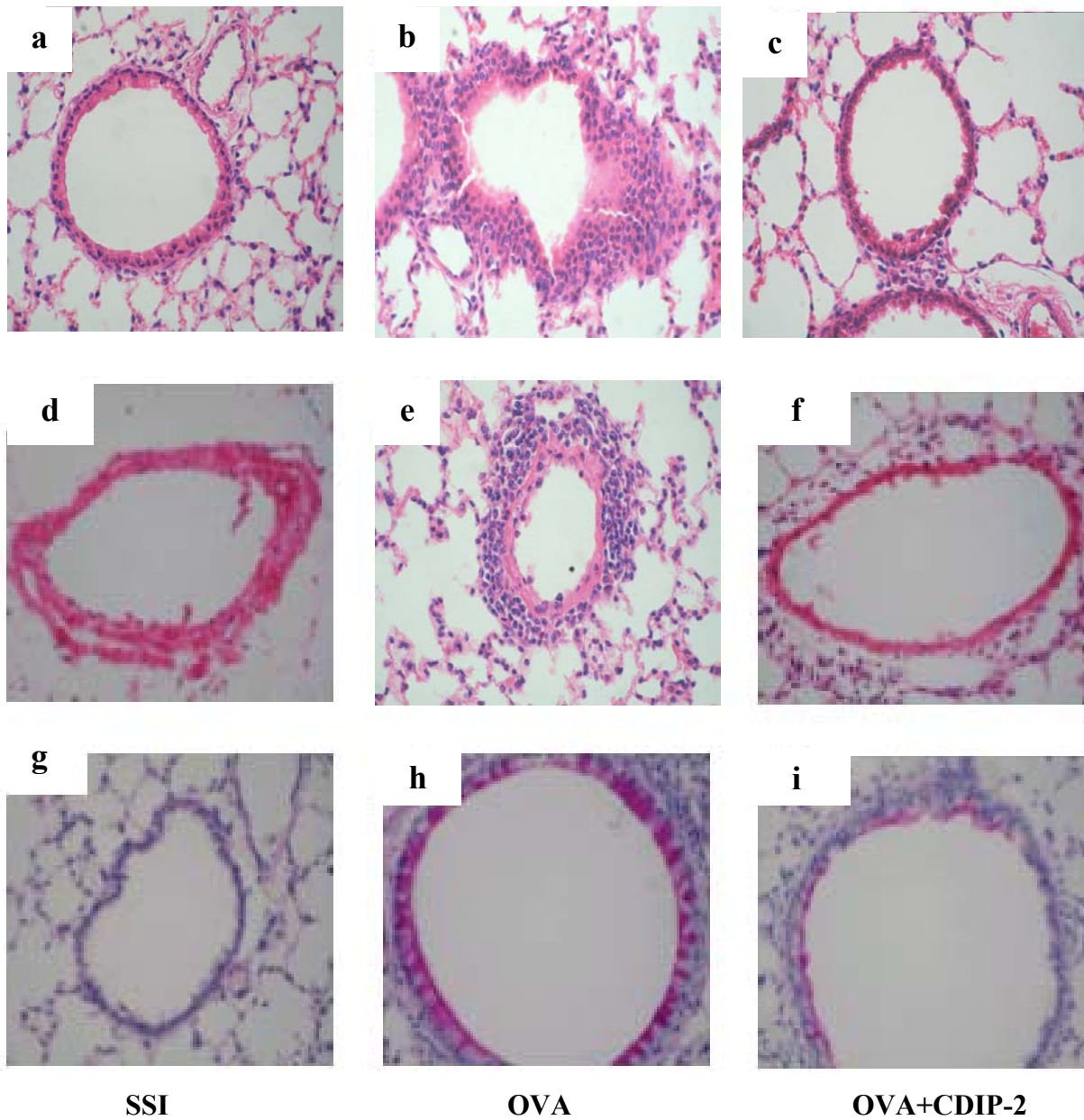
**Fig 8.5 Diferentes poblaciones celulares recuperadas de los LBA** : de ratones; 1) tratado con SSI ,2) sometido al modelo de alergia pulmonar, 3) tratado con CDIP-2. La flecha indica E: eosinófilo, N: neutrófilo, M: macrófago/monocito, L: linfocito.



**Fig 8.6 El tratamiento con CDIP-2 disminuyó la presencia de las diferentes poblaciones celulares recuperadas de los LBA** de ratones tratados con SSI, alerginizados con OVA y alerginizados con OVA tratados con CDIP-2. \*Diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

### **8.3 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 DISMINUYO EL INFILTRADO INFLAMATORIO PERIBRONQUIAL Y PERIVASCULAR Y LA CANTIDAD DE MOCO PRODUCIDO.**

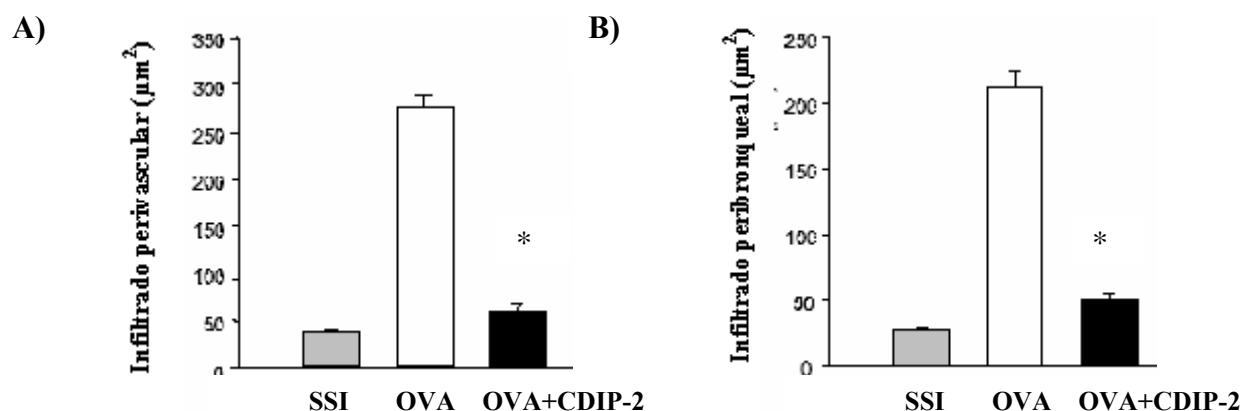
Para estudiar el posible efecto sobre la inflamación a nivel pulmonar de CDIP-2 se tiñeron cortes histológicos de pulmones (fig. 8.7, a-f). Con la misma técnica histológica se examinó el infiltrado celular perivascular y peribronquial. Los animales alerginizados con OVA y tratados con CDIP-2 presentaron una disminución en el infiltrado peribronquial y perivascular con respecto a los animales alerginizados con OVA y tratados con SSI, las imágenes corresponden a dos experimentos independientes. Para examinar el efecto de CDIP-2 sobre la cantidad de moco presente, se tiñeron cortes de pulmones de los animales utilizados en los experimentos (fig 5.7, g-i). Estas imágenes permiten identificar una disminución en la cantidad de moco producido por las células caliciformes en los cortes histológicos provenientes de animales tratados con CDIP-2.



**Fig. 8.7** La administración de CDIP-2 disminuyó el infiltrado inflamatorio peribronquial y perivascular y la cantidad de moco producida . Cortes histológicos de pulmones teñidos por la técnica de Hematoxilina/Eosina: a-c) Bronquiolos de animales correspondiente a cada grupo experimental indicado en la parte inferior de cada columna, d-f) Vasos sanguíneos de animales correspondientes a cada grupo experimental. La presencia de moco en cada grupo experimental se observa en las fotografías g-i (Tinción de PAS).

#### 8.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL INFILTRADO INFLAMATORIO PERIVASCULAR Y PERIBRONQUIAL.

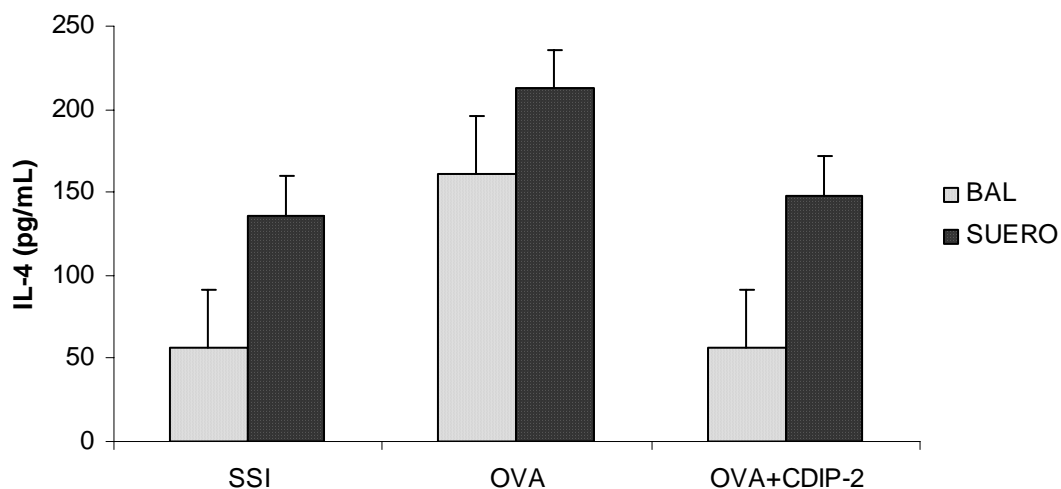
Para cuantificar la reducción del infiltrado inflamatorio, se midió en  $\mu\text{m}^2$  la presencia de infiltrado perivascular y peribronquial, en cortes histológicos transversales de pulmones teñidos con hematoxilina /eosina. En la figura 8.8 se observan las graficas A) Infiltrado perivascular, B) Infiltrado peribronquial.



