



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINAS
CCR9 EN LA REGULACIÓN DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA EN UN
MODELO MURINO ALÉRGICO PULMONAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CYNTHIA PAOLA LÓPEZ PACHECO



MÉXICO, D.F.

2009



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:

PRESIDENTE: Q.F.B. Saturnino de León chapa
VOCAL: Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas
SECRETARIO: Dr. Eduardo Alberto García Zepeda
1er. SUPLENTE: Dra. Patricia Elvira Berrón Ruiz
2do. SUPLENTE: Dra. Mónica Berenice Heras Chavarria

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Eduardo Alberto García Zepeda

SUSTENTANTE:

Cynthia Paola López Pacheco

*“Si te vieres rodeado de mucha gente ignorante,
no te envanezcas por lo que sabes,
más bien mira a los que te superan en conocimientos
y verás que aún no eres lo que te imaginas ser;
y estas por debajo de muchos.”*

Mahoma

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a Dios por llenarme de bendiciones cada día, por permitirme culminar una etapa de formación muy importante, por darme vida y salud para realizar una gran meta, por continuar siendo una luz que me guía y me llena de fuerza y esperanza, y por demostrarme en cada conocimiento que adquiero la grandiosa armonía de la vida.

A mi madre Concepción Pacheco. Por ser una mujer con grandes cualidades y valores, por hacer de mis problemas los suyos, por demostrarme su inmenso amor con hechos estando presente en cada momento importante de mi vida y por enseñarme con su ejemplo a ser una persona valiente y que el único tesoro en nuestra vida es la familia.

A mi padre Alberto López por demostrar que una de sus principales motivaciones es formar personas de bien en mis hermanos y en mí, por ser el apoyo más importante que me ha permitido llegar hasta este nivel, enseñándome con su ejemplo a ser honesta y responsable y por anteponer mis necesidades a las suyas.

A mis hermanos: Karla, porque has sido una persona que confía en mí y me impulsa a creer que puedo hacer cosas que ni yo misma me imagino capaz de hacer, por estar en cada momento apoyándome y porque ha sido un gran ejemplo para mí ya que toda nuestra vida te he seguido los pasos hasta la Facultad. Betin, por ser un “pequeño” gran apoyo y por darme lecciones de vida a tu corta edad, por ser una motivación para mí de aprender nuevas cosas cada día y poder transmitir las a quien lo necesite. Gracias a los dos por ser una parte muy importante de mí.

Al Dr. Eduardo García Zepeda por haberme integrado a su equipo de trabajo y demostrar su interés en mi formación profesional y académica, por la paciencia en mi Introducción al mundo de la Investigación y además del apoyo que he recibido para la elaboración de este trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio: Erika, eres la responsable de haber sembrado en mí la semilla de la curiosidad por la Investigación, además que has sido un gran ejemplo a seguir debido a tu dedicación, pasión y entrega a la Inmunología, por la ayuda y paciencia en las largas jornadas de sol a sol los días de

sacrificio, sin olvidar que además de compañera has sido una buena amiga. Mariana, por la sencillez y apoyo demostrado, por ser una excelente y solidaria compañera. Mayte, por ser una mujer luchadora e incanzable, un ejemplo de entereza y amiga; porque me has enseñado que en la vida las cosas que deseamos son las más difíciles pero no imposibles de lograr con persistencia. Vanessa, porque me has escuchado cuando lo he necesitado y por la confianza que me has brindado. Ana Luisa por la disposición que has tenido para ayudarme, por aclarar mis dudas, por ser muy sencilla conmigo y por haber sido un hombro para llorar cuando los experimentos no salían. Julio, muchas gracias por estar pendiente de mi estado de ánimo y por alentarme cuando parece que las cosas no van bien, por ponerme apodos y por el su interés en ayudar a resolver ciertas dudas técnicas en el laboratorio. Ana Rojas, por estar dispuesta a ayudarme y a enseñarme lo que necesito aprender y por amenizar siempre el silencio del laboratorio. Fernando quiero agradecerte por ser un chico tan respetuoso y hacer agradable la convivencia de trabajo. Oscar, muchas gracias por haberme recibido muy bien en el laboratorio, por ser tan amistoso y por las noches de parranda en Huatulco y a Don Carmelo por su gran ayuda, por el apoyo con su experiencia.

A mis compañeros del laboratorio hermano. Ramsés, Germán, Diana, Violeta, Carlos, Roxana, Xochitl y Ehzadel por la ayuda que me brindaron y por proporcionarme reactivos cuando lo he necesitado.

A mis amigos: Lalin, por haber sido un hermano en toda nuestra etapa universitaria, me viste reír, llorar, dormir, caer y levantarme, en realidad me conociste tan bien como nadie y espero que eso no termine nunca. Cynthia, tocaya, la vida en la Facultad no hubiera sido lo mismo sin ti, siempre quise encontrar a una amiga con la que me identificara tanto y tuve la oportunidad de conocerte, gracias por seguir al pie del cañón escuchándome y preocupándote por mi. Moni, gracias porque has hecho la vida más fácil de sobrellevar y has permitido que mi vida en la Facultad no fuera tan dura como yo me la hubiera hecho, por confiar en mi y por quererme tanto. Isma, gracias porque me has ayudado en muchos aspectos y porque siempre asestado pendiente de mi, además quiero agradecer los hermosos momentos que me has regalado y por hacer inolvidable cada clase que compartí contigo. Sitlali, quiero agradecerte por ser una personita preocupada por los demás y porque me has conocido tan bien que sabes cuando algo me pasa, gracias por echarme porras y escuchar mis problemas académicos. A Gaby porque me has tenido mucha confianza y me has motivado a seguir adelante desde que nos conocemos y a Haideé por haber creado en mi cierta seguridad que no poseía y por enseñarme muchas cosas de la vida. Marco, por haber permitido que la amistad se conserve y por confiar en mí, además de motivarme y ser una persona que ha estado

dispuesta a escucharme. Ana Lilia, por enseñarme a no ser tan inocente y por ser un verdadero apoyo cuando se necesita, además de mostrarme su gran capacidad de olvidar.

A mis amigos: Iván, Rebe, Normita, Juan Gómez y Ramsés Vázquez porque en cada uno de ustedes tengo hermosos recuerdos y una gran admiración, porque cuando necesité de un consejo o alguien que me oriente estuvieron ahí, además de que me han enseñado que la definición "Universitario", va más allá del trabajo en las aulas o en la biblioteca.

A mis grandes amigas: Maribel, porque conoces mis más profundos secretos y has contribuido a la terminación de mis estudios preocupándote por mi estado de ánimo. Luz, por ser una verdadera Lucecita que me ha dado fuerzas y ánimos cuando pienso que todo va mal o cuando me bloqueo para escribir una tesis.

A mis amigas: Alinna, porque siempre me has motivado a querer ser como tu, una chica exitosa y dedicada y por recordarme siempre con tanto cariño, por estar pendiente de mi vida académica y por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida. A Alejandra porque siempre me has hecho sentir que si sirvo como QFB y que soy una buena estudiante y amiga, por hacerme reír cuando no hago mas que llorar y por confiar en mi.

A mis amigos Tere, Omarcito, Sandra, Eli y Anita porque han permanecido presentes y demostrando que soy especial para ustedes, porque me han motivado a seguir adelante semestre con semestre y me han dado ánimos cuando lo he necesitado.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por abrirme las puertas y recibirme para aplicar los conocimientos adquiridos durante mi carrera profesional, permitiéndome desarrollar un proyecto experimental de Investigación.

A la Máxima casa de Estudios, la UNAM, porque me abrió sus puertas y me formó profesionalmente con grandes valores y me dio la oportunidad de disfrutar de los beneficios de ser Universitario. Porque me permitió encontrar muchas aplicaciones de lo que aprendí en las aulas de la H. Facultad de Química.

Agradecimientos para la realización del presente trabajo

Agradezco de manera especial al apoyo y asesoría académica del Dr. Eduardo García Zepeda para el desarrollo de este proyecto de Investigación, así como por brindarme todas las facilidades para los experimentos que reporto en este trabajo.

A la Técnico Académico Q.F.B. Gisela Du Pont por el análisis del genotipo de los ratones CCR9 (-/-) utilizados en este trabajo. También se agradece de manera especial por el soporte técnico y asesoría brindada para el desarrollo de las técnicas y disposición de los reactivos utilizados en este trabajo.

A la Dra. Gloria Soldevila por la asesoría técnica brindada para los experimentos de citometría de flujo y en general en todo el proyecto de Investigación.

A la Dra. Teresa Fortoul van der Goes del Departamento de Biología Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM por su asesoría y soporte en el análisis histológico y morfométrico que se incluye en este trabajo.

A los estudiantes de Doctorado Wendy Xolalpa y Antonio Javier Vallecillo del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por el soporte técnico brindado.

A Verónica Rodríguez y Judith Reyes de la Unidad de Técnicas Histológicas en la Facultad de Medicina de la UNAM por el procesamiento de las muestras de tejido para el análisis histológico de este trabajo.

Este trabajo fue apoyado por la beca CONACyT para becarios de Licenciatura para el no. de proyecto 58294 durante el período abril-junio 2008.

Se recibió un apoyo para este trabajo del “Programa de Apoyo a Proyectos de estudiantes de Licenciatura” de CONACyT de 2009.

ABREVIATURAS

Alum	Emulsión de hidróxido de aluminio y magnesio
BALT	Tejido linfoide asociado a vías aéreas
CCL	Quimiocina
CCR	Receptor de quimiocinas de la familia CC
CXCR	Receptor de quimiocinas de la familia CXC
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DC	Célula dendrítica
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
GAGs	Glucosaminoglicanos
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HE	Hematoxilina/eosina
HRP	Peroxidasa de rábano
i.p	Administración intraperitoneal
IFN- γ	Interferón gamma
iNKT	Célula T citotóxica natural de cadena invariante
LBA	Lavados broncoalveolares
M-MLVRT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina-Moloney
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NALT	Tejido linfoide asociado a nasofarínge.
OVA	Proteína ovoalbúmina
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSGL1	Ligando de glicoproteína de P-selectina
RT PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa
SFB	Suero fetal bovino

TAE	Solución de tris-acetato EDTA
TECK	Quimiocina expresada en timo
TGF- β	Factor transformante de crecimiento beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TCR	Receptor de linfocito T
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

RESUMEN

La incidencia de enfermedades inflamatorias alérgicas de vías respiratorias se ha incrementado durante las últimas décadas en todo el mundo y por tanto, el interés en la investigación de los mecanismos celulares y moleculares que participan en la enfermedad. Esto con el fin de proponer blancos terapéuticos importantes.

Particularmente, el asma es modulada entre otras cosas por la migración de leucocitos específicos a vías respiratorias. El control de este reclutamiento es mediado por quimiocinas que son citocinas importantes que controlan la migración y el reclutamiento selectivo homeostático hacia los órganos mediante receptores acoplados a proteínas G. Estos se encuentran distribuidos diferencialmente a través de distintos tipos celulares. CCR9, uno de estos, es el receptor implicado en el desarrollo de los timocitos durante la ontogenia ya que se sobreexpresa en la transición de estadio dobles negativos a dobles positivos.(Papadakis et al 2000; Wurbel et al 2000) Asimismo, existe una participación muy importante en la migración selectiva de linfocitos T a intestino delgado por parte de este receptor y su ligando, la quimiocina CCL25 (TECK).(Bowman et al, 2002; Kunkel et al, 2003)

CCR9 se expresa diferencialmente en otras poblaciones celulares como eosinófilos, y recientemente en humanos se ha descrito que existe una sobreexpresión de CCR9 en células iNKT de pacientes con asma alérgica (Sen et al, 2006); sin embargo, aún no es claro el papel de CCR9 en la regulación de la alergia pulmonar en otras poblaciones celulares. Es por ello que estamos interesados en buscar este papel regulador del receptor en el proceso inflamatorio, utilizando un modelo de alergia pulmonar en ratones deficientes del receptor de CCR9.

En este estudio, en el análisis del número de células totales en lavados broncoalveolares (LBA) y tejido pulmonar no se demuestran diferencias significativas; sin embargo en los ganglios mediastinales del ratón alérgico sí se observó una disminución significativa.

El análisis histológico y morfométrico demostró menor reclutamiento celular en ausencia de CCR9 hacia pulmón en condiciones de alergia, se observó una disminución en el número de eosinófilos en LBA. El análisis de los tipos celulares de acuerdo a la expresión de marcadores superficiales: CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b, CCR3 no se vio modificada en ausencia de CCR9 en LBA ni en tejido pulmonar. Sin embargo, estos marcadores se redujeron significativamente en CCR9 -/- comparado con CCR9 (+/+) en los ganglios linfáticos mediastinales.

La ausencia de CCR9 modifica la expresión de otros receptores como CCR2, CCR4, CCR3 y CCR5 en el tejido pulmonar. Los resultados al evaluar el nivel de IL-10, demostraron una disminución en los niveles en el ratón deficiente de CCR9. Los niveles de mRNA de quimiocinas como CCL2, CCL5, CCL11 y CCL12 se afectan en ausencia de CCR9.

ÍNDICE

	Contenido	Página
I.	Introducción.....	1
1.1	El sistema inmune.	1
1.2	Quimiotaxis y tráfico leucocitario en homeostasis e inflamación	8
1.3	Quimiocinas: Estructura y clasificación	8
1.4	Proceso alérgico pulmonar	18
II.	Antecedentes.....	27
III.	Planteamiento del Problema.....	28
IV	Justificación.....	29
V	Hipótesis.....	30
VI.	Objetivos	31
VII.	Metodología.....	32
7.1	Extracción de DNA de cola de ratón por el método de fenol-cloroformo y genotipo de ratones CCR9 (-/-)	32
7.2	Modelo de alergia pulmonar	33
7.3	Análisis de muestras	34
7.4	Ensayo de quimiotaxis hacia la quimiocina CCL25	35
7.5	Conteo total y diferencial de células en LBA	36
7.6	Tinción de células para citometría de flujo	36
7.7	Extracción de RNA	37
7.8	Síntesis de cDNA	38
7.9	RT-PCR semicuantitativa	39
7.10	RT-PCR tiempo real	39
7.11	Análisis de citocinas en LBA por ELISA	40
7.12	Análisis de inmunoglobulinas en suero.	40
7.13	Análisis histológico de tejido pulmonar	41
7.14	Análisis estadístico	42
VIII.	Resultados	43
IX.	Discusión.....	61
X.	Conclusiones.....	71
XI.	Bibliografía.....	72
XII	Apéndices.....	80

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 EI SISTEMA INMUNE

Constantemente los seres vivos están expuestos a una gran cantidad de microorganismos infecciosos y otras sustancias extrañas capaces de causar enfermedad. El sistema inmune comprende todos los mecanismos a través de los cuáles dichos organismos se defienden; sin embargo también es responsable de procesos patológicos perjudiciales para el individuo tales como hipersensibilidad y autoinmunidad [1]. De manera general, el sistema inmune comprende tanto barreras físicas como principalmente los elementos celulares y humorales que se encargan de llevar a cabo los procesos de comunicación, erradicación y reparación del daño. [1]

1.1.1 INMUNIDAD INNATA E INMUNIDAD ADAPTATIVA

Para su estudio, se ha clasificado al sistema inmune como sistema inmune en innato y adaptativo. La inmunidad innata comprende algunas moléculas de defensa y reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en las células de la inmunidad innata (ver tabla 1)

En vertebrados, (los únicos seres vivos que pueden montar respuesta inmune adaptativa), podemos encontrar mecanismos que inhiben la activación de la inmunidad innata.