**Fig. 8.8 Análisis cuantitativo del infiltrado inflamatorio:** A) Infiltrado perivascular, B) Infiltrado peribronquial. Los resultados presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ).

#### 8.5 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 MODIFICA LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN EL FLUIDO DE LOS LAVADOS BRONCOALVEOLARES.

Se realizaron experimentos para determinar por el método de ELISA, los niveles de IL-4 en suero y LBA (fig 8.9). Los resultados muestran una disminución en la cantidad de IL-4 en el grupo experimental tratado con el péptido CDIP-2 en suero y fluido de LBA, en comparación con el grupo de animales alergenizados con OVA no tratados con el péptido.



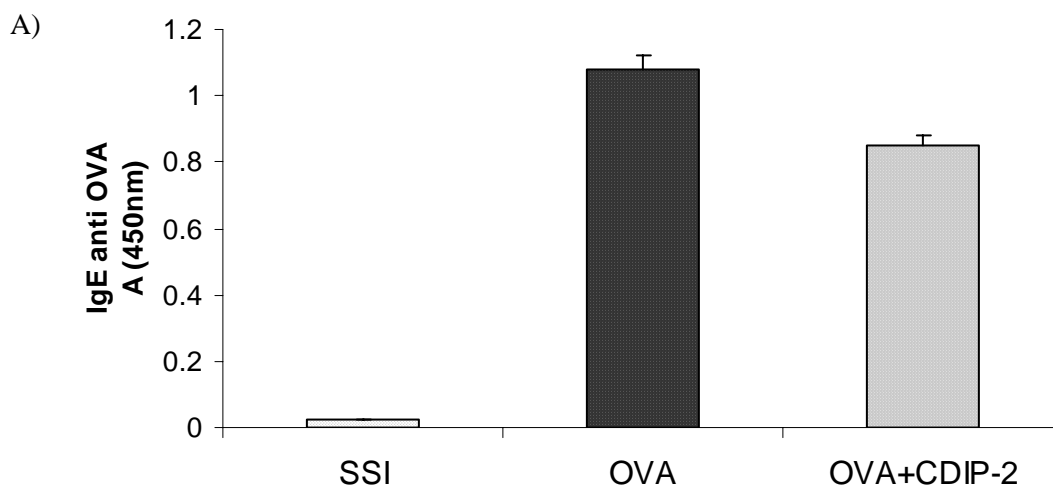
**Fig 8.9**

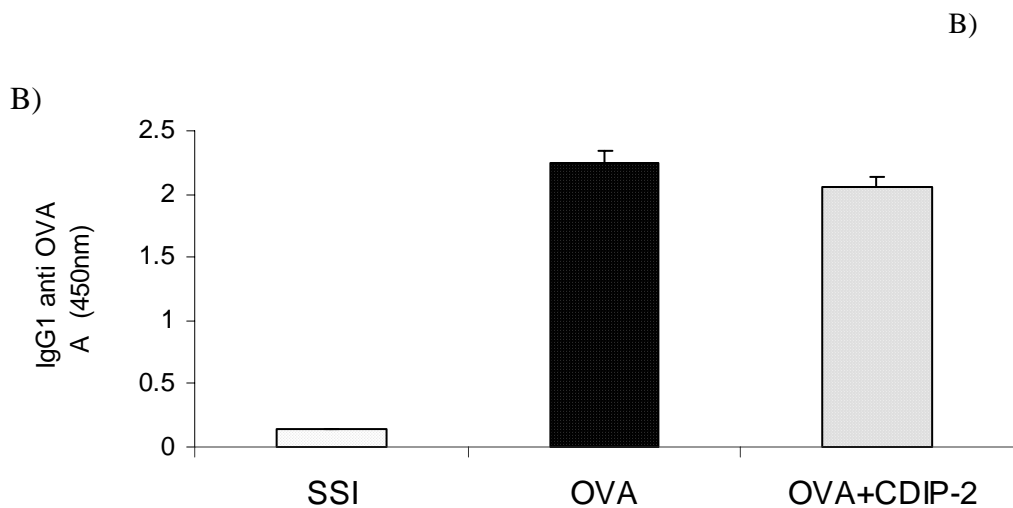
**La**

**administración de CDIP-2 modifica la expresión de citocinas en el fluido de los lavados broncoalveolares.** Niveles de IL-4 determinados por la técnica de ELISA en suero y LBA. En todos los experimentos se utilizó una dilución 1:10 del suero y se colocaron 100  $\mu$ L sin diluir del primer mililitro obtenido del LBA. Cada grafica representa el promedio de dos experimentos independientes, donde n=5 por cada grupo experimental. Cada muestra se analizó por triplicado.

### **8.6 LA ADMINISTRACIÓN DE CDIP-2 NO MODIFICA LOS NIVELES DE IgE E IgG1 24 HORAS DESPUÉS DE SU ADMINISTRACIÓN.**

Se determinaron los niveles de IgE, IgG1 específicas anti OVA, en suero. En la figura 8.10 A) se observan los niveles de IgE específica anti OVA, en la figura 8.10 b) se muestran los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de IgG1 anti OVA. Se grafica la Absorbancia (A) obtenida a 450 nm.



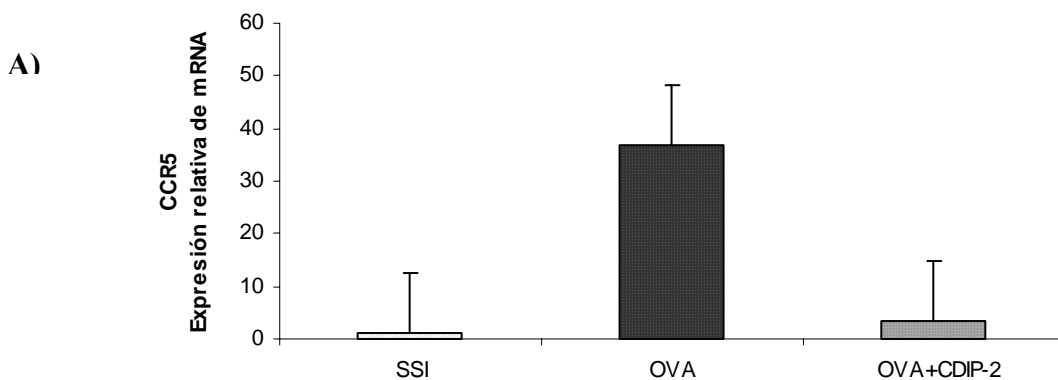


**Fig 8.10** La administración de CDIP-2 no modifica los niveles de IgE e IgG1 24 horas después de su administración. Detección de anticuerpos A) IgE, B) IgG1 anti OVA en suero. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado y no tratado con CDIP-2. Los resultados fueron obtenidos de dos experimentos independientes (10 animales por grupo en cada experimento), cada muestra se colocó por triplicado en la placa de ELISA, se utilizó una dilución 1:10 de los sueros

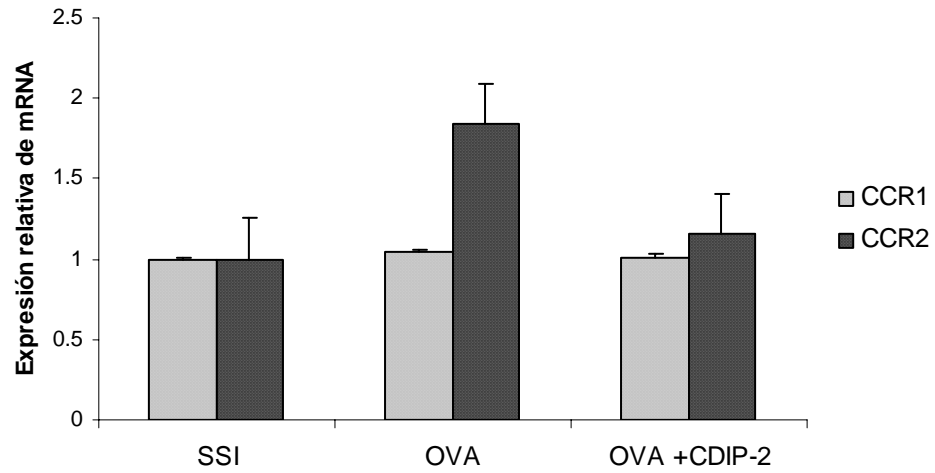
### 8.7 EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS EN RATONES TRATADOS CON CDIP-2

Se analizó el efecto de CDIP-2 en la expresión del transcrito de receptores de quimiocinas involucradas en la inflamación alérgica pulmonar. Por RT-PCR, se amplificó el cADN obtenido a partir del mRNA extraído de tejido pulmonar, utilizando oligonucleótidos específicos para cada receptor analizado Como gen de control interno se utilizó la amplificación de  $\beta$ -Actina.

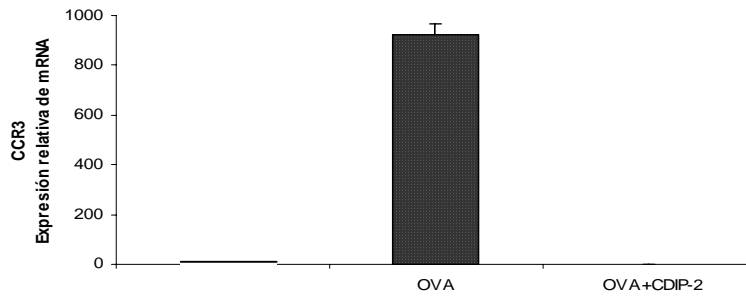
Las gráficas de la figura 8.11 muestra los valores  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (expresión relativa de mRNA) obtenidos en cada caso, por lo que se indica como expresión relativa del gen del receptor.



B)



C)



**Fig 8.11** La expresión del mRNA de receptores de quimiocinas disminuyó en ratones tratados con CDIP-2. Análisis relativo de la expresión de mRNA de receptores de quimiocinas en tejido pulmonar. Por

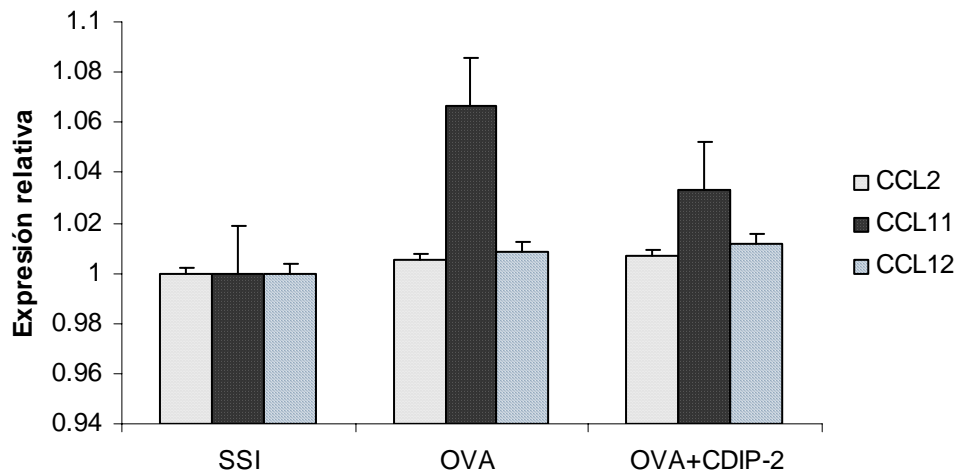


PCR en tiempo real. A) CCR5, B) CCR1 y 2, C) CCR3. La expresión relativa se refiere al valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$  obtenido en cada caso.

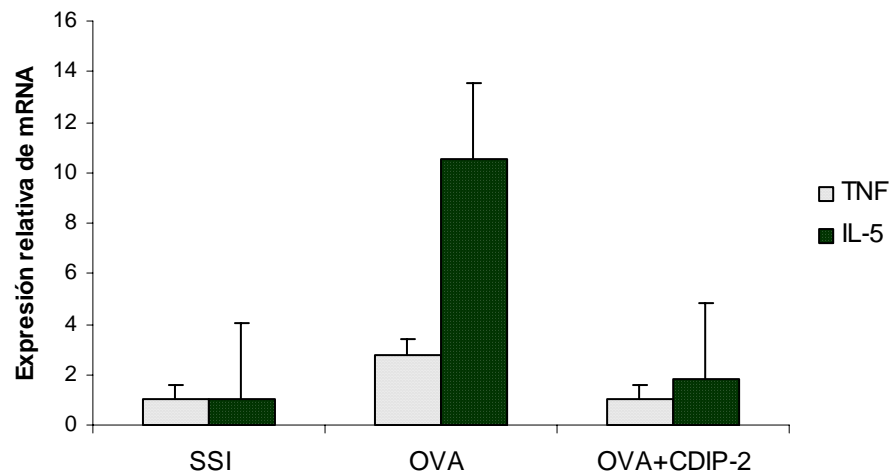
### 8.8 EXPRESIÓN RELATIVA DE mARN MENSAJERO DE QUIMIOCINAS Y CITOCINAS POR PCR TIEMPO REAL

Por PCR tiempo real se estudio la expresión relativa de mARN de algunas quimiocinas y citocinas involucradas en la respuesta alérgica, en la figura 8.12 se muestran las graficas correspondientes al valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

A)



B)



---

**Fig 8.12 La expresión del mRNA de quimiocinas disminuyó en ratones tratados con CDIP-2** .Análisis relativo de la expresión de mARN de quimiocinas en tejido pulmonar, RT-PCR: A) CCL11, CCL2, CCL12, B) TNF $\alpha$  e IL-5. La expresión relativa se refiere al valor valores  $2^{-\Delta\Delta CT}$  obtenido en cada caso.

---

## 9.0 DISCUSIÓN

Durante el proceso inflamatorio, se crea una compleja interacción entre diversas poblaciones celulares y moléculas solubles. La persistencia y progresión de la patología se relaciona con la presencia de un infiltrado celular que promueve el daño al tejido, motivo por el cual la utilización de estrategias terapéuticas capaces de inhibir el reclutamiento celular a pulmón resulta importante.

En este trabajo se demuestra que la administración de CDIP-2 en un modelo murino de alergia pulmonar disminuyó la celularidad en los LBA, lo que se refleja en las diferentes poblaciones celulares recuperadas. La disminución en el número de eosinófilos en LBA de los animales tratados con CDIP-2 resultó significativa con respecto al grupo no tratado (*Fig.8.4*). Durante el proceso de alergia pulmonar los eosinófilos son las principales células involucradas en el daño tisular debido al contenido tóxico de sus gránulos y la producción de citocinas como IL-4 que promueven el mantenimiento del microambiente inflamatorio. La reducción de la eosinofilia usualmente se relaciona con la reducción en el proceso de hiperreactividad bronquial lo que resulta en una mejora de la función pulmonar y una importante recuperación del tejido dañado.

La disminución de la eosinofilia a nivel pulmonar después de la administración de CDIP-2, puede deberse al bloqueo de la función de receptores de quimiocina como CCR3, internalización del receptor, modificación de la función de quimiocinas como CCL11, CCL5, CCL12, CCL24. Debido a que el péptido presenta 4 aminoácidos básicos en su secuencia, esto podría favorecer la unión GAGs, impidiendo que quimiocinas solubles formen los gradientes quimiotácticos necesarios para la migración celular, otra posibilidad es que CDIP-2 se una directamente a alguna quimiocina como CCL12, CCL11 impidiendo la unión de éstas a sus receptores, o la formación de dímeros de quimiocina necesarios para la activación de los receptores de quimiocina. Esto basado en antecedentes que muestran que quimiocinas como CCL2, CCL7 mutadas en los sitios de unión a GAGs que también resultan importantes para la formación de dímeros, no inducen reclutamiento celular al ser inyectadas *in vivo*, además de tener un efecto negativo sobre el reclutamiento celular en modelos de inflamación (37).

El decremento de otras poblaciones celulares en el infiltrado inflamatorio también resulta importante, ya que monocitos y macrófagos son una fuente de especies reactivas de oxígeno y citocinas como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  que activan al epitelio y endotelio promoviendo la producción de quimiocinas y otras citocinas que agravan el proceso inflamatorio (67). Los macrófagos alveolares

---

tienen un importante papel en la fagocitosis de células apoptóticas y producción de citocinas como TGF $\beta$ , favoreciendo la resolución del proceso inflamatorio; sin embargo, se ha demostrado que la presencia de macrófagos activados en pulmón por IL-4 es indispensable para el establecimiento y mantenimiento de la eosinofilia (74, 104).

La disminución de linfocitos presentes en los LBA, resulta crucial para la resolución del proceso inflamatorio alérgico, ya que estas células son la principal fuente de citocinas como IL-5, 4, 9, 25 y 13 (59). Estas citocinas favorecen la proliferación a nivel de médula ósea, aumento en la sobrevivencia de eosinófilos y linfocitos, además de contribuir con el aumento en la producción de IgE e IgG1 de forma local, producción de moco por las células caliciformes y expresión de quimiocinas proinflamatorias (59, 60, 74). En este trabajo la cuantificación de linfocitos se realizó por morfología clásica, por lo tanto no se conoce el fenotipo en concreto de esas células. Para resolver este problema se requeriría fenotipificar a las células obtenidas del LAB, mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos para marcadores específicos de las diferentes poblaciones de linfocitos: T CD4+, T CD8+ y B.