La inmunidad adaptativa, involucra variabilidad y rearreglo de segmentos de genes para la expresión de sus receptores específicos de antígeno, es por ello que el sistema inmune adaptativo proporciona un reconocimiento específico, memoria inmunológica ante las infecciones y expresión de proteínas adaptadoras patógeno-específicas. Como se mencionó anteriormente, en algunas ocasiones la inmunidad adaptativa también es responsable de procesos autoinmunes, alergias y el rechazo de los trasplantes. [2, 3]

TABLA I. DIFERENCIAS ENTRE INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
REPRESENTANTES CELULARES	<ul style="list-style-type: none"> • Fagocitos mononucleares. Monocitos (Macrófagos). • Polimorfonucleares. Eosinófilos, basófilos y neutrófilos. • Células NK • Células NKTs • Células dendríticas • Células cebadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos T • Linfocitos B • Células NKTs • Linfocitos T $\gamma\delta$ • Células T reguladoras
REPRESENTANTES HUMORALES	<ul style="list-style-type: none"> • Complemento • Defensinas • Catelisinidas • PRR solubles: CRP, SAP, (pentraxinas) MBL.(colectina) • Superficie. MMR, DEC205, MSR, MARCO. • Intracelulares. PKR, NOD (CARD) TLR (MYD88) 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos
DISTRIBUCIÓN	No clonal. Todas las células son idénticas de la misma clase. Receptores	Hay expansión celular de clones distintas por cada clase de linfocito
AUTOINMUNIDAD	Perfecta discriminación / propio-no propio	Imperfecta discriminación propio-no propio
TIEMPO RESPUESTA	Temprana	Tardía
MEMORIA	No	Si
RECONOCIMIENTO	Receptores codificados en línea germinal	Repertorio codificado en segmentos de genes y sufren rearreglos durante desarrollo.
ACTIVACIÓN	Reconocimiento de PAMPs por TLRs, PRRs.	Reconocimiento, activación, procesamiento y presentación por el sistema inmune innato.

Modificado de Janeway, 2002.

1.1.2 INMUNIDAD INNATA

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra las infecciones y es capaz de reconocer compuestos derivados de microorganismos. Se pueden generar distintas respuestas debido al reconocimiento de estructuras específicas que son compartidas por clases particulares de microorganismos. Estas estructuras incluyen ácidos nucleicos con características particulares provenientes de microorganismos, factores proteínicos que se encuentran solamente en microorganismos, lípidos y carbohidratos complejos que son sintetizados por dichos microorganismos y son diferentes químicamente a las producidas por células del hospedero.[7]

Este reconocimiento se lleva a cabo en células efectoras de la inmunidad innata, tales como los neutrófilos, los fagocitos mononucleares y las células “Natural Killer” (NK) (Tabla 2). Algunos mecanismos efectoras que realizan estas células son la secreción de citocinas que activan a los fagocitos y estimulan el reclutamiento celular al sitio afectado conocido como inflamación. [7].

TABLA 2. COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA

Componentes	Funciones principales
Barreras	
Superficies epiteliales	Prevención de la entrada microbiana
Defensinas	Muerte celular de microorganismos
Linfocitos Intraepiteliales	Muerte celular de microorganismos
Células efectoras circulantes	
Neutrófilos	Fagocitosis temprana y muerte celular
Macrófagos	Fagocitosis eficiente, muerte celular, secreción de citocinas que estimulan la inflamación
NKs	Lisis de células infectadas, activación de macrófagos.
Proteínas efectoras	
Compelmento	Destrucción de microorganismos, opsonización de microorganismos, activación de leucocitos
Lectinas de unión a manosa	Opsonización microbiana y activación del complemento
Proteína C-reactiva	Opsonización microbiana y activación del complemento
Factores de coagulación	Recuperan la integridad de tejidos dañados y barreras de tejidos infectados.
Citocinas	
TNF, IL-1, quimiocinas	Inflamación
IFN- α , - β	Resistencia a infecciones virales
IFN- γ	Activación de los macrófagos
IL-12, IL-18,IL-23	Producción de IFN- γ por NKs y linfocitos T
IL-10,TGF- β	Control de la inflamación

Modificado de Abbas, A. 5ª edición.

1.1.3 LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

1.1.3.1 ANATOMÍA DEL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

Para asegurar que se lleven a cabo el reconocimiento de antígenos y las interacciones celulares necesarias para la activación de la inmunidad adaptativa, los linfocitos y las células presentadoras de antígeno se localizan en tejidos u órganos definidos anatómicamente en donde los antígenos también tienen que circular concentrarse.

Estos órganos linfoides se clasifican de acuerdo a los eventos celulares que se llevan a cabo en ellos. En los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) se llevan a cabo los primeros eventos de expresión de receptores y maduración de las células inmunes. En los órganos linfoides secundarios, se inicia el reconocimiento antigénico por los linfocitos y el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Los órganos linfoides de periferia incluyen nódulos linfáticos, bazo, sistema inmune cutáneo y sistema inmune asociado a mucosas (BALT, NALT, GALT) [4].

Los ganglios linfáticos, que son los órganos linfoides más distribuidos a lo largo de todo el sistema linfoide, son agregados nodulares que consisten en una corteza externa y una corteza interna. Cada nódulo linfático o ganglio es rodeado por una cápsula fibrosa que es comunicada con el sistema linfático a través de numerosos vasos linfáticos aferentes, los cuales vacían el contenido linfático en la región subcapsular y esta linfa sale del ganglio a través de vasos linfáticos eferentes. A lo largo de la región subcapsular, la corteza externa contiene folículos que son agregados celulares, los cuales a su vez pueden contener centros germinales que se desarrollan en respuesta a un estímulo antigénico. Los folículos son las zonas de linfocitos B en el nódulo linfático. Los linfocitos T y las células dendríticas se encuentran entre los folículos. [4, 5]

La segregación anatómica de diferentes clases de linfocitos en distintas áreas del nódulo es dependiente de quimiocinas. Los linfocitos T vírgenes y las células dendríticas expresan el receptor de quimiocinas CCR7 por lo que se dirigen hacia la misma zona del nódulo, en cambio, los linfocitos B expresan al receptor CXCR5 cuyo ligando se encuentra en los folículos, razón por la cual se dirigen a esa zona.[6]

1.1.3.2 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA PRIMARIA

Las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) más especializadas son las células dendríticas. Éstas ingieren el antígeno en el sitio de la infección y se activan como parte de la respuesta inmune innata. Esto induce su migración a órganos linfoides regionales (o tejido linfoide asociado) mediada por las quimiocinas, lo cual induce su maduración como células presentadoras de antígeno lo que las hace muy efectivas para activar a los linfocitos T no activados.

Los antígenos intracelulares provenientes de microorganismos y de las mismas células del hospedero son reconocidos, procesados como péptidos y son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I a los linfocitos T citotóxicos (CD8+) cuyo blanco de citotoxicidad son las células infectadas. Los péptidos derivados de material extracelular son ingeridos, procesados y acarreadas a la superficie celular por el MHC clase II y presentado a las células TCD4+ [5]. A su vez, estos linfocitos T CD4+ pueden diferenciarse a células efectoras tipo Th1 y Th2 en base al microambiente de citocinas que genera el reconocimiento del antígeno. Las células efectoras tipo Th1 activan las propiedades microbicidas de macrófagos e inducen la producción de anticuerpos clase IgG por la secreción de citocinas como de IFN- γ y TNF- α , y favorecen el cambio de isotipo a IgG2a, (en ratón) IgG1 e IgG3 (en humano). También se distingue esta subpoblación por la expresión de receptores de quimiocinas como CCR1, CCR2, CCR5 y CXCR3. [7]

Las células Th2 inician la respuesta humoral activando a las células B antígeno-específicas para producir anticuerpos de la clase IgE e IgG1 (en ratón), IgG4 e IgE (en humano), a través la producción de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. (6). Además, los linfocitos Th2 expresan diferencialmente a los receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 y CCR8. [7] Los linfocitos Th2, se relacionan principalmente con la activación de linfocitos B y el desarrollo de respuesta humoral protectora contra helmintos y respuestas alérgicas.

Una población, recientemente descrita de linfocitos T, es la subpoblación Th17. Estas células producen IL-17, esta citocina inflamatoria promueve la producción de otras citocinas como IL-6, IL-8, GM-CSF y la quimiocina CCL2 en fibroblastos, células epiteliales y endoteliales.

Esta subpoblación de linfocitos Th se ha relacionado con procesos de autoinmunidad, y se distinguen por la expresión del factor de transcripción ROR γ t [6, 8]

Otra población de linfocitos T que se ha descrito, es la de linfocitos T reguladores, los cuales se caracterizan por bloquear la activación y función de otros linfocitos T, se encuentran en la periferia. Se han identificado varios subtipos de células T reguladoras: células reguladoras naturales (N-Tregs), caracterizadas por los marcadores de superficie CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, estas células adquieren el fenotipo regulador durante su diferenciación en el timo. Otra subpoblación de células reguladoras denominadas Treg1 (CD4⁺ CD25⁻), adquieren el fenotipo regulador en periferia, debido a la estimulación por IL-10, citocina que posteriormente producen ellas mismas, además de TGF- β . [9, 10]

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- β , y al igual que las células Treg1 resultan importantes para mantener la tolerancia oral [9].

1.1.3.3 ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T

Los linfocitos T vírgenes recirculan constantemente a través de los nódulos linfáticos, así mismo, los antígenos que fueron reconocidos en la periferia son endocitados, procesados y transportados hacia los nódulos linfáticos. De esta manera, si un linfocito T virgen antígeno-específico reconoce por medio de su TCR al antígeno asociado al MHC de clase I o II (dependiendo de sus coreceptores CD8 y CD4 respectivamente), este linfocito será activado. Las señales que se generan por este reconocimiento, desencadenan la expresión de moléculas de adhesión, que aseguran una interacción estable del linfocito T con la APC. La activación completa requiere de señales secundarias que son provistas por la coestimulación a través de moléculas como CD28, LFA-1, CD40 e ICOS entre otras, que son expresadas por la APC para completar la sinapsis inmunológica. La activación, es complementada también, por las citocinas como la IL-12 que es secretada por las APC y la IL-2 que es secretada de manera autócrina por los linfocitos T. Este microambiente y conjunto de señales, favorecen la proliferación y diferenciación a linfocitos efectores y de memoria. [5, 11, 12]

1.1.3.4 COOPERACIÓN T-B Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Los linfocitos T cooperadores, activan a las células B cuando reconocen el antígeno específico unido al MHC en la superficie del linfocito B; esto desencadena que nuevamente el linfocito T se active y sintetice una serie de moléculas efectoras que sinergizan el efecto en la célula B, como son el TNF- α y CD40L. La unión de CD40 con su ligando, origina que la célula B ingrese a su ciclo celular, prolifere e induce el cambio de isotipo de la inmunoglobulina de membrana IgM a otra clase de anticuerpo dependiendo del perfil de citocinas secretado por el linfocito T cooperador. Una vez ocurrido el cambio de isotipo, la célula B se convierte en célula plasmática o en célula secretora de anticuerpos en periferia. [11, 13]

Las inmunoglobulinas son proteínas que se encuentran en suero y fluidos corporales. Éstas pueden encontrarse en forma soluble (anticuerpos) o anclados a la membrana de los linfocitos B (forma BCR). Cada molécula de anticuerpo está constituida por dos cadenas polipeptídicas conocidas como cadenas pesadas y otras dos cadenas polipeptídicas conocidas como cadenas ligeras, las cuales se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro. Tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras, tienen una región variable y otra conservada. Las cadenas ligeras completas forman parte de la fracción de unión al antígeno (Fab) y la región constante se conoce como fracción cristalizante (Fc).

Se han descrito cinco clases o isotipos principales de cadenas pesadas μ , δ , γ , α y ϵ y dos de cadenas ligeras κ y λ . 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. [7, 14]

1.2 QUIMIOTAXIS Y TRÁFICO LEUCOCITARIO EN HOMEOSTASIS E INFLAMACIÓN

Cada tejido debe presentar propiedades quimioatrayentes para las células del sistema inmune en condiciones normales y de inflamación. Esta quimiotaxis está regulada por la expresión de un perfil de moléculas quimioatrayentes específico en el tejido. Estas moléculas incluyen: mediadores lipídicos inflamatorios (prostaglandinas y leucotrienos), antimicrobianos (quimerina, defensina) citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α), derivados microbianos (fMet-Leu-Phe), proteínas derivadas del complemento (C3a, C5a) y quimiocinas. [15]

1.3 QUIMIOCINAS. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Las quimiocinas son citocinas pequeñas 8-10 kDa (aproximadamente 100 aminoácidos) a las que se les han atribuido propiedades quimioatrayentes principalmente. (10) Otras actividades que se les conocen son: regulación de la angiogénesis y fibrosis, proliferación y susceptibilidad a apoptosis. [16, 17]

Las familias de quimiocinas se han clasificado de acuerdo a sus propiedades estructurales, en base al número y posición de residuos de los residuos de cisteína que se encuentran muy conservados en toda la familia y que están cercanos al extremo amino terminal [18, 19]. La clasificación ordena a las familias CC, CXC, CX3C, (donde "x" corresponde a un aminoácido cualquiera) y la quimiocina C, la cual contiene solamente 2 cisteínas en lugar de 4 en esta porción conservada cercana al extremo amino terminal de las quimiocinas. [20]

1.3.1 FAMILIA CXC

La familia CXC contiene un subgrupo de quimiocinas que tienen tres aminoácidos entre el extremo N-terminal y la primera cisteína, (Glu-Leu-Arg) son conocidas como ELR-quimiocinas. Se sugiere que esta secuencia es necesaria para atracción de neutrófilos y esencial para la activación de los receptores CXCR1 (solo en humano) y CXCR2. Otra propiedad importante que se les confiere, es la angiogénesis, mientras que las quimiocinas no-ELR, poseen la capacidad de quimioatraer monocitos y linfocitos y que además son inhibitoras de la angiogénesis. [21]

1.3.2 FAMILIA CC

Es la familia de quimiocinas más numerosa. Se les atribuye la quimiotaxis de monocitos, linfocitos T, eosinófilos, basófilos, células dendríticas, linfocitos B, timocitos, progenitores linfoides y megacariocíticos. Las células que secretan estas quimiocinas son monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, células NK, mastocitos, linfocitos T, basófilos, plaquetas y células no inmunes como fibroblastos, células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales. Sus efectos biológicos son muy diversos: inducen activación del endotelio, son quimiotácticas, regulan la liberación de gránulos y enzimas, modulan la apoptosis, controlan crecimiento celular hematopoyético, etc. A quimiocinas como CCL11, CCL16 y CCL21 se les ha atribuido también un papel en la angiogénesis. [22]

1.3.3 FAMILIAS C y X3C

Son producidas por linfocitos T CD8, timocitos, mastocitos y células NK. Actúan principalmente sobre células NK y linfocitos T, induciendo su activación y quimiotaxis. La familia representada por fractalcina, tiene varias regiones, un dominio tipo quimiocina, una región tipo mucina con repeticiones serina-treonina y muchos polisacáridos laterales. [23]

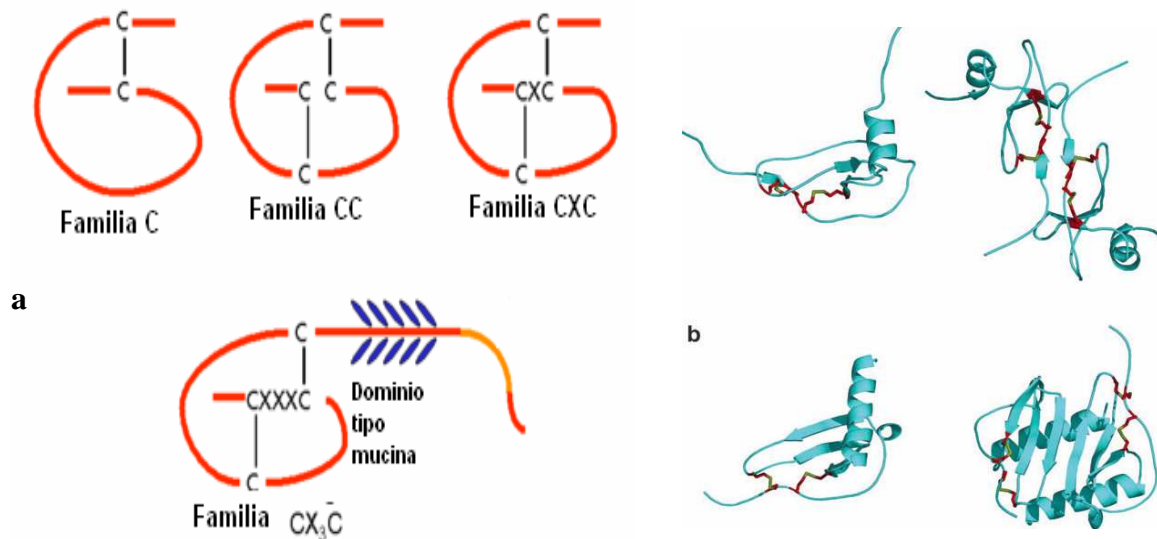


Figura 1. (a) Familias de quimiocinas y (b) Estructuras secundarias de las familias de quimiocinas. Modificado de Samantha Allen, 2007[24].