La administración de CDIP-2 72 horas después del reto local de OVA 0.75%, permitió identificar su efecto sobre el infiltrado inflamatorio, sin embargo sería importante evaluar el efecto que tendría la administración del péptido antes del reto con OVA o en tiempos posteriores mas cortos como 24 y 48 horas. La dosis única del péptido que fue utilizada en este trabajo se basó en reportes previos en la bibliografía, así como en los experimentos *in vitro* realizados con el péptido. Se debe realizar una curva de dosis-repuesta para conocer el efecto del péptido a dosis mayores y menores, ya que los antecedentes de experimentos *in vitro* indican que el péptido solo presentó actividad en la inhibición de la migración por arriba de 10  $\mu$ g/mL, esto en monocitos humanos.

Al analizar la histología de los pulmones de animales tratados con el péptido, estos presentaron características comparables con las de un pulmón sano (*Fig. 8.7*). Aunque se desconoce el destino de las células del infiltrado inflamatorio, la resolución de la inflamación pulmonar normalmente ocurre por apoptosis y trasmigración reversa de las células a circulación y/o órganos linfoides, en el caso del tratamiento con CDIP-2 se postula que las células podrían estar transmigrando a circulación para llegar al hígado, bazo o ganglios linfáticos, sin embargo se desconoce que factores estarían involucrados en el proceso. En otros modelos de inflamación como la peritonitis inducida por tioglicolato, se ha demostrado la migración de macrófagos presentes en el infiltrado inflamatorio a los ganglios linfáticos locales, durante la resolución del proceso inflamatorio (59). En

---

el caso específico de eosinófilos presentes en pulmón esta reportado que pueden migrar a ganglios linfáticos con la finalidad de presentar antígeno, sin embargo se desconocen los mecanismos que median la entrada de estas células al tejido linfoide.

En ratones sometidos a protocolos de alergia pulmonar inducidos con OVA y tratados con la quimiocina modificada Met-Rantes se reporta una disminución importante de células en lavados broncoalveolares y al analizar los ganglios linfáticos locales se encontró un porcentaje mayor de células, principalmente linfocitos T CD4+ comparado con los animales no tratados, por lo que se postula que el efecto de la quimiocina modificada podría estar relacionada con la migración del infiltrado celular a órganos como el bazo y ganglios (102).

La muerte celular por apoptosis es un mecanismo resolutivo importante del proceso inflamatorio, las células apoptóticas son fagocitadas por macrófagos favoreciendo así la reestructuración del tejido dañado, estos procesos se relacionan con la producción de mediadores resolutivos como las lipoxinas y resolvinas, en inflamaciones agudas éstas promueven la fagocitosis de neutrófilos y la disminución de la permeabilidad vascular impidiendo la llegada de célula al tejido (74). El cambio de mediadores lipídicos resolutivos no se da en procesos de inflamación crónica como la alergia pulmonar, sin embargo resultaría importante conocer si el tratamiento con CDIP-2 promueve el cambio en la producción de mediadores lipídicos como consecuencia directa de su mecanismo de acción, esta teoría se basa en el rápido efecto que produce la administración del péptido sobre el infiltrado inflamatorio. Para investigar esta posibilidad sería necesario determinar la expresión de estas moléculas después de la administración del péptido.

La disminución de la producción de moco por células caliciformes observadas en los cortes de pulmón teñidos con PAS, de los animales tratados con CDIP-2 (*Fig.8.7*) se relaciona con la disminución de citocinas y quimiocinas producidas por las células presentes en el infiltrado. Entre estas citocinas se encuentran IL-13, 4 y 9, las cuales favorecen la producción de mucina por célula caliciformes (57).

Sería necesario investigar la expresión de IL-13 en las muestras biológicas provenientes de los animales tratados con CDIP-2, ya que esta citocina se relaciona directamente con la secreción de mucina, además en modelos animales de alergia pulmonar su inhibición, detiene la metaplasia celular impidiendo que las células ciliadas del epitelio pulmonar adquieran un fenotipo mucoproducción.(105)

---

Por otra parte, la determinación de IL-4 por ELISA (*Fig 8.9*) tanto en suero como en LBA presentó una disminución en los animales tratados con CDIP-2 comparados con los no tratados. Esta citocina producida por linfocitos TCD4+, iNKT CD4+, eosinófilos y mastocitos, resulta crucial para el establecimiento y mantenimiento de la respuesta inflamatoria alérgica. La disminución de IL-4 también se relaciona con la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y quimiocinas como CCL11, en célula endoteliales, ya que la estimulación de IL-4 junto con TNF $\alpha$  favorece la expresión de estas moléculas que resultan cruciales para la entrada del infiltrado celular al intersticio pulmonar. Este antecedente resulta importante tomando en cuenta que en los animales tratados con CDIP-2 se presentó una disminución de IL-4 y TNF $\alpha$  después del tratamiento, por lo que la disminución del infiltrado celular observada, podría deberse a la disminución en la expresión de moléculas de adhesión y producción de quimiocinas.

La IL-4 es también importante para la producción del gradiente de quimiocinas en el caso de humanos. La producción de CCL13 en células circulantes es inhibida por IL-4, mientras que en células epiteliales pulmonares la IL-4 favorece la expresión de CCL13, lo que favorece el establecimiento de un gradiente quimiotactico en el tejido inflamado (106).

Los animales alergenizados con OVA desarrollaron una respuesta humoral caracterizada por la producción de IgE específica anti OVA, esto fue determinado por ELISA en suero (*Fig. 8.10*). El entrecruzamiento del antígeno unido a IgE anclados en el FC $\epsilon$ RI trae consigo la activación celular principalmente de mastocitos, los cuales liberan moduladores inflamatorios característicos de la inflamación en alergia pulmonar.(107) El FC $\epsilon$ RI se expresa también en célula dendríticas, monocitos y células musculares lisas aunque su función no es muy clara en estas células.

Los niveles de IgE detectados en los animales tratados con CDIP-2 disminuyeron de forma no significativa con respecto a los animales no tratados, esto resulta claro sabiendo que los animales fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento y que la disminución de citocinas como IL-4 traería consigo una disminución en la producción de IgE a nivel local (pulmonar) y sistémico (circulación). Este efecto no es apreciable a las 24 horas posteriores al tratamiento debido a la vida media de los anticuerpos en circulación.

---

La IgG1 específica anti OVA en ratón es una inmunoglobulina relacionada con procesos alérgicos y a diferencia de lo que ocurre en humanos, ésta se puede unir a receptores FCεRI causando activación celular (108). En ratones deficientes en IgE o FCεRI se ha observado que IgG1 es suficiente para producir los síntomas clásicos de la alergia pulmonar. En las mucosas murinas, esta subclase de inmunoglobulina es la más abundante después de la IgA secretoria y su producción local se ve aumentada en procesos alérgicos.

Los niveles de IgG1 al igual que IgE, en los animales tratados con CDIP-2 no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo no tratado (*Fig. 8.10*), sin embargo la determinación de niveles de esta inmunoglobulina permitieron reforzar el protocolo experimental utilizado con respecto al tipo de respuesta humoral que se deseaba obtener.

Se evaluó el efecto de la administración de CDIP-2 sobre la expresión de receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5 (*Fig. 8.11*) así como algunos de sus ligandos CCL2, CCL11, CCL12. En tejido pulmonar de los ratones alergenizados con OVA tratados y no tratados con el péptido se realizó un análisis de la expresión del mRNA de los productos de RT PCR en tiempo real. Los resultados muestran una disminución en la expresión a nivel mRNA de los receptores de quimiocina CCR3, CCR5 y en las citocinas IL-5 y TNFα. No se observó un cambio significativo en la expresión de quimiocinas como CCL2, CCL12 y CCL13 y receptores como CCR1 y 2 en el tejido pulmonar de los ratones alergenizados con OVA y tratados con CDIP-2.

La expresión de mRNA de receptores de quimiocina no correlaciona necesariamente con la expresión de proteína en superficie, sin embargo existen reportes para receptores de quimiocina donde esto sí ocurre.

CCR2 es un receptor de quimiocina que se expresa de forma constitutiva en células residentes pulmonares y células presentes en el infiltrado inflamatorio. Este receptor une a todas las quimiocinas de la subfamilia MCPs, y es el único receptor reportado para CCL2. La importancia de este receptor durante la respuesta inmune en el pulmón alérgico se sustenta en la utilización de ratones deficientes en CCR2, el cual presenta hiperreactividad elevada, mayor eosinofilia y mayores niveles de IgG1 e IgE comparado con la cepa silvestre sometida a un protocolo de inflamación pulmonar.

---

Por otra parte, la expresión de mRNA mensajero de CCR1 no se modificó de forma significativa en ninguno de los tejidos estudiados (*Fig.8.11*). Animales deficientes en este receptor sometidos a protocolos de alergia pulmonar presentan una disminución en el número de células mucoproductoras y menor fibrosis subepitelial, por lo que este receptor estaría involucrado con el desarrollo de remodelación pulmonar. La expresión de CCR1 es constitutiva en macrófagos y monocitos por lo que su expresión se detecta de forma significativa en animales sanos.

Otro de los receptores analizados fue CCR5, este receptor une a las quimiocinas CCL3, 4 y 5, se expresa en monocitos y macrófagos, linfocitos Th1, célula NK y dendríticas inmaduras. En la inflamación alérgica la expresión de este receptor se relaciona con el infiltrado de monocitos.

Los animales tratados con CDIP-2, presentaron una disminución de 20 veces en la expresión relativa de mRNA de CCR5 con respecto a los no tratados, así mismo la expresión se ve aumentada en los animales alergenizados con OVA comparados con los tejidos provenientes de los animales tratados con SSI. Los resultados obtenidos para la expresión de CCR5 en los animales tratados pueden deberse a la disminución de los ligandos de este receptor a nivel pulmonar, sin embargo esta hipótesis, tendría que comprobarse midiendo la expresión de estas quimiocinas por ELISA en lavados broncoalveolares o por inmunohistoquímica en tejido pulmonar. El antagonismo de este receptor por la administración de las quimiocinas modificadas Met-RANTES y Apo-RANTES en modelos *in vivo* de alergia pulmonar, reduce el infiltrado inflamatorio. Los ratones deficientes en CCR5 presentan una atenuación en la hiperreactividad bronquial e inflamación cuando son alergenizados con OVA (102, 109).

CCR3 es el principal receptor involucrado en el desarrollo de eosinofilia. Este receptor se expresa en células epiteliales, células musculares lisas, eosinófilos, basófilos y linfocitos con fenotipo Th2; sus ligandos conocidos CCL5, 7, 8, 11, 13, 24 y 26 atraen y activan con diferente afinidad eosinófilos y linfocitos tipo Th2.

El análisis de la expresión relativa del mRNA de CCR3 presentó una disminución significativa en los animales tratados con CDIP-2 comparados con los no tratados. Esta disminución en la expresión del mRNA de CCR3 en los animales tratados con CDIP-2 puede asociarse a una regulación negativa a nivel de transcripción, promovida por la internalización de receptores de quimiocina.



---

Algunos de los ligandos involucrados en el proceso alérgico pulmonar se estudiaron por RT-PCR en tiempo real. CCL2 es una quimiocina relacionada con la polarización hacia una respuesta tipo Th2 (80). Ratones donde esta quimiocina se neutraliza se produce una disminución de la hiperreactividad bronquial e inflamación pulmonar. CCL2 se relaciona con las primeras etapas de la respuesta inflamatoria alérgica. En el modelo experimental utilizado no se observaron diferencias significativas en la expresión de mRNA de CCL2, aunque esto no se relacionaría directamente con la cantidad de proteína producida.

La quimiocina murina CCL12, probablemente el homólogo de la quimiocina humana CCL13, se une a CCR1 CCR2 y se sabe que la expresión de esta quimiocina es regulada por citocinas como  $IFN\gamma$  (110). La neutralización de CCL12 disminuye la hiperreactividad bronquial y el número de eosinófilos reclutados (111). En nuestro modelo experimental no se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión de mRNA de esta quimiocina entre el grupo tratado con CDIP-2 y los no tratados.

La expresión de mRNA de CCL11 en los animales tratados con CDIP-2 redujo 0.5 veces comparando con los animales no tratados con el péptido. Esta disminución no resulta significativa, aunque no podemos asegurar que a nivel de proteína este sea comparable. CCL11 es producida principalmente por células epiteliales estimuladas con citocinas y su neutralización *in vivo* con anticuerpos específicos reduce la acumulación de eosinófilos en pulmón en un 50% (100). En los ratones deficientes en esta quimiocina no se observa 48 horas después del último reto con OVA una reducción significativa de la eosinofilia pulmonar comparada con los ratones silvestres. Esto se debe a que otros ligandos de CCR3 como CCL5, CCL13 (en humanos), CCL24 y 26 compensan la falta de CCL11. En nuestro modelo se esperaría una reducción mayor en la expresión del mRNA de CCL11 y las MCPs estudiadas ya que estas quimiocinas presenta en sus genes regiones de unión a elementos como  $NF-\kappa B$  y elementos que responden a interferón (112), por lo que su producción resulta de la estimulación de citocinas como  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ , para las cuales se obtuvo una reducción en la expresión del mensajero en tejido pulmonar de los animales tratados con CDIP-2. Sin embargo algunos reportes indican que CCL11 es importante durante las primeras horas después del último reto con OVA y el mantenimiento de la eosinofilia se relaciona más con quimiocinas como CCL24 y CCL13 en humanos.

Para el caso de  $TNF\alpha$  se encontró por RT-PCR en tiempo real una reducción en la expresión del mensajero de esta citocina en los animales tratados con CDIP-2 con respecto a los no tratados (Fig.

---

8.12). Para TNF $\alpha$  se ha encontrado una correlación entre la cantidad de mensajero y la proteína funcional, esto en biopsias de pacientes asmáticos y el LAB. Esta citocina es producida por eosinófilos, célula epiteliales y linfocitos T. TNF $\alpha$  esta implicado en la proliferación de célula musculares y fibroblastos por lo que se relaciona directamente con la hiperreactividad bronquial (113). Este resultado resulta importante tomando en cuenta que los tratamientos utilizados actualmente en asma como la inhalación de glucocorticoides no disminuye los niveles de TNF $\alpha$ , en LBA de pacientes asmáticos (113).

La disminución de la expresión del mRNA para TNF $\alpha$  en los animales tratados con CDIP-2 se explicaría con una disminución de factores de transcripción activados como NF- $\kappa$ B y AP1. Para comprobar esta teoría sería necesario realizar ensayos de medición de fosforilación.

Por RT-PCR en tiempo real se determinó la expresión de IL-5, observando una disminución en la expresión del mRNA para IL-5 en los animales alergenizados con OVA y tratados con CDIP-2 (*Fig. 8.12*). La disminución en la expresión de esta citocina durante el proceso de inflamación alérgica resulta relevante ya que IL-5 favorece la proliferación de eosinófilos a nivel de médula ósea, además de favorecer la expresión de receptores de quimiocina como CCR1 y 3 durante la maduración de los eosinófilos, los cuales resultan necesarios para la migración (114). IL-5 es indispensable para el desarrollo de hiperreactividad a metacolina junto con IL-13 y CCL24. (115) La disminución a nivel mRNA de IL-5 en los animales tratados con CDIP-2, indicaría una posible disminución de la expresión del mensajero de citocinas como IL-13 e IL-4, ya que a nivel transcripcional la regulación de la expresión de este grupo de genes se encuentra estrechamente relacionada.

Para evaluar alguno de los posibles mecanismos involucrados en la actividad antagonista de CDIP-2, ya que por el momento se desconoce como este péptido ejerce su actividad antiinflamatoria, es necesario realizar experimentos en células establemente transfectadas con los receptores de quimiocina, que permitiría realizar ensayos de competencia y unión específica al receptor, es importante mencionar que actualmente se desconocen los residuos de aminoácidos de la secuencia de CCL13 cruciales para la unión y activación de su receptores.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que la utilización de antiinflamatorios basados en la inhibición del infiltrado celular, representa una nueva línea de investigación para la generación de agentes terapéuticos, diseñados en base al conocimiento de la respuesta inmune

---

inflamatoria local. No solo el desarrollo de moléculas orgánicas que bloqueen un receptor en específico, ya que en ocasiones esta estrategia no resulta efectiva debido a la promiscuidad que existe en cuanto a ligandos y receptores, en el caso de las quimiocinas.

La utilización de péptidos como estrategia terapéutica es criticado debido a la rápida degradación que podrían sufrir estas moléculas *in vivo*, sin embargo moléculas como CDIP-2 pueden ser modificadas estructuralmente para aumentar su estabilidad y potencia.

En las ultimas décadas, padecimientos crónico-degenerativos relacionadas con inflamación crónica, como el asma, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y cáncer han aumentado su prevalencia en la población a nivel mundial, lo que trae consigo la investigación encaminada al desarrollo de mejores terapias, aunque la investigación acerca de la patogénesis del asma alérgica en humanos es limitada debido a las restricciones éticas y a dificultades que existen en cuanto a la obtención de muestras biológicas se han desarrollado diversos modelos animales que nos permitan investigar los procesos que no pueden ser estudiados en pacientes con alergia pulmonar.

Los resultados que se muestran en este trabajo indican que péptidos derivados de quimiocinas como CDIP-2 tienen un importante potencial para ser utilizados como agentes antiinflamatorios basados en la inhibición del reclutamiento celular.

---

## **12.0 CONCLUSIONES**

El péptido CDIP-2, derivado de la secuencia de la quimiocina CCL13, presentó actividad antiinflamatoria *in vivo* al ser administrado de forma local, en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar inducido por OVA.

---

## 11.0 APÉNDICES

### APÉNDICE I METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES

#### OBTENCIÓN DE LAVADOS BRONCOALVEOLARES

a) Los ratones fueron sangrados por punción cardiaca, una vez obtenida la sangre se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos para separar el suero del paquete celular. El suero fue almacenado a -70°C hasta el momento de su utilización.

b) Exposición de la traquea y canulación: Una vez que se extrajo la sangre se expuso la traquea y se realizó una pequeña incisión para introducir una cánula de material plástico.

c) Obtención de Lavados bronco-alveolares: Los pulmones se lavaron 5 veces con 1mL de PBS/SFB2% obteniendo un volumen final de aproximadamente 5 mL de LBA. El primer mililitro obtenido se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, 4°C; el sobrenadante se almacenó a -70°C para la determinación de citocinas.

d) Células obtenidas del LBA: Las células presentes en LBA se contaron en una cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano para determinar viabilidad celular. Una vez contadas las células se tomo una fracción ajustando a 20,000 células en 100 µL para realizar citopreparaciones utilizando una centrifuga Cytospin; las laminillas se tiñeron con colorante de Wright (Sigma) y se realizó una cuenta diferencial de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos mediante su morfología clásica, contando 300 células por muestra.