1.3.4 CASCADA DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA

En respuesta a estímulos proinflamatorios tales como TNF- α o IL-1 debidos al reconocimiento de un patógeno o a un estímulo inflamatorio, el endotelio es activado y como consecuencia expresa selectina-E y selectina-P. Estas selectinas presentan baja afinidad por sus ligandos expresados en los leucocitos, tales como la selectina-L. Las señales derivadas de la interacción de las selectinas y sus ligandos, permiten el rodamiento del leucocito por efecto de la disminución su velocidad en el flujo sanguíneo; esto conlleva a la activación de las integrinas por quimiocinas. Estas citocinas son expuestas en concentraciones altas en la superficie luminal del endotelio mediante los GAGs de heparan sulfato posterior a un estímulo antigénico o inflamatorio. Tras la activación de los receptores de quimiocinas por la unión de su ligando, se induce una modificación en las integrinas expresadas en los leucocitos que incrementa la afinidad por sus ligandos expresados en la superficie endotelial (Ej. VLA-4 y su ligando ICAM-1). Las principales consecuencias de esta interacción, son la adherencia muy fuerte de los leucocitos al endotelio y el rearreglo del citoesqueleto para atravesar las células endoteliales. El gradiente de quimiocinas formado desde el lugar de la inflamación, permite que las células sean capaces de transmigrar a través del interendotelio. Esta serie de pasos permite la acumulación de leucocitos en el sitio de inflamación [23]

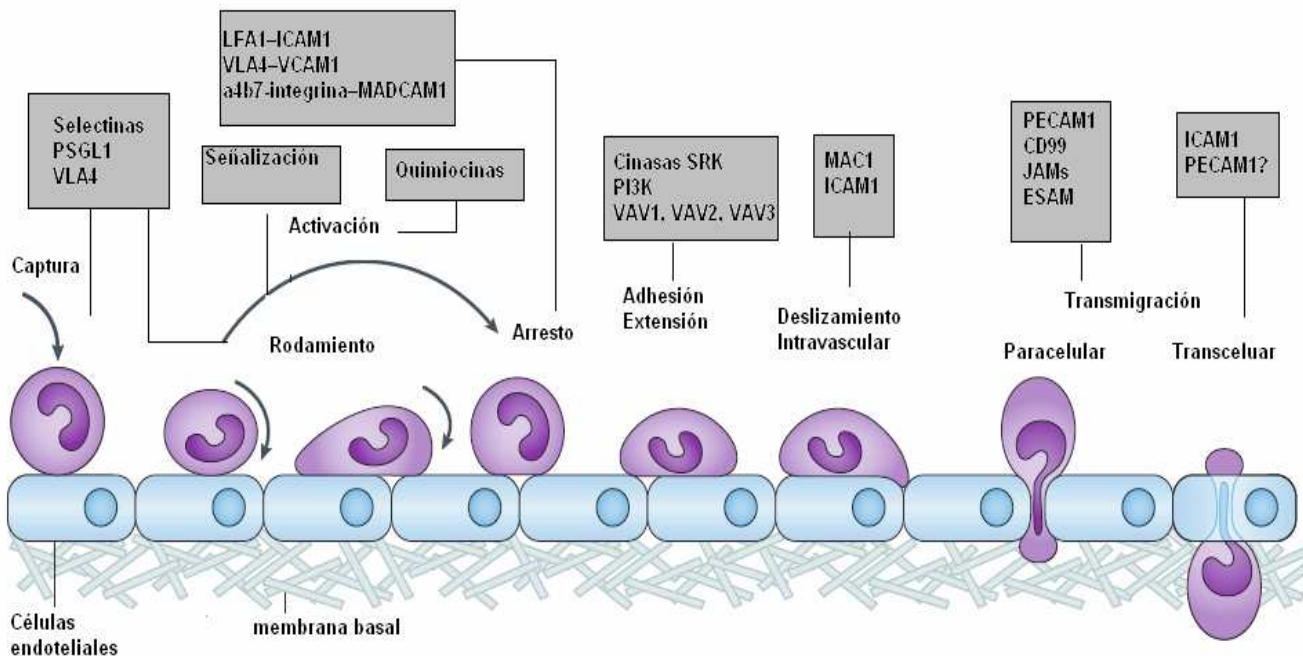


Figura 2. Cascada de adhesión leucocitaria Modificado de Ley, 2007. Nature Reviews

1.3.5 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Aproximadamente se han reportado 20 receptores de quimiocinas. Estos son receptores con 7 unidades transmembranales (7TM) y con 7 regiones extracelulares conectadas por bucles extracelulares acoplados a proteína G. La habilidad de los receptores de quimiocinas para señalar después de la interacción con su ligando, se debe a la presencia de un motivo DRY en el segundo bucle intracelular.

La activación consiste en que la subunidad $G\alpha$ de la proteína G trimérica, interactúa con los bucles intracelulares. Así mismo, se encuentran unidos a las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$. La subunidad $G\alpha$ contiene un dominio de GTPasa que involucra la hidrólisis de una molécula de GTP, esto ocurre solo en estado activo de la proteína G. [25, 26]

1.3.5.1 CCL25. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES.

CCL25 es una quimiocina cuya expresión es constitutiva y que dirige el tráfico leucocitario de manera homeostática a órganos linfoides primarios, específicamente el timo. Se conoce como CCL25 o TECK (quimiocina expresada en timo).

El locus *teck*, se encuentra localizado en el cromosoma 8 de ratón [27] y en el cromosoma 19 en humano [28]; a diferencia de otras quimiocinas de la familia CC, contiene un residuo de tirosina en la posición 52, a lo que se le atribuye posiblemente la quimiotaxis de monocitos por lo que se ha sugerido que esta quimiocina tiene un origen previo en la escala evolutiva y que ha ido modificándose para asegurar funciones similares a las otras quimiocinas debido al parecido en sus estructuras secundarias y terciarias. [27]

Se ha identificado la expresión de mRNA de TECK de manera alta en timo adulto por células dendríticas estromales, en el timo fetal por el epitelio MHCII⁺ y en bazo después de estimulación con LPS. Además se encuentra la expresión restringida a intestino delgado, tanto en ratón como en humano [27, 29] y en el epitelio de las criptas del yeyuno e íleon. [30] A pesar de que Teca se expresa en grandes cantidades en intestino delgado, no se encuentra en colon ni otros epitelios adyacentes, lo cual sugiere que la expresión restringida de CCL25 y su receptor, controlan el reclutamiento y la colocalización de linfocitos especializados lo cual confiere características inmunitarias a diferentes superficies epiteliales [30].

Esta quimiocina induce quimiotaxis en células dendríticas de bazo y macrófagos activados por IFN- γ , así como en timocitos inmaduros CD4+CD8+ y linfocitos simples positivos CD4+ ó CD8+ maduros, lo cuál sugiere el papel potencial que tiene CCL25 y su receptor en el desarrollo de los linfocitos T en timo [31]

1.3.5.2 CCR9. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

CCR9 es el receptor específico y único para la quimiocina CCL25. Dicho receptor, cuya secuencia de aminoácidos es de 369, posee un patrón de expresión restringido a timo, intestino delgado y de manera muy débil, a bazo y nódulos linfáticos. Por ello, se ubica filogenéticamente en la familia de CCR6 y CCR7. Así mismo, se relaciona la expresión de CCR9 con su ligando en linfocitos T maduros e inmaduros, por lo que se implica de manera importante a CCR9 en el desarrollo de células T en timo [32].

CCR9 se encuentra codificado por un gen único en el cromosoma 3. Como otros receptores de quimiocina, contiene residuos ácidos cercanos al extremo N-terminal y contiene un sitio para N-glicosilación en la región N-terminal (Asn32). Así mismo, se conocen cisteínas conservadas en los *loops* intracelulares 1 (Cys119) y 2 (Cys198). Además, contiene un residuo de cisteína en el extremo carboxilo terminal que puede ser palmitoinilado [33].

Se conocen dos proteínas receptoras para CCL25 a las cuales se les ha designado el nombre de CCR9A y CCR9B respectivamente. CCR9A contiene 12 aminoácidos adicionales en su extremo amino terminal en comparación a CCR9B. Otro aspecto importante de ambos receptores, es que existe una diferencia funcional entre ambas proteínas, la cual radica en la diferencia de concentración de quimiocina necesaria para activar a CCR9A, la cual es menor a la requerida por CCR9B para activarse [33]. Esto es importante debido a que podría existir esta extensión en el rango de concentraciones de quimiocina, sobre la cual podrían distinguir un aumento en la concentración de ligando. En linfocitos, se conoce un rango de CCR9A y CCR9B aproximadamente de 10:1[33].

1.3.5.3 EL DESARROLLO DE TIMOCITOS EN TIMO Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTROMA.

Posterior a la migración de precursores tímicos de médula ósea a timo para su desarrollo, éstos avanzan hacia la corteza a su estadio doble negativo CD4-CD8- con su TCR en codificación de línea germinal. Una vez que de este se rearregla la cadena β , se asocia con la pre-cadena α que aún no se rearregla y éstas a su vez se unen a CD3 para formar el complejo pre-TCR, el cual envía señales independientes de antígeno, las cuales guían al estadio doble positivo (DP), esto asegura que el TCR sea funcional y la cadena rearreglada continúe su maduración. A partir de ese momento, se lleva a cabo la exclusión alélica del locus de la cadena β y estas células proliferan hasta 100 veces. El segundo punto de control durante la ontogenia de los linfocitos T es mediado por las señales realizadas por el complejo TCR en la selección positiva o negativa. La alta unión a péptido da lugar a la selección negativa y la baja unión o nula da lugar a la muerte por negligencia. Los timocitos DP, de los cuales su complejo TCR se une a complejos de MHC-péptido presentes en la superficie de las células estromales con la afinidad apropiada, sufren señales que los llevan a la diferenciación CD4 o CD8 SP [34]. Finalmente, antígenos propios son presentados a través de las células dendríticas estromales mediante el factor de transcripción AIRE (regulador de autoinmunidad). Los timocitos capaces de reconocer estos antígenos son dirigidos a apoptosis como un mecanismo de tolerancia central. Para llevar a cabo los procesos de presentación, es necesaria la aproximación debida de los timocitos con las células estromales. [34]

La migración de los timocitos al timo ocurre en la corteza de adentro hacia fuera en su transición de DN a DP. Posteriormente migran a médula ósea como linfocitos SP. Las quimiocinas y sus receptores regulan esta migración en timo y en tejidos periféricos. Los timocitos en desarrollo expresan distintos receptores de quimiocinas en respuesta a quimiocinas que son producidas en el timo.

Tabla 3. Receptores y quimiocinas involucrados en el desarrollo de los linfocitos [34]

Receptor	QUIMIOCINA
CXCR4	SDF-1 (CXCL12)
CCR4	TARC y MDC CCL17 y CCL22
CCR5	MIP-1 β (CCL4)
CCR7	ELC (CCL19)
CCR8	TARC (CCL17)

Los elementos considerados como estroma son: células dendríticas derivadas de médula ósea, células epiteliales corticales y medulares, macrófagos y células mesenquimales. Se ha determinado que distintas subpoblaciones de timocitos interactúan con elementos del estroma tímico de manera distinta y que dicha interacción participa en el trayecto de estos timocitos por los diferentes estadios de desarrollo. En su trayecto de corteza exterior a corteza interior, existen elementos de regulación que guían a los timocitos e inducen su paso de dobles negativos a dobles positivos y posteriormente a simples positivos. [34]

El receptor de quimiocina CCR9, incrementa su expresión en los timocitos durante la transición de dobles negativos a dobles positivos y las células simples positivas migran en respuesta a su ligando, TECK en adulto. Además se ha sugerido que este receptor pudiera participar en el reclutamiento de precursores tímicos al timo fetal. Debido a esto, se considera que CCR9 puede regular el tráfico de los timocitos en dos diferentes escenarios: durante la migración de precursores hematopoyéticos a timo fetal y después en la inducción de dobles negativos a dobles positivos [34].

1.3.5.4 CCR9 Y EL RECLUTAMIENTO HOMEOSTÁTICO DE LINFOCITOS A INTESTINO DELGADO.

Debido a la expresión selectiva de CCR9 en timo e intestino delgado, se ha investigado el papel que representa el receptor durante el reclutamiento de linfocitos a intestino. Existe una expresión importante de CCR9 en linfocitos T que van a intestino delgado, así como de subpoblaciones de linfocitos T intraepiteliales y linfocitos conformadores de lámina propia. La mayoría de linfocitos T CD4 y CD8 que expresan CCR9 en periferia, son de fenotipo de memoria [35].

1.3.5.5 PAPEL DE CCR9 EN LA INMUNIDAD DE MUCOSA INTESTINAL.

En sangre periférica, se pueden encontrar linfocitos T que expresen CCR9, sin embargo estos linfocitos muestran fenotipo de memoria CD4 y CD8, así como la integrina de mucosa intestinal $\alpha 4\beta 7$. También, la mayoría de linfocitos intraepiteliales y linfocitos residentes de lámina propia expresan CCR9. Comparando estas características a lo que pasa en colon, no se encuentra mRNA aunque un porcentaje bajo de linfocitos si lo expresan. El análisis de subpoblaciones de linfocitos en intestino delgado muestra que aunque la mayoría son CD3+ y casi todos estos expresan marcadores de activación CD45RO, CD69 y CD95. También hay una baja cantidad de linfocitos B y células NK que expresan CCR9 [36], aunque en sangre periférica no hay células que muestren este fenotipo [28]. Tampoco existe un perfil de polarización Th1 o Th2 de estos linfocitos ya que tanto CD3+CCR9+ como CD3+CCR9- producen las mismas cantidades de IFN- γ e IL-4 lo cual indica que el fenotipo CCR9 polariza el perfil de citocinas [36].

1.3.5.6 CCR9 CONTRIBUYE A LA LOCALIZACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN INTESTINO DELGADO

Cuando se encontró que las células secretoras de anticuerpos respondían hacia la quimiotaxis de CCL25, se sugirió que esta quimiocina podría servir para reclutar eficientemente a estas células productoras de IgA en lámina propia.

Existe un reclutamiento selectivo de estas células que no solo es un mecanismo, sino proporciona un paradigma sobre la selectividad de tejido a reclutar estas células cuando son CCR9+.

1.3.5.7 FENOTIPO DEL RATÓN CCR9 -/-

La cepa de ratón resultante que se generó donde se deletó el gen de CCR9 es viable, fértil y sin anomalías morfológicas aparentes.

La evaluación del perfil de quimiocinas no reveló diferencias en la expresión de otros receptores. El ratón deficiente de CCR9 no tiene diferencia en las subpoblaciones de timocitos a pesar de que CCR9 es un receptor que se expresa en el cambio de dobles negativos a dobles positivos. [37] No se observaron diferencias importantes en el número de linfocitos $T\alpha\beta$ en periferia y esos linfocitos son capaces de responder previa activación vía TCR. El porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ en periferia es dos o tres veces mayor en el ratón CCR9 -/- que en el ratón CCR9 +/+. En mucosa intestinal, existe una disminución en 2 veces el número de linfocitos T intraepiteliales del ratón CCR9 -/- y el número de linfocitos $T\gamma\delta$ es 5 veces menor en el genotipo CCR9 -/-. La ausencia de CCR9, limita temporalmente el desarrollo de linfocitos T durante la embriogénesis, sin embargo, no es indispensable para este efecto y las diferencias en celularidad son compensadas en el día 20 de gestación, lo que ocurre de la misma manera para los linfocitos B en médula ósea y esto se manifiesta en la disminución de células pre-proB ante la ausencia del receptor [37].

1.3.6 ESTRATEGIAS DE ANTAGONISMO DE LAS INTERACCIONES QUIMIOCINA-RECEPTOR.

Debido a que un amplio rango de enfermedades se encuentran asociadas con las quimiocinas y sus receptores, la industria farmacéutica se ha enfocado en modular sus efectos con fines terapéuticos. Las interacciones quimiocina-GAGs pueden ser un blanco efectivo en el tratamiento de ciertas enfermedades. La heparina soluble inhibe la actividad de las quimiocinas *in vivo*, por lo que, algunas heparinas sintéticas y específicas para ciertas quimiocinas pueden actuar como tratamientos eficaces. Así mismo, se buscan pequeñas moléculas que actúen como antagonistas de los receptores.[25]

TABLA 4. RECEPTORES DE QUIMIOCINAS Y ENFERMEDADES [17]

Receptor	Ligando	Células	Enfermedad
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14	Linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos	Artritis reumatoide, esclerosis múltiple
CCR2	CCL2, CCL8, CCL7, CCL13, CCL16	Monocitos, Células dendríticas inmaduras, linfocitos T memoria	Aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple
CCR3	CCL11, CCL23, CCL7, CCL5, CCL8, CCL13	Eosinófilos, basófilos, células cebadas, plaquetas	Asma alérgica, rinitis
CCR4	CCL17, CCL22	Linfocitos T, Células dendríticas maduras, basófilos, macrófagos, plaquetas	Infecciones por parásitos, rechazo a transplantes
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL14, CCL16	Linfocitos T, monocitos	Coreceptor HIV, rechazo a transplantes
CCR6	CCL20	Linfocitos T reg y de memoria, linfocitos B, células dendríticas	Inmunidad humoral de mucosas, asma alérgica, homing intestinal de linfocitos T
CCR7	CCL19	Linfocitos T, células dendríticas	Migración a órganos linfoides secundarios
CCR8	CCL1	Linfocitos T, monocitos, células dendríticas	Formación de granuloma
CCR9	CCL25	Linfocitos T, células plasmáticas secretoras IgA, eosinófilos, timocitos	Inflamación crónica intestinal
CCR10	CCL27, CCL28	Linfocitos T	Reclutamiento celular a intestino y piel
CXCR1	CXCL8, CXCL6	Neutrófilos, monocitos	Enfermedad inflamatoria pulmonar, COPD
CXCR2	CXCL8, CXCL6, CXCL5, CXCL2, CXCL3	Neutrófilos, monocitos, células endoteliales	Enfermedad inflamatoria pulmonar, COPD
CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11	Endoteliales, células neoplásicas	Angiostático para crecimiento tumoral
CXCR4	CXCL12	Ampliamente expresado	Co-receptor HIV, metástasis, hematopoiesis

CXCR5	CXCL13	Linfocitos B y T foliculares.	Foliculos linfocitos B
CXCR6	CXCL16	Células T CD8, células NK, Células TCD4 de memoria	Enfermedad inflamatoria hígado, aterosclerosis
CX3CR1	CX3CL1	Macrófagos, músculo liso, endoteliales	Aterosclerosis
XCR1	XCL1	Linfocitos T, NKs	Neuropatía, respuesta tumoral

1. 4 PROCESO ALÉRGICO PULMONAR

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I ocurren cuando un individuo que ha producido anticuerpos IgE en respuesta a un antígeno inocuo, se encuentra con el mismo alérgeno. Este alérgeno desencadena la activación de células cebadas vía receptores para Fc de IgE localizados en su superficie, (10) originando las respuestas características de la alergia que se revisarán a continuación.

1.4.1 ASMA COMO CONSECUENCIA DE ALERGIA PULMONAR. CARACTERÍSTICAS

El asma es un síndrome inmunológico en vías aéreas, provocado por una respuesta Th2 inapropiada, ante una variedad de estímulos específicos y no específicos.

Las principales características son: hipersecreción de moco, inflamación en vías aéreas, remodelación e hiperreactividad bronquial.

1.4.1.1 Hipersecreción de moco. Se conocen dos fenómenos críticos para la hipersecreción de moco, la producción excesiva de moco es una característica importante de los padecimientos pulmonares crónicos. En primer lugar se lleva a cabo la diferenciación de células que se encuentran comúnmente en epitelio a células mucoproductoras, posteriormente se lleva a cabo la degradación del colágeno perteneciente al epitelio, permitiendo que las células epiteliales migren para aumentar el tamaño de glándulas secretoras de moco. Las bases moleculares radican en las mucinas y metaloproteinasas de matriz que se regulan genéticamente en velocidades diferentes de expresión. [38]

1.4.1.2 **Inflamación de vías aéreas.**

- Linfocitos T. Se les atribuye en gran medida las características de la inflamación y orquestan la actividad de otras células secretando citocinas del perfil Th2 como IL-5 e IL-13
- Eosinófilos. Son reclutados al sitio de inflamación y activados por efecto de C5a o fMLP, de citocinas inflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL-3, IL-5 o GM-SCF y quimiocinas como CCL11. Además, estas células expresan receptores de quimiocinas como CXCR2, CCR2, CCR3 y algunos receptores de citocinas como IL-4, IL-9 e IL-13. Como consecuencia de esta activación, los eosinófilos liberan más mediadores y citocinas como: Proteína catiónica de eosinófilos (ECP), proteína básica principal (MBP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y citocinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-12, TNF- α , TGF- β y mediadores lipídicos.[39]
- Mastocitos. Las células cebadas o mastocitos, abandonan la médula ósea como células mononucleares CD34+ y Fc ϵ RI+. Se dirigen a mucosa y submucosa de vías aéreas para continuar su diferenciación. Se conocen 2 subpoblaciones: 1) mastocitos con triptasa y quimasa y 2) mastocitos con solo triptasa que también contienen proteoglicanos. Las células cebadas son capaces de producir IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5.[40]
- Células iNKT. Son una subpoblación de células NKT que poseen características de células NK y de linfocito T, además de que pueden expresar CD4 y/o CD8 o ninguno. Algunas de estas células expresan un repertorio de receptores altamente conservado, V α 14-J α 18 (ratón) y V α 14-J α 18 (humano) y se conocen como NKT invariante (iNKT). Este receptor les permite que reconozcan antígenos glicolipídicos presentados por las moléculas no polimórficas CD1d en las células presentadoras. La activación de este TCR invariante tiene como consecuencia la secreción de citocinas tipo Th1 y Th2. El requerimiento de estas células para el desarrollo de hiperreactividad en modelos experimentales, sugiere que estas células tienen un papel muy importante en asma en humanos.[41, 42]

1.4.1.3 **Remodelación.** Es un mecanismo de reparación inducido por la inflamación crónica. Este mecanismo involucra procesos de engrosamiento de las paredes en vías respiratorias. Además, se ha identificado deposición de fibronectina, colágenas I, III, V y proteoglicanos en submucosa y adventicia, así como un aumento en la cantidad de fibras de músculo liso que contribuyen a dicho engrosamiento. La consecuencia de esta remodelación crónica puede ser fatal, ya que termina en obstrucción de las vías aéreas de manera irreversible. [43, 44]

1.4.1.4 **Hiperreactividad bronquial.** Este fenómeno en vías aéreas se refiere al estado de excesiva susceptibilidad de los bronquios para reaccionar frente a estímulos, esta reacción se manifiesta en una contracción de las fibras de músculo liso, lo cual dificulta el paso del aire. Es por ello, que esta hiperreactividad es un elemento importante de diagnóstico del asma y consiste en la administración de dosis controladas de algún fármaco agonista como metacolina lo que se mide por espirometría del volumen de aire expirado. [39]

1.4.1.5 **Resolución de la inflamación y fibrosis.** En algunos modelos la producción de IL-10 por las células cebadas contribuye a que se pueda reducir la inflamación en los sitios afectados. El reclutamiento celular también tiene como consecuencia, la producción de citocinas y quimiocinas que contrarrestan el efecto proinflamatorio. Algunos de estos productos pueden ser mediadores lipídicos como IL-4 (que también puede tener efecto antiinflamatorio), TGF- β , TGF- α , IL-10 e IL-35. [45-47]

1.4.2 FACTORES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL ASMA ALERGICA

- Predisposición genética: Se han encontrado polimorfismos que originan la atopia en genes que regulan asma. Ejemplos de estos son el control de la respuesta inflamatoria, diferencias en la producción de IgE, citocinas y quimiocinas, así como función y remodelación de vías aéreas.[48, 49]
- Factores ambientales: Exposición a alergenos e infecciones previas. Los alergenos favorecen la producción de IgE. Los linfocitos T CD4 Th2 favorecen el cambio de isotipo de IgM a IgE o pueden causar cambio a IgG2 e IgG4 (humano) o IgG1 e IgG3 (ratón). (10)

1.4.2.1 Alergenos

La alergia pulmonar es causada por una serie de proteínas alergénicas pequeñas que desencadenan la producción de IgE en individuos susceptibles. Un elemento de debate en la definición de alergeno es conocer qué hace a algunas proteínas alergenos y a otras no, algunos principios se ha atribuido a los alergenos. Se conocen dos tipos de alergenos principalmente: las sustancias ambientales no infecciosas que pueden inducir producción de IgE, estas proteínas se encuentran comúnmente en pasto, polen, descamación animal, heces de ácaros, algunos alimentos, látex, algunos fármacos y veneno de insectos. El segundo tipo comprende a las sustancias ambientales no infecciosas que pueden inducir respuesta adaptativa asociada con inflamación local pero independiente de IgE por ejemplo plomo o níquel.[49, 50]

1.4.2.2 VÍNCULO ENTRE INFECCIONES PREVIAS Y ASMA

Se ha relacionado la exposición de patógenos con el desarrollo de la enfermedad. Existe una relación inversa entre la exposición a *M. tuberculosis*, ya que ésta inhibe el desarrollo del asma. [51]

Algunos estudios sugieren que las infecciones comunes con virus patógenos son más frecuentes en la actualidad. Esta exposición incrementa el riesgo de desarrollar el padecimiento durante la infancia [51], aunque se sabe también que las infecciones múltiples globales promueven la maduración del sistema inmune como una protección. [52]

En contraste, la exposición a bacterias y sus productos en mucosas, favorece la protección hacia asma e incluso se ha relacionado con un incremento en la incidencia y la disminución en la colonización por *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*. [53]

1.4.3 INMUNOHISTOPATOLOGÍA DEL ASMA

El tejido pulmonar de pacientes asmáticos se observa con un infiltrado muy característico compuesto por: Eosinófilos, células cebadas activadas y degranuladas, linfocitos T activados y en casos severos: neutrófilos.

Los cambios estructurales demuestran deposición de colágeno (engrosamiento de la membrana basal), oclusión del lumen bronquial por moco, hiperplasia e hipertrofia (engrosamiento de músculo liso), descamación epitelial [54] y angiogénesis en respuesta al incremento de VEGF.

1.4.4 ETAPAS DE LA REACCIÓN ALÉRGICA PULMONAR

Fase aguda: La activación de las células cebadas ocurre a través de FcεRI por la interacción de la IgE unida al alérgeno y la agregación de varios receptores activados en el mastocito. Esto induce la liberación de mediadores preformados y la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico [55] sintetizados en respuesta al factor estimulante de colonias que secretado por las células epiteliales.[39]

Estos mediadores son espasmógenos y vasoactivos, tales como: Histamina, leucotrienos C₄, D₄, E₄, prostaglandina D₂ y enzimas recién sintetizadas (triptasa, quimasa y carboxipeptidasa). Estos mediadores inducen hipersensibilidad inmediata y actividad espasmogénica en músculo liso, causando broncoconstricción, edema, secreción de moco y producción de citocinas y quimiocinas que reclutan a otras células al sitio de inflamación y provocan la remodelación. [39]

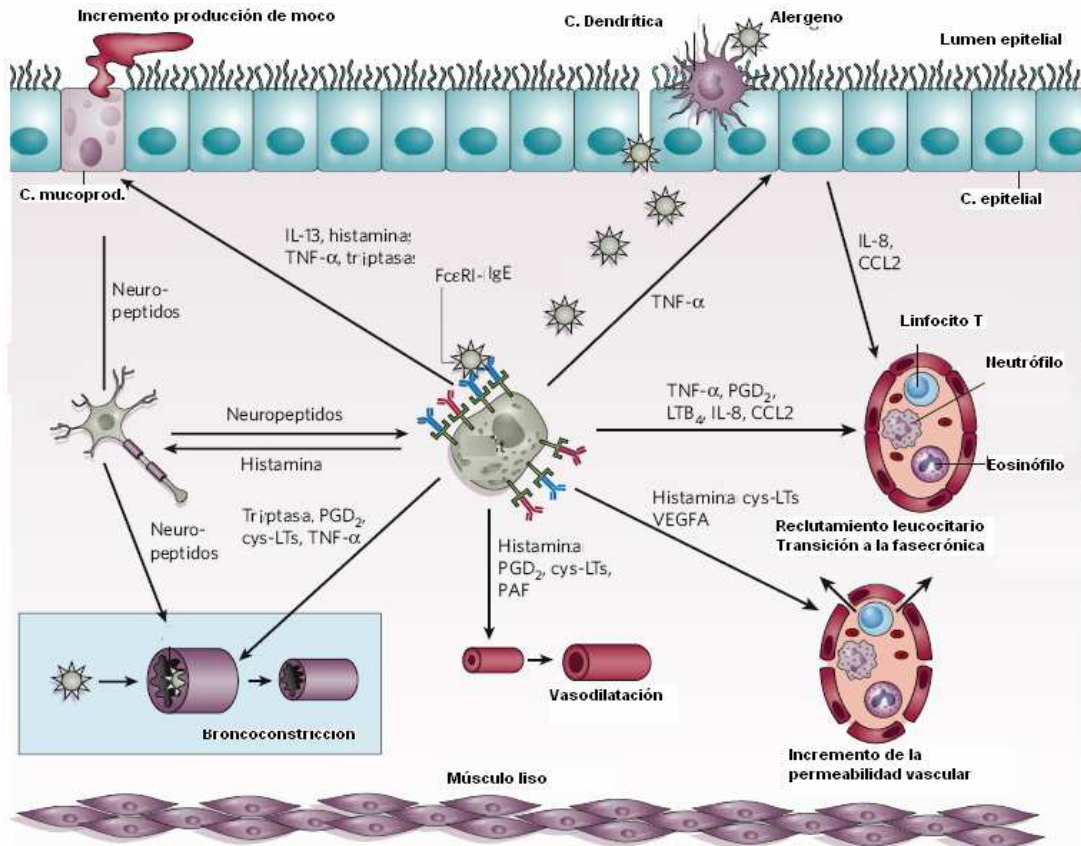


Figura 3. Fase aguda de inflamación alérgica pulmonar. Modificado de Galli, S. 2008 Nature. [50]

Fase tardía o crónica. Es inducida por el infiltrado inflamatorio de células mononucleares y eosinófilos. Aunque tiene muchos aspectos en común con la etapa aguda, en la fase crónica han pasado varias horas después del contacto con el alérgeno y aquí está involucrado el reclutamiento de linfocitos Th2.