#### ANÁLISIS DEL TEJIDO PULMONAR

Los pulmones se fijaron con etanol absoluto posteriormente fueron procesados y embebidos en parafina, de los bloques de tejido, se realizaron cortes histológicos y se tiñeron por tinción de H/E y PAS, otro grupo de tejidos se congelaron a -70°C para la posterior extracción de ARN.

---

## CUANTIFICACIÓN DE IL-4 POR ELISA

Para la determinación de IL-4 se utilizó un paquete comercial (*Opt EIA, BD*), siguiendo las indicaciones del proveedor, a las placas para ELISA de 96 pozos (*Costar® high binding de poliestireno*) se les adicionó 100µL por pozo del anticuerpo de captura diluido en solución amortiguadora de carbonatos y se incubaron toda la noche a 4°C. Después se lavaron 3 veces con 300µL de solución de lavado. Posteriormente las placas se bloquearon adicionando a cada pozo 200µL de solución de ensayo (PBS/BSA 1%) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se lavaron las placas 3 veces con 300µL de solución de lavado (PBS, Tween 20 0.05%) y luego se adicionaron 100µL, tanto de la curva estándar de IL-4, como de las muestras (100 µL de lavado broncoalveolar, sin diluir) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

Para preparar la curva estándar se agregó la cantidad necesaria de citocina murina recombinante para obtener la concentración más alta indicada por el proveedor a 1mL de solución de ensayo. A partir de esta solución se hicieron diluciones seriadas 1:2 hasta completar el rango de valores de concentración establecido. Después de la incubación las placas se lavaron 5 veces con 300µL de solución de lavado y posteriormente se agregaron a cada pozo 100µL de solución de detección (anticuerpo de detección + reactivo Avidina-HRP) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación las placas se lavaron 7 veces con 300µL de solución de lavado, se adicionaron 100µL de solución de TMB, y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad. Para detener la reacción se agregó a cada pozo 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y posteriormente se determinó la densidad óptica en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450nm.

## DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS ANTI OVA EN SUERO POR ELISA

Las placas para ELISA de 96 pozos se fijaron adicionando 100µL por pozo de una solución de 20µg de OVA (*Sigma grado V*) disuelta en NHCO<sub>3</sub> 0.1M pH8.3, se incubaron toda la noche a 4°C. Después se lavaron 4 veces con 300µL de solución de lavado. Posteriormente Las placas se bloquearon adicionando a cada pozo 200µL de solución de ensayo (PBS/BSA 1%) y se incubaron durante UNA hora a 37°C. Posteriormente las placas se lavaron 3 veces con 300µL de solución de

---

lavado (PBS, Tween 20 0.05%) y se adicionaron 100µL de las muestras de suero diluidas 1:10 en solución de trabajo, se incubaron durante 1 hora a 37°C. Al término de la incubación las placas se lavaron 5 veces con 300µL de solución de lavado y posteriormente se agregaron a cada pozo 100µL de la solución de anticuerpo (anticuerpo de detección biotinilado para el caso de IgE o anticuerpo conjugado con HRP para el caso de IgG1 y IgG2a) y se incubaron durante 1 hora a 37°C.

Para el caso de la ELISA para la detección de IgE anti-OVA: al término de la incubación con el anticuerpo biotinilado, las placas se lavaron 5 veces con 300µL de solución de lavado y se adicionó el reactivo Avidina-HRP diluido 1:250 en solución de ensayo, incubando durante 30 minutos a 37°C.

Para el caso de IgG1 e IgG2a después de la incubación con el anticuerpo conjugado con HRP, en el caso de la determinación de IgE después de la incubación con el reactivo Avidina-HRP, las placas se lavaron 7 veces con 300µL de solución de lavado y se adicionaron 100µL de solución de TMB, incubando durante 30 minutos en oscuridad. Para detener la reacción se agregó a cada pozo 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y posteriormente se determinó la densidad óptica en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

**Extracción de ARN total del pulmón:** Los tejidos congelados fueron macerados con ayuda del equipo Politron 35 segundos nivel 3 de velocidad, en 1mL de *Trizol* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) y se procedió como lo indica la hoja técnica del reactivo mencionado, se agitó la mezcla con ayuda de una micropipeta hasta obtener una suspensión homogénea que se dejó a temperatura ambiente y en reposo por 5 min. Se añadieron 0.2mL de cloroformo a cada tubo, para luego agitarlos vigorosamente por 15 segundos seguidos de una incubación por 2 minutos a temperatura ambiente, al cabo de los cuales los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. La mezcla se separó en dos fases; la superior (acuosa) se transfirió a un tubo nuevo libre de ARNsas, al que se le añadieron 0.5mL de isopropanol. Los tubos se agitaron por inversión un par de veces, para después dejarse en reposo por 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C, obteniéndose un botón de ARN que fue lavado con 0.5mL de etanol al 75% para después centrifugarse a 7 500 rpm por 5 min a 4°C, este lavado se realizó en dos ocasiones. Finalmente el botón se resuspendió en 50µL de agua megapura tratada con DEPC (libre de ARNsas); una alícuota de 2 µL se utilizó para determinar la concentración de ARN en µg/µL mediante la absorbancia

---

obtenida a 260nm y otra alícuota se corrió en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X para verificar la integridad del ARN obtenido.

**Tratamiento con ADNsa:** El ARN fue tratado para eliminar los restos de ADN con un paquete comercial (*RQ1 ARNsa free ADNsa. PROMEGA*), utilizando una 1U/ $\mu$ L de ADNsa I por cada  $\mu$ g de ARN. La mezcla de ARN, ADNsa y amortiguador de reacción se incubó por 30 minutos a 37°C, posteriormente se agregó 1 $\mu$ L de solución stop de ADNsa (componente del paquete comercial mencionado) y se incubó cada muestra durante 10 min a 65°C.

**Obtención del ADN complementario:** La síntesis del cADN se realizó empleando un paquete comercial y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, en un tubo libre de ARNsa se añadieron 5 $\mu$ g de ARN total, 1 $\mu$ L de Random primers (500 $\mu$ g/mL), 1 $\mu$ L de mezcla de dNTPs 10mM, esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 65°C, seguida de una incubación en hielo de 1 minuto, después de la cual se añadió el amortiguador de la transcriptasa en la concentración recomendada por el fabricante seguido de una incubación a temperatura ambiente por 10 min, añadiendo posteriormente 1 $\mu$ L de M-MLVRT (*Life Technologies*) (200 U) incubando 50 min a 37°C, la reacción se inactivó por calor incubando 5 min a 70°C.

### **RT-PCR tiempo real**

Para estas reacciones de PCR se utilizaron 2  $\mu$ L de cADN obtenido por muestra utilizando como reportero fluorescente el reactivo *SYBR green Master Mix 2X (Applied Biosystems)*. Los oligonucleótidos específicos y las condiciones de reacción se mencionan en el Apéndice III.

El equipo utilizado fue *ABI Prism 7000 (Applied Biosystems)*, se utilizaron tubos con cubiertas ópticas (*Applied Biosystems*).



---

Tabla. Mezcla de reacción para PCR tiempo real

<b>Reactivo</b>	<b>Para una reacción de 25 (µL)</b>
SYBR Green	12.5
Agua libre de endonucleasas	9.5
Oligonucleotidos 10mM (de cada uno)	1
cADN	2

---

## APÉNDICE II REACTIVOS Y SOLUCIONES

### Péptido sintético CDIP-2

Péptido sintetizado en fase sólida (Amibon), 19 aminoácidos de longitud: <sup>19</sup>

KISLQRLKSYVITTSRCPQ<sup>37</sup>

Secuencia obtenida de la estructura de la quimiocina CCL13

El péptido se disolvió en agua calidad inyectable, como alícuotas de concentración 1mg/mL y se congelaron a -70°C, hasta el momento de su utilización.

#### **PBS/SFB 2%**

#### **PBS**

KCl 200mg/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200mg/L

NaCl 8000mg/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1150mg/L

Agua desionizada

KCl 200mg/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200mg/L

NaCl 8000mg/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1150mg/L

Agua desionizada

pH 7.4

### SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LOS ENSAYOS

#### **DE ELISA**

#### **Amortiguador de Carbonatos pH 9.5**

Para 200mL (10X)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3.2g

NaHCO<sub>3</sub> 5.86g

Agua desionizada

#### **Solución de Trabajo para ELISA**

KCl 200mg/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200mg/L

NaCl 8000mg/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1150mg/L

Agua desionizada

#### **Solución de Lavado para ELISA**

KCl 200mg/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200mg/L

NaCl 8000mg/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1150mg/L

Agua desionizada

pH 7.4

Tween 20 0.05% v/v

#### **NHCO<sub>3</sub> 0.1M**

pH 8.3 en Agua desionizada

#### **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N**

Para 100mL

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10.2 ml

Aforar a 100mL con agua desionizada

---

pH7.4

BSA 1% o SFB2 % (indicado en cada protocolo)

**SOLUCIONES EMPLEADAS PARA  
LA ELECTROFORESIS DE ARN**

**TAE 1X**

Tris Base 0.1M

EDTA 0.001M

Agua tratada con DEPC

El pH debe ser 8.3

**Amortiguador de carga para ARN (10X)**

Glicerol 50% (v/v)

EDTA a pH 8.3

Azul de bromofenol 0.05% (116)

**Agua tratada con DEPC**

0.1% de DEPC en H<sub>2</sub>O tridestilada se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente y después se esteriliza por autoclave.