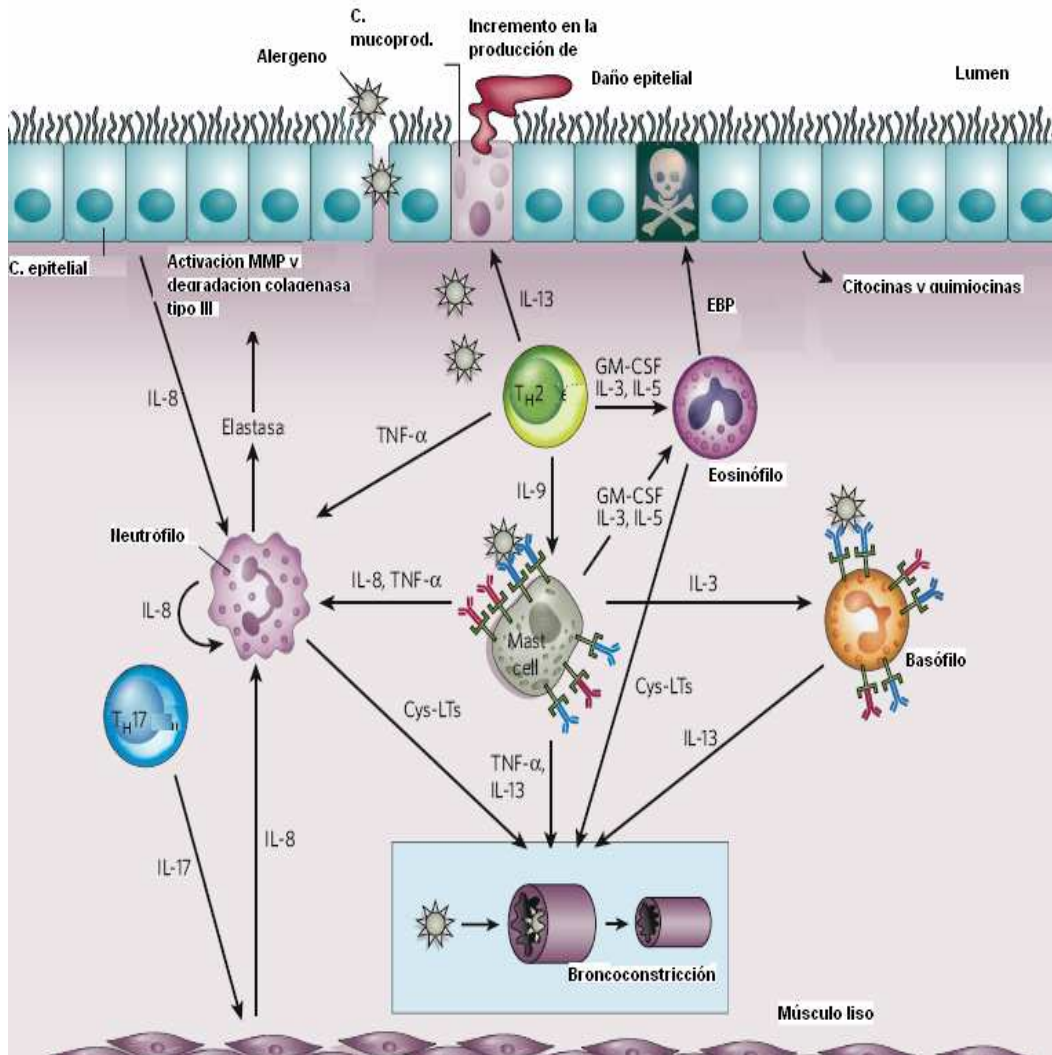


Figura 4. Fase tardía o crónica de la inflamación alérgica en pulmón. Modificado de Galli, S. 2008 Nature. [50]

1.4.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE ALERGIA PULMONAR

Los modelos animales proporcionan una alternativa para investigar los mecanismos de progresión de la enfermedad. Es complicado que un modelo animal único, imite todos los aspectos funcionales y morfológicos, sin embargo, existen diferentes modelos que permiten acercar las características experimentales a las reales en humano.

1.4.5.1 Modelos de reto antigénico agudo.

Se han utilizado para elucidar los mecanismos de la respuesta inflamatoria e inmunológica del asma y para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que controlen el padecimiento. La naturaleza del modelo de inflamación debe ser elegida en base a la cepa de ratón, el alérgeno y el protocolo de sensibilización. La cepa murina más utilizada es BALB/c porque desarrollan una buena respuesta inmunológica Th2, sin embargo se pueden utilizar otras cepas como C57BL/6 y A/J. La ovoalbúmina (OVA) derivada del huevo de gallina se ha utilizado frecuentemente en el laboratorio como alérgeno.

Aunque se utilicen distintos protocolos de inflamación, la sensibilización inicial requiere comúnmente de administraciones sistémicas en presencia de adyuvantes como $Al(OH)_3$ ya que este favorece la respuesta Th2. [56]

1.4.5.2 Modelos de alergia crónicos.

Algunos grupos han buscado los efectos de la exposición crónica en ratón como la remodelación. Esto con el objetivo de reproducir de manera similar lo que ocurre en la clínica. También se busca reproducir la hiperreactividad persistente y probar nuevas terapias que se encuentren en desarrollo. Estos modelos involucran una exposición repetida en las vías respiratorias y con niveles bajos de alérgeno por más de 12 semanas. Se han utilizado diferentes alérgenos como: Extracto de polen de pasto y no siempre se requiere la coadministración con adyuvante ya que se tiene como problema que la administración del alérgeno por periodos largos induce tolerancia. En algunos modelos existe la evidencia de remodelación, hiperplasia e hipertrofia y fibrosis peribronquial.[56, 57]

1.4.6 TRATAMIENTO

1.4.6.1 **Inmunoterapia.** Actualmente existen farmacoterapias disponibles (corticoesteroides, antagonistas de leucotrienos, IgEmab, IL-5mab e IL-4mab) y generan una reducción en el padecimiento, no existe un tratamiento que cure el asma.

En la búsqueda de nuevas terapias, se necesita inducir la tolerancia hacia los alérgenos que no existe de manera natural en los individuos susceptibles. Otra opción, consiste en la inmunoterapia oral o subcutánea del alérgeno. También pueden ser eficientes los prebióticos que activen al sistema inmune de mucosas para reducir la inflamación. [58]

1.4.6.2 **Fármacos.** Se han desarrollado fármacos agonistas β_2 que se administran vía local-inhalada y se encargan de la relajación del músculo liso. Los corticoesteroides (beclometasona, budesonida) son administrados vía inhalación y su mecanismo de acción es antiinflamatorio para varias células. Las metilxantinas (teofilina) administradas oralmente, relajan también el músculo liso y tienen efectos directos en eosinófilos y células T, también incrementan la limpieza mucociliar. El cromolin y nedocromil inhiben la secreción de mediadores inflamatorios. Los leucotrienos modificados funcionan como antagonistas de los receptores de leucotrienos. Los antagonistas muscarínicos bloquean los receptores muscarínicos en vías aéreas y evitan la broncoconstricción. [59]

2. ANTECEDENTES

2.1 SOBREEXPRESIÓN DE CCR9 EN iNKT DE PACIENTES ALÉRGICOS

Las células NKT con fenotipo V α 24-Invariante de pacientes con asma alérgica expresan CCR9 con alta frecuencia. Además de que se observa un infiltrado de iNKT CCR9+ en la mucosa pulmonar, significativamente mayor que en individuos sanos. El ligando CCL25 es capaz de inducir quimiotaxis en las células provenientes de pacientes asmáticos y no en células normales. Esto sugiere que células V α 24-Invariantes anormales induzcan sistémica y localmente un fenotipo Th2 lo cual es crítico para el desarrollo de esta enfermedad.[60]

Aunque se ha determinado que estas células NKT en asma sobreexpresan CCR9, no se ha determinado claramente cuál es el papel de este receptor en el reclutamiento de éstas y poblaciones celulares o incluso si existe un efecto modulador de la respuesta inflamatoria.[37]

2.2 EXPRESIÓN DE CCR9 EN EOSINÓFILOS

Los receptores que utilizan los eosinófilos para llegar al sitio de inflamación es de gran interés porque estas células son reclutadas a sitios específicos de inflamación y el bloqueo de esta entrada y su degranulación pudiera ser útil en el asma. Comparando con los eosinófilos de circulación, los eosinófilos de pulmón incrementan la expresión de CCR4, CCR9 y CXCR3 en su superficie posterior a un estímulo alérgico. [61]

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma alérgico es un padecimiento crónico inflamatorio que se ha convertido en un problema mundial que ha afectado a 300 millones de personas aproximadamente durante la última década [62]. Se estima una prevalencia de la enfermedad en niños y adultos, de un rango de 1 a 18%[62, 63]. Debido a que se han alcanzado proporciones epidémicas, se ha incrementado el interés en el cuidado y tratamiento de esta enfermedad.

Este padecimiento de vías respiratorias involucra una serie de células características: eosinófilos, linfocitos Th2 principalmente y también múltiples mediadores proinflamatorios que resultan en cambios fisiológicos importantes.[64]

Estas células son reclutadas al sitio de inflamación y generan un microambiente muy importante para el desarrollo del proceso alérgico. La importancia de este microambiente, está determinada por la manera en que responden las células ante los estímulos proporcionados por las citocinas, quimiocinas y mediadores químicos a través de sus receptores. Aunque se han caracterizado muy bien una gran variedad de citocinas, quimiocinas y los receptores que modulan el proceso alérgico pulmonar, existen algunas otras que no se han descrito claramente. Tal es el caso del receptor de quimiocinas CCR9, ya que actualmente no está claro el papel regulador de este receptor en el proceso inflamatorio alérgico, por ello ha sido necesario utilizar modelos animales que proporcionen evidencia sobre la participación de CCR9 en la inflamación alérgica pulmonar y sea posible evaluar el papel de esta regulación utilizando un ratón deficiente del receptor.

4. JUSTIFICACIÓN.

Durante el proceso inflamatorio alérgico que se lleva a cabo en las vías aéreas respiratorias, existe un reclutamiento de células inflamatorias como eosinófilos, linfocitos T e iNKTs.

Los eosinófilos son células con características del perfil alérgico que se desarrolla en el asma; se sabe que en humano, estas células expresan el receptor de quimiocinas CCR9, entre otros receptores celulares [61] y es por ello que este receptor podría participar modulando a este tipo celular durante el proceso asmático.

Otra población celular componente del infiltrado pulmonar en condiciones de inflamación son los linfocitos T. Este tipo celular es modulado por CCR9 desde la ontogenia [34] y algunas subpoblaciones dependen de la expresión de este receptor en su reclutamiento homeostático a mucosa intestinal [36], razón por la cual se podría sugerir que el receptor CCR9 tuviera un papel importante en la modulación de procesos inflamatorios en la mucosa pulmonar.

Por otra parte, las células iNKTs son de gran importancia en el desarrollo del proceso alérgico en el pulmón; se ha encontrado un incremento en la expresión de CCR9 por parte de estas células durante el proceso alérgico pulmonar,

A pesar de que todas estas células pudieran expresar diferencialmente al receptor CCR9, no está claro el posible papel regulador en alguna población celular ni en el microambiente necesario para que se lleve a cabo la alergia pulmonar.

Por lo tanto, se plantea buscar evidencias importantes del posible papel modulador de CCR9 en el proceso inflamatorio que se lleva a cabo en la alergia pulmonar semejante al asma en un modelo murino y así mismo, proponer nuevas terapias basadas en la modulación de este receptor.

5.0 HIPÓTESIS

Durante el proceso inflamatorio que se lleva a cabo en la alergia crónica pulmonar, existe un reclutamiento celular característico, la expresión del receptor CCR9 en las células pudiera modular su reclutamiento celular, por lo que la ausencia de este receptor en las células, es decir, en un ratón deficiente de CCR9 (CCR9 -/-), tendrá un efecto en la respuesta inflamatoria, distinto a lo que ocurre cuando las células si expresan el receptor (CCR9 +/+)

6.0 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer el papel del receptor CCR9 como regulador en un proceso inflamatorio alérgico utilizando un modelo murino en genotipo CCR9 (-/-)

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un modelo de inflamación alérgica pulmonar murino en un ratón deficiente de CCR9.
- Determinar la presencia y cuantificar inmunoglobulinas IgE, IgG1, IgG2a OVA-específicas
- Analizar y cuantificar el infiltrado celular en LBA, nódulos linfáticos mediastinales y tejido pulmonar.
- Cuantificar los niveles de citocinas y quimiocinas tipo Th1 y Th2 por RT- PCR en tiempo real
- Analizar las diferentes poblaciones celulares involucradas en el proceso inflamatorio por citometría de flujo.
- Medir la expresión de quimiocinas y sus receptores por RT- PCR tiempo real y correlacionar con la cantidad de citocinas detectadas en periferia.

7. METODOLOGÍA

7.1 OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE COLA DE RATÓN POR EXTRACCIÓN FENOL-CLOROFORMO Y GENOTIPO DE RATON CCR9 (-/-) POR PCR

7.1.1 OBTENCIÓN DE DNA DE RATONES CCR9 (+/+) y CCR9 (-/-)

El DNA se obtuvo a partir de cola de ratón, las cuales fueron tratadas inicialmente con 500 μ L de amortiguador de lisis con proteinasa K (Invitrogen) y se agitó la mezcla. Se digirieron a 55°C en un baño de agua durante 2 horas o toda la noche dependiendo del grosor del tejido. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos para separar huesos y pelo. Al sobrenadante se le agregaron 500 μ L de fenol:cloroformo (1:1) con agitación. Se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 13,000 rpm. Se separó la fase acuosa y se agitó suavemente. Se dejó incubar durante toda la noche a -20°C y después se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm. Se dejó evaporar el etanol y el DNA se resuspendió en 100 μ L de agua estéril. Se disolvió el DNA calentando a 55°C durante 2 horas. Se almacenó a -20°C para su posterior análisis por PCR

7.1.2 ANÁLISIS DEL GENOTIPO DE CCR9 (-/-)

Se utilizó 1 μ L de DNA. Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2.5 μ L de amortiguador de reacción para la Taq Polimerasa sin $MgCl_2$, 0.5 de mezcla de nucleótidos, 1 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ L de primer específico para amplificar sentido, 1 μ L de primer antisentido, 1 μ L de primer central, 0.1 μ L de Taq Polimerasa (Invitrogen) y agua libre de RNAsas y DNAsas para un volumen final de 25 μ L. Las muestras se amplificaron en un termociclador (MyCycler BioRad) a las condiciones especificadas para los oligonucleótidos (ver anexo I). Se corrieron 15 μ L de las muestras con 1 μ L de amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X para comparar el tamaño del producto con el marcado de peso molecular 100 - 2052 pb (Invitrogen).

7.2 MODELO DE ALERGIA PULMONAR

Para generar un modelo de inflamación alérgica pulmonar, se llevó a cabo un protocolo utilizando a la proteína ovoalbúmina como alérgeno. Se utilizaron 4 grupos de ratones hembras C57BL/6 de 8 semanas con genotipo CCR9 (+/+), CCR9 (-/-) para ser tratados con OVA y sus respectivos controles con solución salina (SS). Al día **0** del modelo, a los ratones se les administraron 10µg de OVA por mg de hidróxido de aluminio (Alum) en 100 µL de solución salina como vehículo. Al día **8**, se administraron vía intraperitoneal 10µg de OVA por mg Alum en 100 µL de PBS. A partir del día **15** y hasta el **20**, se retó a los animales mediante nebulización, con una solución de OVA al 1% durante 30 minutos a una velocidad de 6 mL/min. Se retó nuevamente a los animales vía nebulización el día **34** con una solución de OVA al 5% en PBS durante 30 minutos a una velocidad de 6 mL/min.

El día **35** se obtuvieron las muestras: Lavados broncoalveolares (LBA), sueros, tejido pulmonar, timo y ganglios para su posterior análisis.

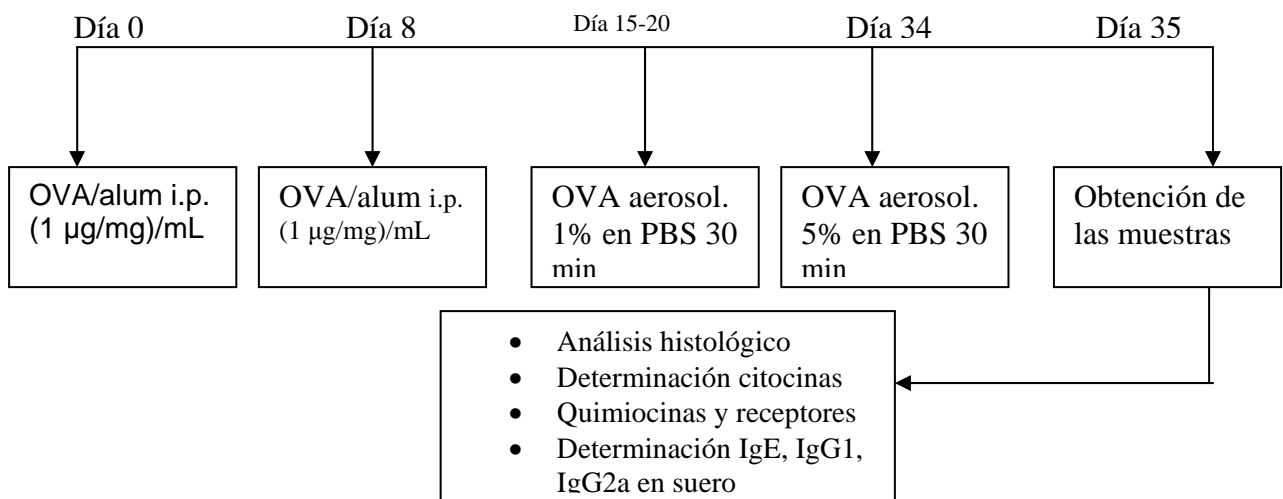


Fig. 4 Descripción del modelo de inflamación alérgica pulmonar utilizado.

7.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA ANALIZAR

Se recolectaron de 500 a 800 μ L de sangre heparinizada y se centrifugaron las muestras a 2500 rpm durante 10 minutos. Una vez separado el suero, se colocó dividido en 2 alícuotas en tubos previamente etiquetados y se congelaron a -70°C para el posterior análisis de IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA por ELISA. Para asegurar que los ratones de genotipo CCR9 (-/-) no expresaran un receptor funcional, se extrajo el timo de los ratones y se mantuvo en RPMI/SFB 2% para realizar un ensayo de quimiotaxis ante el ligando CCL25.

Para obtener los LBA se expuso la traquea vía canulación y se obtuvieron 4 mL de fluido. El primer mililitro se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C , el sobrenadante se dividió en 2 alícuotas en tubos previamente etiquetados y se almacenó a -70°C para el posterior análisis de las citocinas: IL-4, IL-10 y TNF- α por ELISA. El paquete celular se juntó con los 3 mL restantes de lavado para determinar con mayor precisión el número de células totales obtenido de los lavados.

La extracción de los ganglios linfáticos mediastinales se realizó para obtener el número de células totales. El tejido pulmonar se trató con colagenasa 0.05 %, junto con los LBA y ganglios mediastinales se mantuvieron en medio RPMI con SFB 2% a 4°C para posteriormente teñir y evaluar la expresión de receptores por citofluorometría.

Para el obtener el número de células totales, se tomaron 10 μ L de suspensión celular (LBA, ganglio, pulmón, timo) y se colocaron 30 μ L de azul de Tripano. Este colorante distingue a las células viables de las células muertas debido a que las células no viables se tiñen de azul a diferencia de las células viables. Finalmente, se tomaron 10 μ L y se contaron en cámara de Neubauer, donde el número total de células viables se obtiene en base al número de células contadas y en relación a la dilución realizada.

Para realizar el conteo diferencial, se obtuvieron 100 μ L para fijar las células con citocentrífuga (Cytofuge), ajustando la concentración a 200, 000 células en 100 μ L. Los frotis, se tiñeron mediante la técnica de Wright/Giemsa con una solución Diff Quick (Dade Behring) durante 10 minutos.

Para realizar el análisis histoquímico, los tejidos se insuflaron con solución crioprotectora (Tissue-Tek) al 85 % en SSI, se colocaron en moldes y se cubrieron con la solución crioprotectora. Se almacenaron a -70°C para realizar posteriormente los cortes histológicos y teñir con hematoxilina-eosina (HE) y ácido peyódico de Schiff (PAS).

Un lóbulo de cada pulmón, se almacenó a -70°C para posterior extracción de RNA para el análisis de citocinas, quimiocinas y receptores por RT-PCR tiempo real.

7.4 ENSAYO DE QUIMIOTAXIS

Para evaluar la actividad de timocitos procedentes de los ratones utilizados en este modelo, se obtuvieron los timocitos y se preparó una curva con las siguientes concentraciones de quimiocina CCL25: 0, 10, 50 y 100ng/mL en HBSS. Se preparó una membrana de quimiotaxis de 0.5 μm incubándola con fibronectina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2 horas a 37°C previas al ensayo. Posteriormente, se lavaron con PBS antes del ensayo.

Las células se preincubaron con calceína a una dilución 1:1000 durante 20 minutos, al finalizar la incubación, se lavaron con PBS/SFB 2% y se resuspendieron en HBSS.

Se utilizó una cámara de quimiotaxis; colocando en la parte de abajo 30 μ L de cada una de las concentraciones de quimiocina por triplicado y utilizando como blanco HBSS. En la parte de arriba, se colocaron 50 μ L de suspensión de células con 2.5 millones de timocitos por pozo. Se incubó la cámara durante 2 horas a 37°C con 5% de CO_2 .

Al finalizar la incubación, se desarmó la cámara y se lavo cuidadosamente la membrana con PBS 1X. La membrana se dejó secar y posteriormente se midió la fluorescencia en un equipo detector de fluorescencia (Typhoon Scan).

La cantidad de células que migraron hacia la membrana en respuesta a la quimiocina se reporta como intensidad de fluorescencia (IF)

7.5 CONTEO TOTAL Y DIFERENCIAL DE CÉLULAS EN LBA

El conteo total fue realizado en cámara de Neubauer el día de obtención de las muestras. Para realizar el conteo diferencial, se adhirieron las células a las laminillas por citocentrifugación (Cytofuge) colocando 40 μL de suspensión celular, ajustando cada muestra a 200, 000 células con PBS.

Se distinguieron a las células por características morfológicas de Wright/Giemsa con una solución Diff Quick (Dade Behring) durante 10 minutos.

Se distinguieron macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. Se utilizó cada muestra por duplicado, tomando en cuenta 200 células por laminilla. El conteo fue realizado por dos personas de manera independiente.

7.6 ANÁLISIS DE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUJO

Las células obtenidas de LBA, nódulos linfáticos mediastinales y pulmón, se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo cóncavo. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 rpm y se resuspendieron en amortiguador para FACS. Se ajustó en cada pozo el número de células a 1×10^6 y se centrifugaron a velocidad máxima a 4°C en menos de 1 minuto. Se lavaron en 50 μL de amortiguador de FACS y se centrifugaron a velocidad máxima y 4°C . Se resuspendieron en 20 μL de dilución de anticuerpos específicos para las moléculas CD3, CD4, CCR3, CD8, CD19 y CD11b marcados con los fluorocromos: CD3-Cy, CD4-PE, CD8-CY, CD-19-PE, CCR9-FITC, CD11b-CY. El anticuerpo para CCR3, requirió de un anticuerpo secundario anti rata-PE. y se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Se centrifugaron a 4°C y velocidad máxima durante menos de 1 minuto y se lavaron las células con 50 μL de amortiguador de FACS.

Se centrifugaron de la misma manera por última vez y se resuspendieron en 150 μL de PBS 1X con 50 μL de paraformaldehído al 4%.

Posteriormente se pasaron las muestras en un FACS Calibur (BD) y utilizando el software *Cell Quest*. Para adquirir y analizar los datos. Por cada muestra se analizaron

10^4 células y para realizar el análisis se crearon las regiones que contenían a los linfocitos y a la región de granulocitos y monocitos de acuerdo a su tamaño y granularidad. Los porcentajes obtenidos se relacionaron con los números totales y los datos se reportaron como número de células totales.

7.7 EXTRACCIÓN DE RNA

El procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y con material libre de RNAsas. Al tejido pulmonar se agregó 1 mL de reactivo Trizol (Invitrogen) por muestra. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos se maceraron utilizando un homogenizador de tejidos (Brinkmann) y se enjuagó el vástago (7 mm de diámetro) entre cada muestra con PBS + SDS 0.05%. Una vez fragmentado completamente el tejido, se agregaron 200 μ L de cloroformo.

Las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 minutos y se dejaron reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Se obtuvo una solución trifásica, donde la fase inferior contiene a las proteínas y material extracelular, la fase intermedia contiene ADN y la fase superior (acuosa) contiene al RNA, se separó la fase acuosa y se agregaron 500 μ L de alcohol isopropílico; la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó agregando 200 μ L de etanol 75% y centrifugando a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se realizó un segundo lavado y al término, se dejó secar a temperatura ambiente para evaporar el etanol.

Se resuspendió en 40 μ L de H₂O libre de RNAsas y de esta dilución se tomaron 2 μ L para cuantificar en dilución 1:500 y se congeló el resto. Para cuantificar, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Ultraspec Biochrom) a una longitud de onda de 260 nm, y se obtuvo la relación Abs 280/ 260 para verificar la pureza ya que relaciones

cercanas a 2 contienen alto grado de pureza de RNA. La cantidad de RNA se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{RNA } (\mu\text{g} / \mu\text{L}) = \left[\frac{\text{Abs}_{260} * 500 * 40}{1000} \right]$$

Donde 500= Factor de dilución
Abs260= Absorbancia determinada a 260 nm
40= Volumen Final

Posteriormente se corrieron 3 μL de RNA resuspendido en 10 μL de H_2O en un gel de agarosa 2% en TAE 1X. La integridad del RNA se verifica en el gel observando que las 3 bandas de RNA correspondientes a los 3 tipos de RNA se encuentren bien definidas.

7.8 SÍNTESIS DE cDNA.

Para la síntesis de cDNA, se mezclaron los siguientes componentes: 1 μL de cebadores oligo dT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 μg de RNA, 5 μL de la mezcla de dinucleótidos trifosfato dATP, dCTP, dTTP y dGTP (10 mM) y H_2O libre de RNAasas cbp 12 μL y se calentaron a 65°C durante 5 minutos para alinear las cadenas de RNA. Posteriormente, se llevaron rápidamente a hielo. Se agregaron 4 μL de amortiguador para la enzima 5X (Promega) y 2 μL de DTT 0.1 M (Invitrogen). Se mezclaron los componentes y se incubaron 2 minutos a 37°C. Se agregó 1 μL de enzima MMLV- RT (Promega). Se mezcló la reacción y se incubó 60 minutos a 37°C. Al finalizar la incubación, se inactivó la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos. Al terminar la inactivación, se almacenó a -20°C hasta su uso en PCR.

7.9 RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2 μL de cDNA, 2.5 μL de amortiguador de reacción para la Taq Polimerasa sin MgCl_2 , 0.75 μL de MgCl_2 50 mM, 0.5 μL de primer específico para amplificar sentido, 0.5 μL de primer antisentido, 0.1 μL de Taq Polimerasa (Invitrogen) y agua libre de RNAsas y DNAsas hasta un volumen final de 25 μL . Se amplificaron en un termociclador (MyCycler BioRad) a las condiciones especificadas para los cebadores (ver anexo I). Se corrieron 15 μL de las muestras con 1 μL de amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X para comprobar el tamaño del producto con el marcador de peso molecular 100-2072 pb (Invitrogen).

7.10 RT-PCR TIEMPO REAL

Para cuantificar la expresión del RNA mensajero (mRNA), se utilizaron 2 μL de cDNA obtenido por muestra y el reactivo SYBR green [Master Mix] (Invitrogen). Los oligonucleotidos específicos y las condiciones de reacción se mencionan en el Anexo II. Para la reacción, se utilizó el equipo ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) con el software correspondiente para hacer el análisis. Se utilizaron placas con cubiertas ópticas (Applied Biosystems)

Tabla. 3 Especificaciones para PCR tiempo real

Reactivo	Para una reacción de 10 (μL)
SYBR Green	5
Agua libre de endonucleasas	3.6
Oligonucleotidos 10 μM c/u	0.2
cDNA	1

7.11 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS EN LBA POR ELISA

Para determinar la cantidad de IL-4, IL-10 y TNF- α se utilizó el procedimiento y las condiciones sugeridas por el fabricante (Biolegend). Se agregaron 100 μ L de dilución 1:4 de anticuerpo de captura a placas de 96 pozos (NUNC TM immunoplate MaxiSorp Surface) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con solución de lavado (PBS+Tween 20 0.05%) y se bloquearon con solución de ensayo (PBS-SFB 10%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó una curva estándar con citocina murina recombinante y al finalizar la incubación, se realizaron 4 lavados con solución de lavado. Se colocaron 80 μ L de cada muestra con 20 μ L de PBS 1X por triplicado y otro pozo de 100 μ L de PBS como blanco. Las placas se incubaron durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron. Se agregó el anticuerpo de detección anti-citocina acoplado a estreptavidina y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se agregó la enzima peroxidasa acoplada a avidina y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

Se lavaron y adicionaron 100 μ L de sustrato TMB (BD OptEIA) para revelar y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción con 100 μ L de H₂SO₄ 2N. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

7.12 DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS OVA-ESPECÍFICAS EN SUERO POR ELISA

Para cuantificar las inmunoglobulinas IgE, IgG1 e IgG2a, se sensibilizaron las placas de 96 pozos (NUNCTM Immunoplate MaxiSorp Surface) con 100 μ L en cada pozo de una solución de 20 μ g de OVA (USB) disuelta en NaHCO₃ 0.1 M pH 8.3 y se incubaron toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se lavaron 4 veces con 300 μ L de solución de lavado, se bloqueó la unión inespecífica con 200 μ L de solución de ensayo (ver apéndice de soluciones) y se incubaron durante 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente.

Se lavaron las placas y se adicionaron 100 μ L de muestras de suero diluidas 8:10 en solución de trabajo y se dejaron incubando durante 1 hora con agitación durante 1 hora. Se lavaron las placas y se agregó a cada pozo 100 μ L de dilución de anticuerpo de rata anti- IgE de ratón, IgG1 e IgG2a (1:10000) (Zymed) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Al término de la incubación, se lavaron y se adicionaron 100 μ L del anticuerpo biotinilado (1:1000) (ZYMED), Goat (F'ab)₂, anti-rata y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Se lavaron las placas y se adicionó el reactivo avidina-HRP diluido 1:250 en solución de ensayo y se incubaron durante 30 minutos a 37°C.

Por último, se lavaron las placas y se adicionaron 100 μ L de solución TMB sustrato (TMB substrate BD Optics)/ peróxido de hidrógeno (1:1) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se agregaron 50 μ L de H₂SO₄. Finalmente se determinó la absorbancia en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Los datos se reportan como absorbancia determinada a 450 nm, y ésta es proporcional a la cantidad de anticuerpo OVA-específico presente en cada muestra.

7.13 PROCESAMIENTO DE TEJIDO PULMONAR, ANÁLISIS HISTOQUÍMICO Y MORFOMÉTRICO

Para realizar el análisis histológico y morfológico de tejido pulmonar, los pulmones se fijaron con etanol absoluto (grado reactivo Sigma). Posterior a la fijación, los pulmones fueron embebidos en parafina y procesados para el análisis. Las secciones de tejido fueron teñidas con H/E para evidenciar el infiltrado celular. La producción de moco fue revelada por tinción de los cortes con PAS. Se tomaron fotografías de los cortes de

pulmón con el objetivo 40X. Se realizaron medidas de 2 animales por cada grupo (3 campos por cada individuo) utilizando el software Motic Image Plus 2.0 (Motic Instruments Inc., British Columbia, CA, USA).

Se identificaron bronquios y bronquiolos de acuerdo a su estructura, de cada bronquiolo, se midió la longitud en μm^2 desde la lámina basal hasta la capa externa de músculo, mientras que para los vasos, se midió el espacio entre la adventicia y el tejido conectivo

7.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias significativas fueron determinadas mediante el análisis estadístico *t student* para datos desapareados a dos colas. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron como significativos.

8. RESULTADOS.

8.1 Análisis del genotipo de los ratones CCR9 (+/+) y (-/-) por PCR. Se determinó el genotipo de los ratones homocigotos y heterocigotos por PCR semicuantitativa para comprobar que los ratones CCR9(-/-) no expresaran ningún alelo para el gen de CCR9.

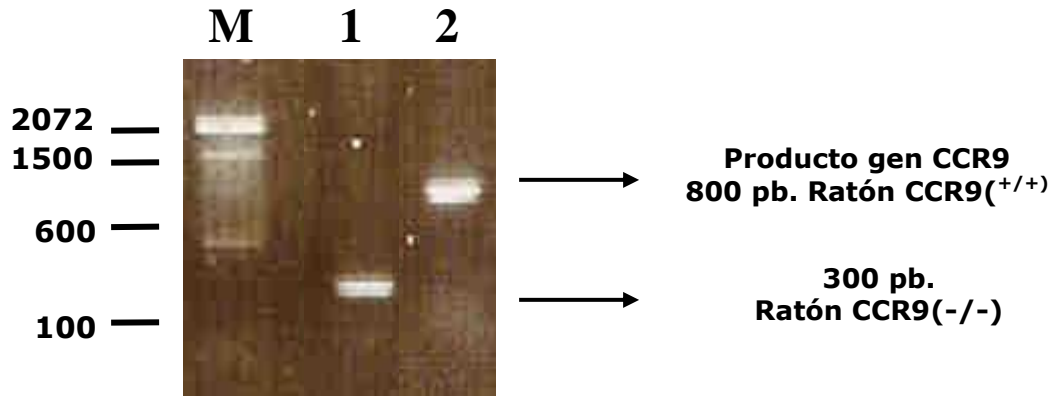


Fig. 6 Determinación de genotipo de los ratones CCR9 -/- usados en este estudio. Se realizó el tipaje de ratones CCR9 (-/-) por PCR. (M) = Marcador de peso molecular. (1) = CCR9^{-/-} (2) = CCR9^{+/+} Secuencia de los oligonucleótidos y condiciones de amplificación, ver apéndice I.