**Gel de Agarosa**

TAE 1X

Agarosa 1.5% p/v

Agua desionizada estéril

**ENZIMAS**

Transcriptasa reversa M-MLTV (*Invitrogen*)

ADNsa (*Promega*)

HRP-Avidina (*BD*)

**REACTIVOS**

OVA grado V (*Sigma-Aldrich*)

Suero Fetal Bovino (*Hyclone*)

Albúmina Serica Bovina (*Sigma-Aldrich*)

Inyect Alum (*PIERCE*)

Solución salina Isotónica NaCl 0.9 % calidad inyectable (SSI)

---

Etanol absoluto  
Cloroformo  
Alcohol isopropílico  
Agarosa (*BIO-RAD*)  
Bromuro de Etidio  
Azul de tripano  
Anestésicos: Sevorane, Fenobarbital sódico.  
Colorante de Wright-Giemsa (*Sigma-Aldrich*)  
Poli L-lisina (*Sigma*)  
Peroxido de Hidrógeno 1X (*Pierce*)  
TMB microwell  
dATP, dCTP, dTTP (100 mM) (*Promega*).  
SYBR green Master Mix 2X (*Applied Biosystems*).

#### **ANTICUERPOS**

- Anticuerpo anti ratón IgE biotilado (ELISA Max.BioLegend, anti mouse I ) (Dilución 1:150)
- Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG2a (ZyMed) (Dilución 1:1000)
- Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG1 (ZyMed) (Dilución 1:1000)

---

## APÉNDICE III OLIGONUCLEOTIDOS Y CONDICIONES DE REACCIÓN OLIGONUCLEOTIDOS

### Condiciones de reacción:

**Paso 1 (1 ciclo):** 94°C, 1min

**Paso 2 (40 ciclos):** 94°C, 45s-55°C, 45s-72°, 1min

Las condiciones de reacción son similares para todos los oligonucleótidos mostrados.

#### **B-Actina**

Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG

Antisentido: GGTCTCAAACATGATGTGGG

Tamaño del producto: 220pb

Temperatura de disociación: 83.8°C

#### **IL-5**

Sentido ACCTTGGCACTGCTTTCTACTCAT

Anti. :AGAAACTCTTGCAGGTAGTCTAGG

Tamaño del producto:

Temperatura de disociación: 82.3°C

#### **CCR2**

Sentido: CATTGACCCCCACATAGGGAT

Antisentido: TTGTTGGAGAGAAGTTCCGAAGG

#### **TNF $\alpha$**

Sentido: GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC

Antisentido: ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG

Tamaño del producto: 300pb

Temperatura de disociación: 82.3°C

#### **CCR1**

Sentido: GGGACATCATCAAACCAGACC

Antisentido: GCCAACCAAGCAGAAGACAGC

Tamaño del producto: 262pb

Temperatura de disociación: 80.7°C

#### **CCR3**

Sentido: TTCTCACCAGGAAGAAACGGA

Antisentido: GGAGGTGACTGAGGTGATTGC

Tamaño del producto: 135 pb

Temperatura de disociación: 77°C

---

Tamaño del producto: 230pb

Temperatura de disociación:

### **CCR5**

Sentido: ATCGTGTAAGCTCAGTCTATACCC

Antisentido: GCATGTATCTTGGCCCTCTATGAT

Tamaño del producto: 150 pb

Temperatura de disociación: 77°C

### **CCL2**

Sentido: TGATCCCAATGAGTAGGCTG

Antisentido: GGGCAGATGCAGTTTTAAAT

Tamaño del producto: 201pb

Temperatura de disociación: 81.1°C

### **CCL11**

Sentido: CTGAAGAGCTACAAAAGAATCACCAACA

Antisentido: GACCCCAAGAAGAAGTGGGTCCAGGATG

Tamaño del producto: 135 pb

Temperatura de disociación: 78.3°C

### **CCL12**

Sentido: TTTCCACACTTCTATGCCTCC

Antisentido: GCAGTATGGTCCTGAAGATCA

Tamaño del producto: 201pb

Temperatura de disociación: 81.8°C

---

## APÉNDICE IV ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### FIGURAS

**Fig1.** Modelo de diferenciación hacia los linajes Th1 y Th2 (*Modificada de Harrington Et. al, 2007*)

**Fig 2.** A) Modelo de la estructura terciaria clásica de una quimiocina CCL-2. B) Características estructurales de las diferentes familias de quimiocinas.

**Fig 3.** Quimiocinas descritas por el momento, nombre nuevo y viejo, así como los receptores a los que se unen y células que expresan los mismos. (*Tomada de Antonella Viola y Andrew D. Luster, 2007*)

**Fig 4.** Principales vías de señalización involucradas en la activación de receptores de quimiocinas.

**Fig 5.** Modelo de extravasación leucocitaria. (*Modificada de Luster, 1998*)

**Fig 6.** Efectos derivados del mastocito y macrófagos alveolares en la etapa primaria de la inflamación alérgica pulmonar.

**Fig 7.** Esquema del protocolo clásico para la inducción de inflamación alérgica pulmonar en ratón.

**Fig 8.** Esquema del protocolo empleado durante el desarrollo experimental del modelo animal.

### TABLAS

**Tabla 1.** Enfermedades inflamatorias y tipo de infiltrado celular característicos regulados por quimiocinas. (*Modificada de Luster, 1998*).

**Tabla 2.** Mediadores lipídicos mas importantes durante el proceso de alergia pulmonar.

**Tabla 3.** Secreción de quimiocinas por las células residentes del pulmón.

**Tabla 4.** Principales citocinas involucradas durante el proceso de inflamación alérgica pulmonar

**Tabla 5.** Quimiocinas involucradas en la respuesta alérgica pulmonar.

**Tabla 6.** Principales receptores de quimiocina involucrados en la inflamación alérgica pulmonar. (*Modificada de Zimmermann, N et al, 2003*)

---

## REFERENCIAS

1. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* 6:1182-90
2. Rot A, von Andrian UH. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22:891-928
3. Rothenberg ME, Zimmermann N, Mishra A, Brandt E, Birkenberger LA, Hogan SP, Foster PS. 1999. Chemokines and chemokine receptors: their role in allergic airway disease. *J. Clin. Immunol.* 19:250-65
4. Elsner J, Escher SE, Forssmann U. 2004. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy* 59:1243-58
5. Prioult G, Nagler-Anderson C. 2005. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol. Rev.* 206:204-18
6. Abul K. Abbas AHL. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*. ed. W B Saunders Co,
7. Parkin JaBC. 2007. An overview of the immune system. *Lancet* 357:
8. Zinkernagel RM. 2007. On differences between immunity and immunological memory. *Curr. Opin. Immunol*
9. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216
10. Davies H. 2003. Immune System. *Encyclopedia of life sciences*
11. Sakano HKHGHaST. 2007. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 288-94
12. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
13. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
14. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.* 10:349-50



- 
15. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
  16. von Andrian UH, Mackay CR. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343:1020-34
  17. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
  18. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
  19. Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Ii4 locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* 24:607-56
  20. Chen Z TCMLLAOJJ. 2007. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum.*
  21. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
  22. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2:725-31
  23. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2003. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 15:627-33
  24. Lambrecht BN. 2005. Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy* 60:271-82
  25. von Andrian UH, Mempel TR. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3:867-78
  26. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol* 25:821-52
  27. Parker DC. 2007. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol*331-60
  28. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K. 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.* 22:1067-8

- 
29. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
30. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100:1160-7
31. Reynolds HY. 2005. Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 171:98-102
32. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. 2007. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 97:755-62
33. Janeway C Jr TPWMaSM. 2007. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. ed. GP New York,
34. Reynolds HY. 2005. Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 171:98-102
35. Reynolds HY. 2005. Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 171:98-102
36. Lau EK, Paavola CD, Johnson Z, Gaudry JP, Geretti E, Borlat F, Kungl AJ, Proudfoot AE, Handel TM. 2004. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J. Biol. Chem.* 279:22294-305
37. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25:787-820
38. Viola A, Luster AD. 2007. Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in Immunity and Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*
39. Marinari UM, Nitti M, Pronzato MA, Domenicotti C. 2003. Role of PKC-dependent pathways in HNE-induced cell protein transport and secretion. *Mol. Aspects Med.* 24:205-11
40. Mellado M, Serrano A, Martinez C, Rodriguez-Frade JM. 2006. G protein-coupled receptor dimerization and signaling. *Methods Mol. Biol.* 332:141-57
41. Vroon A, Heijnen CJ, Kavelaars A. 2006. GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 80:1214-21