8.2 Análisis de la actividad quimiotáctica de CCR9 mediante su ligando por quimiotaxis. Se verificó que la ausencia del receptor impidiera la migración de los timocitos procedentes de los ratones CCR9 (-/-) frente a su ligando, la quimiocina CCL25

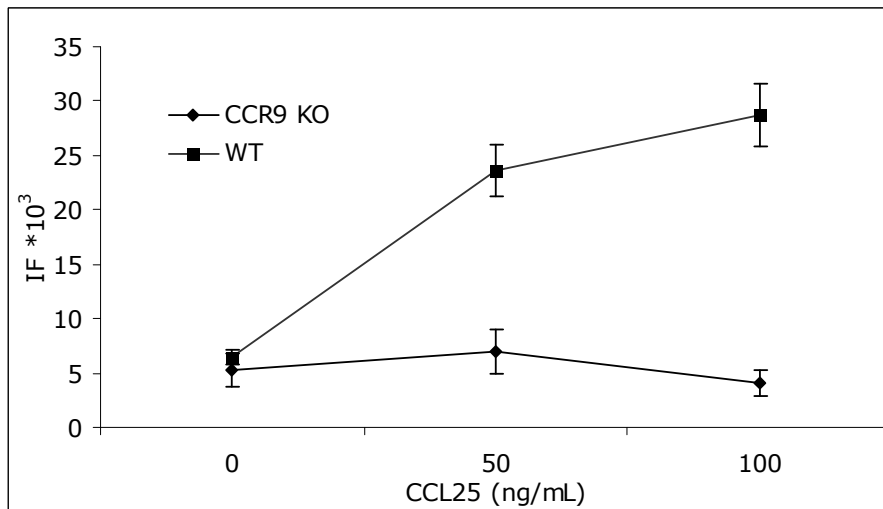


Fig. 7 Determinación de fenotipo de timocitos de los ratones CCR9 (-/-) utilizados en este estudio. Se utilizaron las concentraciones de CCL25 0, 50 y 100 ng/mL. Gráfica promedio de 3 animales por grupo.

8.3 Análisis del proceso inflamatorio alérgico. Se cuantificaron los niveles de inmunoglobulinas OVA-específicas. Para determinar si el modelo de inflamación alérgica genero una respuesta específica, se determinaron los niveles relativos de IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA por ELISA. La ausencia de la expresión de CCR9 no afecta la cantidad de inmunoglobulinas presentes en suero.

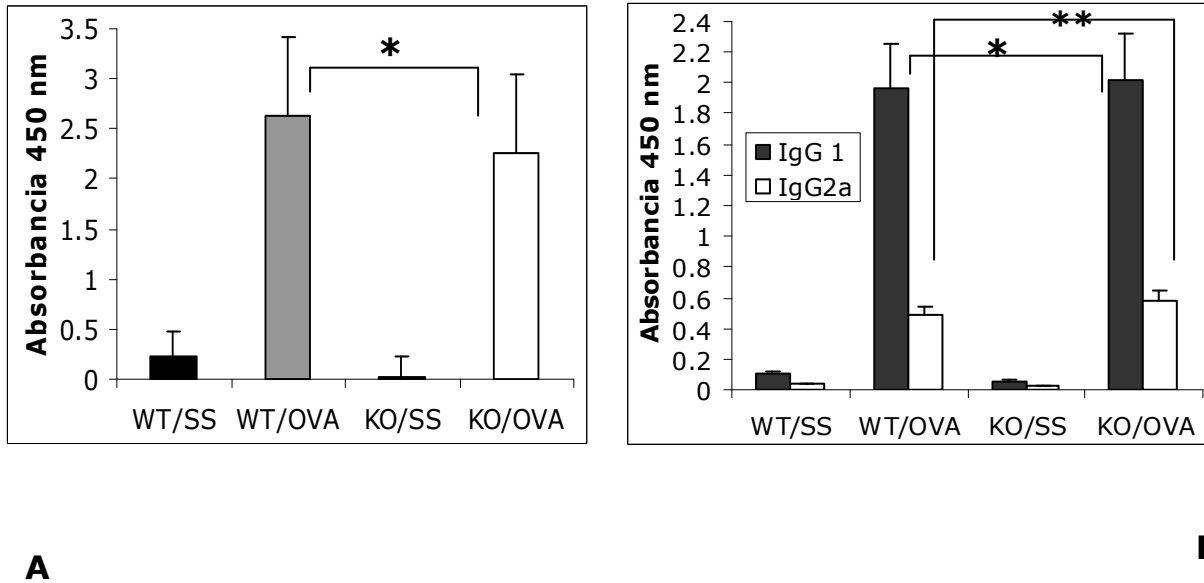


Fig. 8 Análisis de inmunoglobulinas específicas anti-OVA en suero por ELISA A) IgE específica en suero de animales alérgicos. (* P>0.05). B) IgG1 IgG2a en suero anti-OVA. (* P> 0.05, ** P> 0.05) n=4 WT= Silvestre ó CCR9 (+/+) KO = Deficiente ó CCR9(-/-) SS = Solución salina OVA = alergenizados con ovoalbúmina

8.4 Se determinó el número de células totales para cada grupo. A pesar de que hay una disminución del número de células totales presentes en LBA, esta diferencia no es significativa. * (P > 0.05)

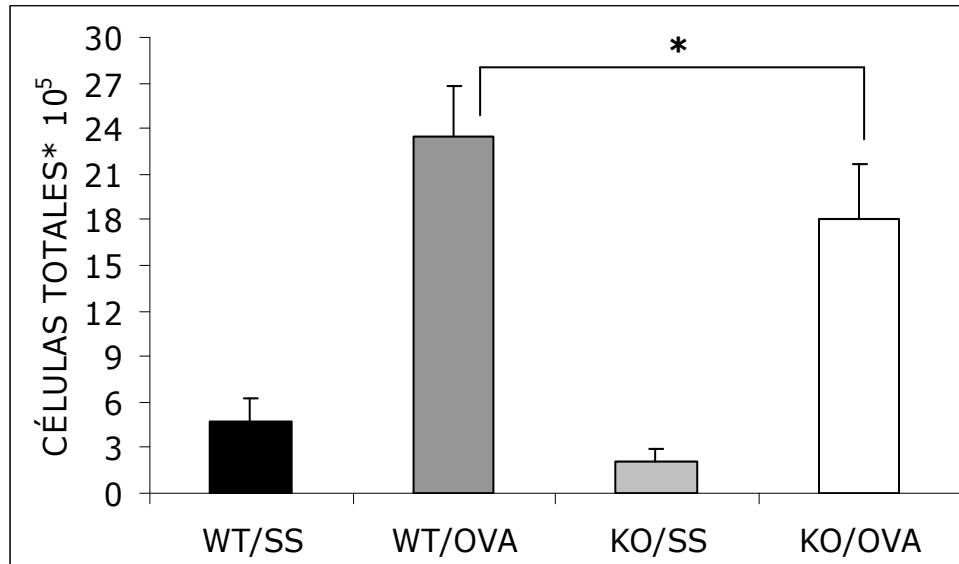


Fig. 9.1 Análisis del número de células en el LBA de los ratones tratados. Los ratones fueron sometidos a la inflamación alérgica. Diferencia no significativa estadísticamente. (* $P > 0.05$ $n=4$). Gráfica promedio de 2 experimentos independientes. $n= 4$

8.4.1 Análisis diferencial de las células obtenidas de LBA en ratones CCR9 (-/-) y CCR9 (+/+). Posterior a la determinación de células totales, se distinguieron morfológicamente a los siguientes grupos celulares: linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Aunque para todos los grupos celulares existe cierta disminución en ausencia de CCR9, solamente es significativa en el número de eosinófilos. (* $P < 0.05$)

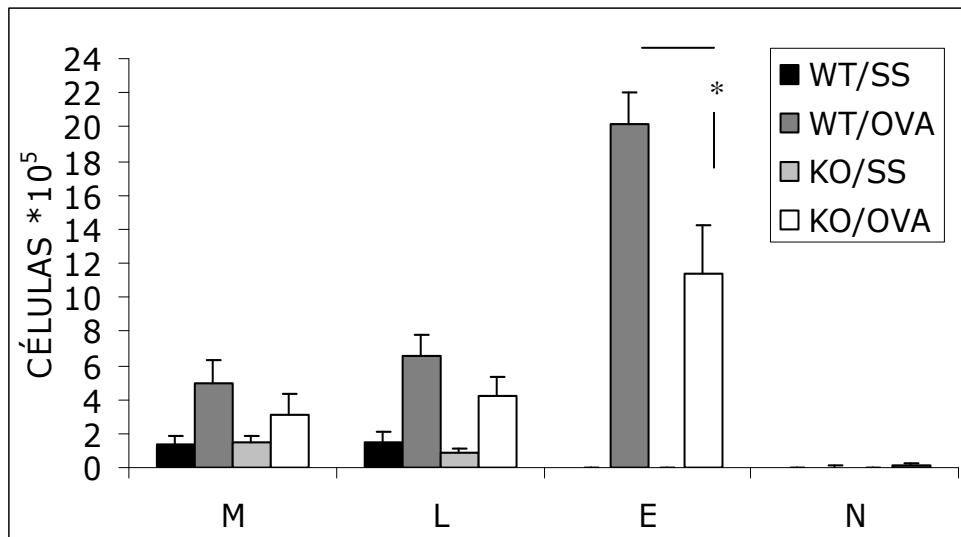


Fig. 9.2 **Conteo diferencial de células en LBA.** Se analizaron los tipos celulares: macrófagos (M), linfocitos (L), eosinófilos (E) y neutrófilos (N) de acuerdo a sus características morfológicas por duplicado en un aumento de 400x. Gráfica promedio de 2 experimentos independientes. n=4 Realizado por 2 observadores de manera independiente. Diferencia estadísticamente significativa (* P< 0.05)

8.4.2 Expresión de marcadores celulares en las células de LBA. Después de caracterizar morfológicamente algunos tipos celulares, por citometría de flujo se evaluó la expresión de los marcadores celulares: CD3+ como marcador de linfocitos T, CD4+ y CD8+ para distinguir las subpoblaciones de linfocitos T, CCR3 como marcador de activación de células en respuestas alérgicas, CD19 como marcador de linfocitos B y CD11b como marcador de macrófagos.

Las regiones analizadas que se muestran a continuación (Fig. 8.4 a y b), fueron seleccionadas de acuerdo a su tamaño y granularidad para linfocitos y granulocitos respectivamente.

Se encontró una disminución no significativa (*P> 0.05) de linfocitos T totales (CD3+) y a su vez, de linfocitos T CD4+. y CD8+ (*P > 0.05 ** P> 0.05).

No hay diferencia significativa del número de linfocitos B (CD19+). El número de células que expresan el receptor de quimiocinas CCR3, no se ve modificado de manera significativa con respecto a las células procedentes de los ratones CCR9 (+/+); también se analizó el número de macrófagos que expresaran CD11b y no hay diferencia significativa en la expresión de este marcador comparando ratones CCR9(+/-) vs CCR9 (-/-).

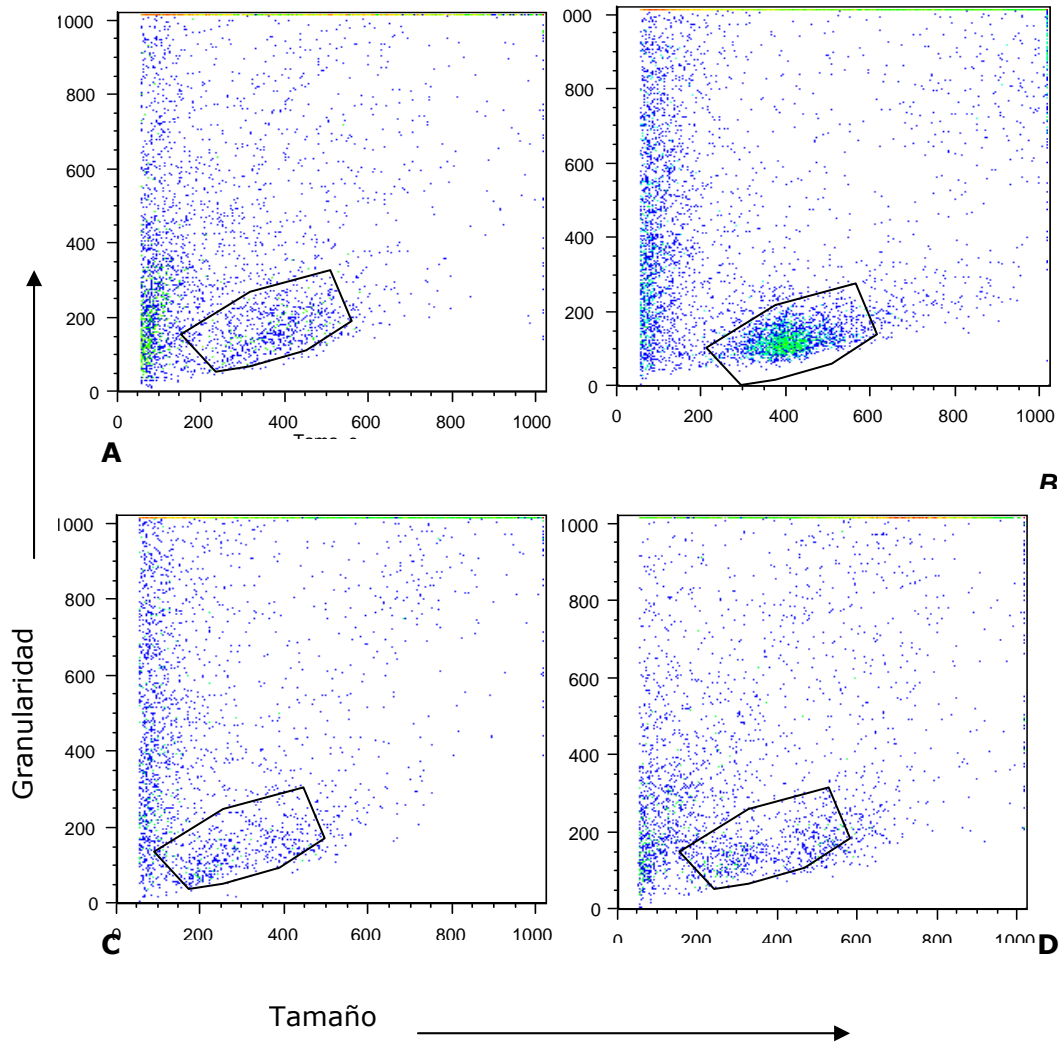
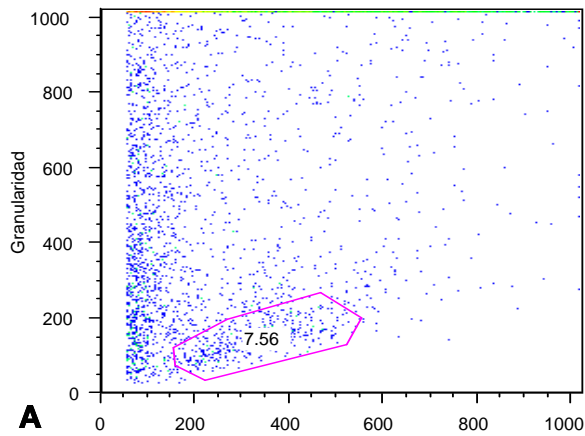
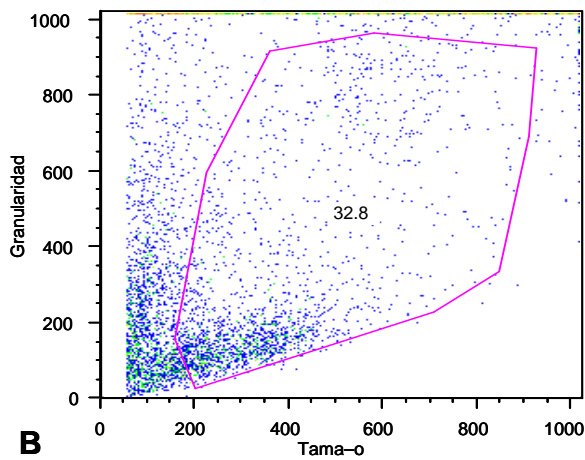