- 
42. Pober JS, Sessa WC. 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol* 7:803-15
43. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:401-16
44. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol* 7:678-89
45. Luster AD. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338:436-45
46. von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, Michie SA, Brown DA, Karolak D, Ramezani L, Berger EM, Arfors KE, Butcher EC. 1993. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood* 82:182-91
47. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A, von Andrian UH. 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.* 194:1361-73
48. Lemanske RF, Jr., Busse WW. 2003. 6. Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:S502-S519
49. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention .GINA.** 2006.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
50. Larche M, Akdis CA, Valenta R. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6:761-71
51. Romagnani S. 2004. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112:352-63
52. Cookson W, Moffatt M. 2004. Making sense of asthma genes. *N. Engl. J. Med.* 351:1794-6
53. Secretaria de Salud. 2004. Asma y estado asmatico. *Sistema nacional de vigilancia epidemiologica. Epidemiologia sistema unico de información* 21:
54. Leslie Gartner. 1997. Histologia Texto Y Atlas

- 
55. de Heer HJ, Hammad H, Kool M, Lambrecht BN. 2005. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin. Immunol.* 17:295-303
56. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 3:721-32
57. Wills-Karp M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* 17:255-81
58. Caughey GH. 2007. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol. Rev.* 217:141-54
59. Leigh R, Ellis R, Wattie JN, Hirota JA, Matthaei KI, Foster PS, O'Byrne PM, Inman MD. 2004. Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained airway dysfunction and airway remodeling in mice. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 169:860-7
60. Luster AD, Tager AM. 2004. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat. Rev. Immunol.* 4:711-24
61. Busse WW. 1998. Leukotrienes and inflammation. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 157:S210-S213
62. Rothenberg ME. 1998. Eosinophilia. *N. Engl. J. Med.* 338:1592-600
63. Rothenberg ME, Hogan SP. 2006. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24:147-74
64. Elsner J, Kapp A. 2001. The chemokine network in eosinophil activation. *Allergy Asthma Proc.* 22:139-48
65. Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez A, Siegelman MH, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. 1996. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J. Clin. Invest* 98:2332-45
66. Umetsu DT, DeKruyff RH. 2006. Immune dysregulation in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 18:727-32
67. Lambrecht BN. 2006. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity.* 24:366-8
68. Thomas SY, Lilly CM, Luster AD. 2006. Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. *N. Engl. J. Med.* 354:2613-6

- 
69. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. 2004. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu. Rev. Immunol.* 22:789-815
70. Fulkerson PC, Fischetti CA, Hassman LM, Nikolaidis NM, Rothenberg ME. 2006. Persistent effects induced by IL-13 in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35:337-46
71. Bikfalvi A. 2004. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem. Pharmacol.* 68:1017-21
72. Schober A, Zerneck A. 2007. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 97:730-7
73. Serhan CN, Savill J. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6:1191-7
74. Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-52
75. Kips JC. 2001. Cytokines in asthma. *Eur. Respir. J. Suppl* 34:24s-33s
76. Luster AD, Rothenberg ME. 1997. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 62:620-33
77. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. 1996. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat. Med.* 2:449-56
78. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. 1994. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med.* 179:881-7
79. Fulkerson PC, Fischetti CA, McBride ML, Hassman LM, Hogan SP, Rothenberg ME. 2006. A central regulatory role for eosinophils and the eotaxin/CCR3 axis in chronic experimental allergic airway inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:16418-23
80. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. 2003. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:227-42
81. Pease JE, Williams TJ. 2006. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:305-18

- 
82. Abonyo BO, Lebby KD, Tonry JH, Ahmad M, Heiman AS. 2006. Modulation of eotaxin-3 (CCL26) in alveolar type II epithelial cells. *Cytokine* 36:237-44
83. Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD. 1996. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.* 157:5613-26
84. Iwamoto T, Okamoto H, Iikuni N, Takeuchi M, Toyama Y, Tomatsu T, Kamatani N, Momohara S. 2006. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology. (Oxford)* 45:421-4
85. Kalayci O, Sonna LA, Woodruff PG, Camargo CA, Jr., Luster AD, Lilly CM. 2004. Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma. *J. Asthma* 41:27-33
86. Lamkhioued B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S, Nakamura H, Jedrzkiewicz S, Wagner L, Renzi PM, Allakhverdi Z, Lilly C, Hamid Q, Luster AD. 2000. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162:723-32
87. Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, Garcia-Zepeda EA, Yamaguchi K, Lilly CM. 2001. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281:L1288-L1302
88. Petering H, Hochstetter R, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, Elsner J. 1998. Detection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. *J. Immunol.* 160:555-8
89. Combadiere C, Ahuja SK, Van Damme J, Tiffany HL, Gao JL, Murphy PM. 1995. Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J. Biol. Chem.* 270:29671-5
90. Ganzalo JA, Jia GQ, Aguirre V, Friend D, Coyle AJ, Jenkins NA, Lin GS, Katz H, Lichtman A, Copeland N, Kopf M, Gutierrez-Ramos JC. 1996. Mouse Eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but it is not restricted to a Th2-type response. *Immunity.* 4:1-14
91. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, Martinez A, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 188:157-67

- 
92. Combadiere C, Ahuja SK, Murphy PM. 1995. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* 270:16491-4
93. Torres R, Picado C, de Mora F. 2005. [Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans]. *Arch. Bronconeumol.* 41:141-52
94. Lloyd CM, Gonzalo JA, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. 2001. Mouse models of allergic airway disease. *Adv. Immunol.* 77:263-95
95. Brewer JM. 2006. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol. Lett.* 102:10-5
96. Torres R, Picado C, de Mora F. 2005. [Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans]. *Arch. Bronconeumol.* 41:141-52
97. Luster AD, Rothenberg ME. 1997. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 62:620-33
98. Kips JC, Pauwels RA. 2001. Long-acting inhaled beta(2)-agonist therapy in asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164:923-32
99. Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, Fowler-Taylor A, Cioppa GD, van As A, Gupta N. 2001. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:184-90
100. Proudfoot AE, Power CA, Rommel C, Wells TN. 2003. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. *Semin. Immunol.* 15:57-65
101. Gong JH, Clark-Lewis I. 1995. Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues. *J. Exp. Med.* 181:631-40
102. Elsner J, Petering H, Kimmig D, Wells TN, Proudfoot AE, Kapp A. 1999. The CC chemokine receptor antagonist met-RANTES inhibits eosinophil effector functions. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:462-5
103. Lloyd CM, Gutierrez-Ramos JC. 2004. Animal models to study chemokine receptor function: in vivo mouse models of allergic airway inflammation. *Methods Mol. Biol.* 239:199-210
104. Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bluethmann H. 1994. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin. Exp. Allergy* 24:73-80

- 
105. Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, Isono K, Kawatani K, Izumo T, Nagai A. 2006. Elimination of IL-13 reverses established goblet cell metaplasia into ciliated epithelia in airway epithelial cell culture. *Allergol. Int.* 55:329-36
106. Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, Garcia-Zepeda EA, Yamaguchi K, Lilly CM. 2001. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281:L1288-L1302
107. Stelekati E, Orinska Z, Bulfone-Paus S. 2007. Mast cells in allergy: Innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology* 212:505-19
108. Torres R, Picado C, de Mora F. 2005. [Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans]. *Arch. Bronconeumol.* 41:141-52
109. Chvatchko Y, Proudfoot AE, Buser R, Juillard P, Alouani S, Kosco-Vilbois M, Coyle AJ, Nibbs RJ, Graham G, Offord RE, Wells TN. 2003. Inhibition of airway inflammation by amino-terminally modified RANTES/CC chemokine ligand 5 analogues is not mediated through CCR3. *J. Immunol.* 171:5498-506
110. Sarafi MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, Charo IF, Luster AD. 1997. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J. Exp. Med.* 185:99-109
111. Jia GQ, Gonzalo JA, Lloyd C, Kremer L, Lu L, Martinez A, Wershil BK, Gutierrez-Ramos JC. 1996. Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 184:1939-51
112. Elsner J, Dichmann S, Kapp A. 1995. Activation of the respiratory burst in human eosinophils by chemotaxins requires intracellular calcium fluxes. *J. Invest Dermatol.* 105:231-6
113. Russo C, Polosa R. 2005. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin. Sci. (Lond)* 109:135-42
114. Tiffany HL, Alkhatib G, Combadiere C, Berger EA, Murphy PM. 1998. CC chemokine receptors 1 and 3 are differentially regulated by IL-5 during maturation of eosinophilic HL-60 cells. *J. Immunol.* 160:1385-92
115. Yang M, Hogan SP, Mahalingam S, Pope SM, Zimmermann N, Fulkerson P, Dent LA, Young IG, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS. 2003. Eotaxin-2 and IL-5 cooperate in the lung to regulate IL-13 production and airway eosinophilia and hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:935-43



---

116. Sciutto E, Rosas G, Hernandez M, Morales J, Cruz-Revilla C, Toledo A, Manoutcharian K, Gevorkian G, Blancas A, Acero G, Hernandez B, Cervantes J, Bobes RJ, Goldbaum FA, Huerta M, Diaz-Orea A, Fleury A, de Aluja AS, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L, Fragoso G, Larralde C. 2007. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine* 25:1368-78