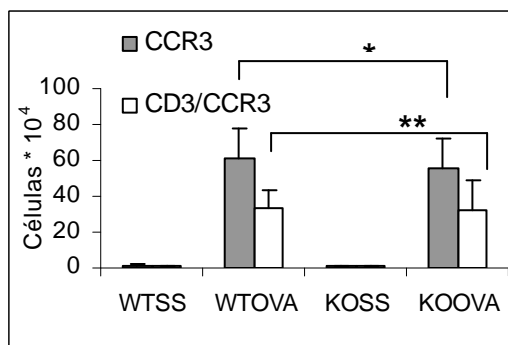
Fig. 9.3 Poblaciones totales de células en LBA. Se analizaron 5000 células por muestra. Gráfico representativo de cada grupo. A) CCR9 +/+ Solución salina B) CCR9 +/+ OVA C) CCR9 -/- solución salina D) CCR9 (-/-) OVA



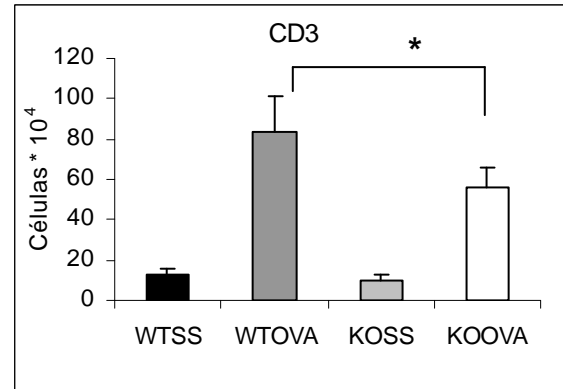
A



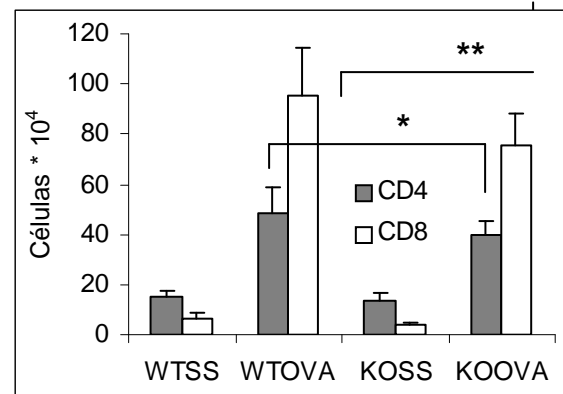
B



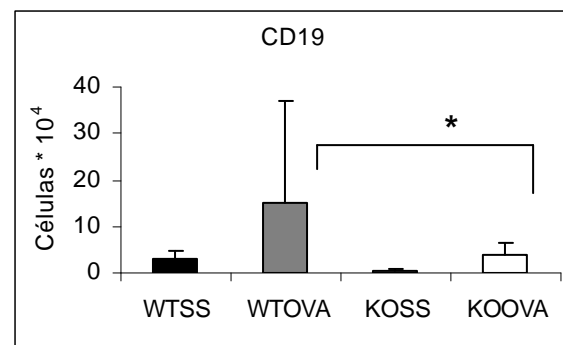
E



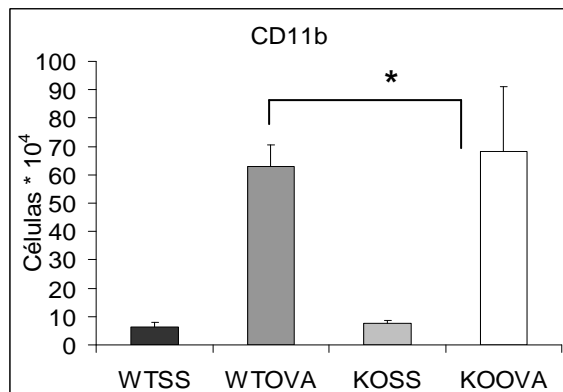
C



D



F



G

Fig. 9.4 Análisis de la expresión de marcadores por citometría de flujo. A) Región de análisis de linfocitos **B)** Región de análisis de granulocitos y macrófagos **C)** Expresión de CD3 (* P 0.05) **D)** Expresión de CD4, CD8 (*P y ** P > 0.05) **E)** Expresión de CCR3 y coexpresión de CD3/CCR3 (* y ** P > 0.05) **F)** Expresión de CD19 (* P > 0.05) **G)** Expresión de CD11b (* P > 0.05) graficas representativas de 1 experimento. n=3

8.5 Análisis del número de células totales en tejido pulmonar. Se analizó el número de células presentes en tejido pulmonar completo tratado con colagenasa mediante la técnica de citometría de flujo. Los resultados muestran que no hay diferencia en el infiltrado inflamatorio total reclutado a vías aéreas en condiciones de alergia en ausencia de CCR9 (* P 0.05).

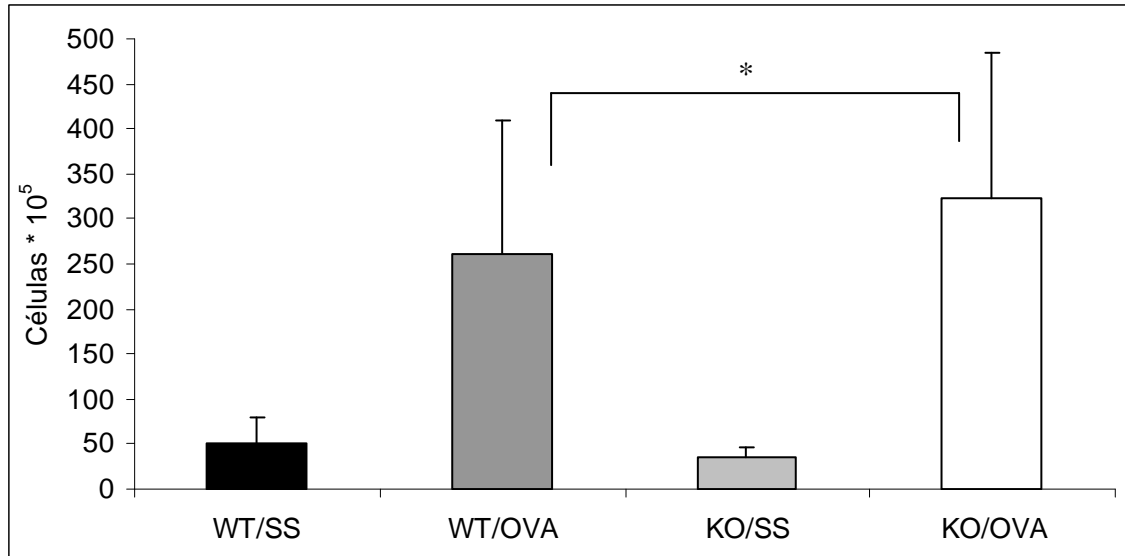


Fig. 10.1 Determinación del número total de células de pulmón. Células totales de pulmón obtenidas por tratamiento con colagenasa. La gráfica corresponde a un experimento representativo. (* P > 0.05 n=4)

8.5.1 Expresión de marcadores celulares en las células obtenidas de tejido pulmonar. Después de caracterizar morfológicamente algunos tipos celulares por citometría de flujo, se evaluó en pulmón, la expresión de los marcadores celulares: CD3+ como marcador de linfocitos T, CD4+ y CD8+ , CD19 como marcador de linfocitos B , CD11b como marcador de macrófagos y CCR3

Las regiones analizadas que se muestran a continuación (Fig. 10.3 a y b), fueron seleccionadas de acuerdo a su tamaño y granularidad para linfocitos y granulocitos-macrófagos respectivamente.

Se encontró una disminución no significativa ($*P > 0.05$) de linfocitos T totales (CD3+) y a su vez, de linfocitos T CD4+ y CD8+ ($**P > 0.05$ $*** P > 0.05$). No hay diferencia significativa del número de linfocitos B (CD19+). El número de células que expresan el receptor de quimiocinas CCR3, no se ve modificado de manera significativa con respecto a las células procedentes de los ratones (CCR9 +/+). Además se analizó el número de macrófagos que expresen CD11b y no hay diferencia significativa en la expresión de este marcador comparando ratones CCR9+/+ vs CCR9 -/-.

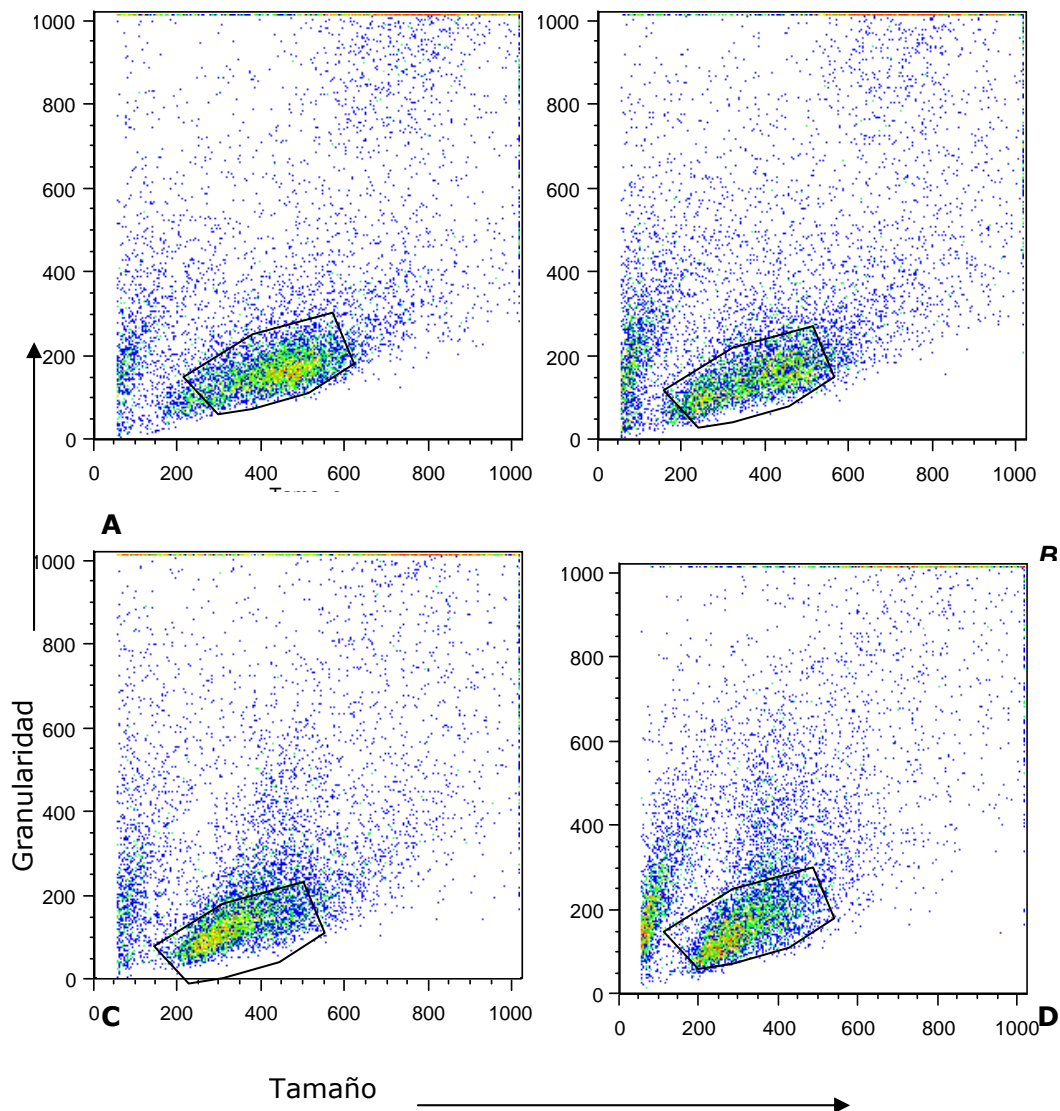


Fig. 10.2 Poblaciones totales de células de tejido pulmonar. Se analizaron 10000 células por muestra. Gráfico representativo de cada grupo. A) CCR9 +/+ Solución salina B) CCR9 +/+ OVA C) CCR9-/- solución salina D) CCR9 -/- OVA

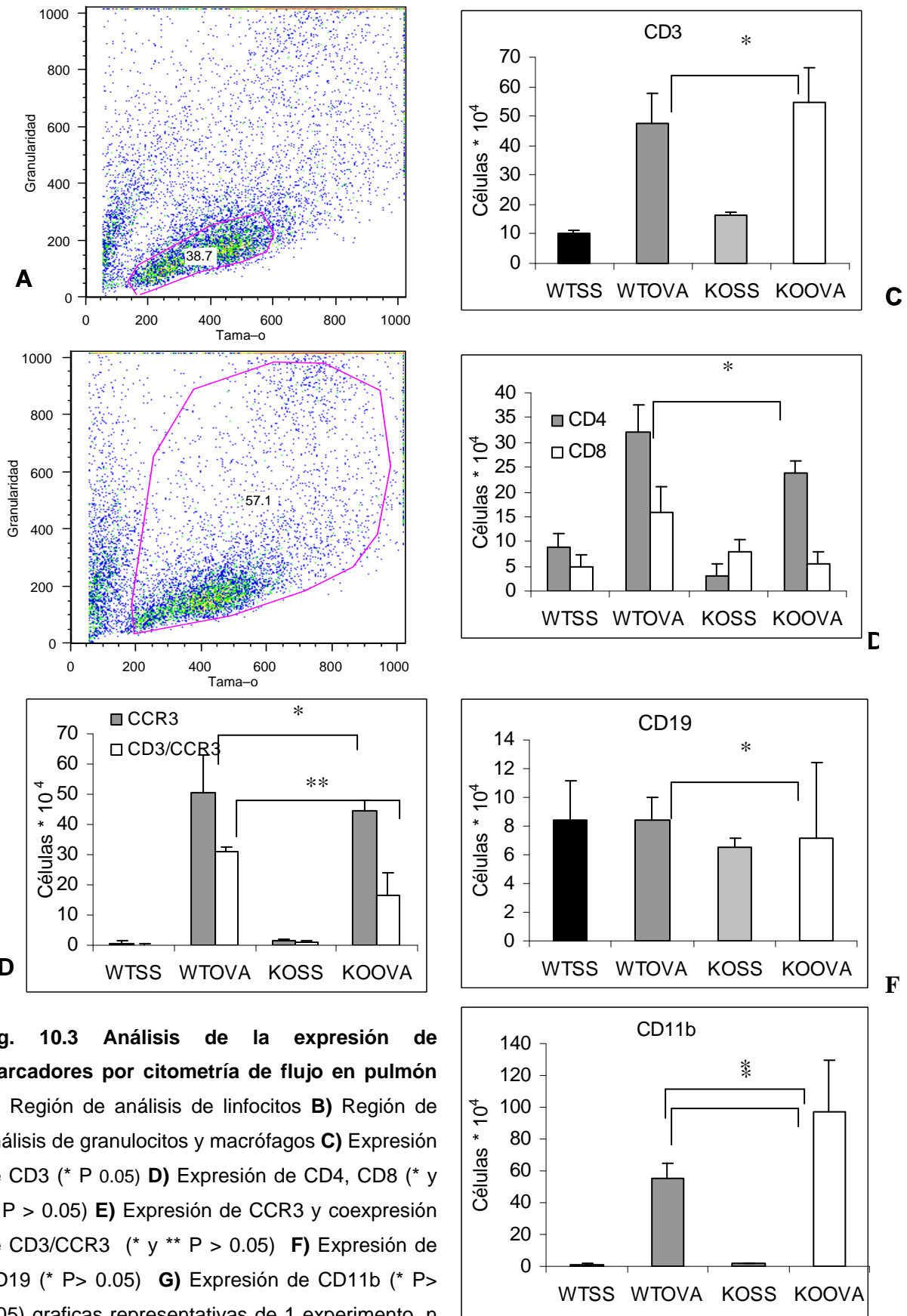


Fig. 10.3 Análisis de la expresión de marcadores por citometría de flujo en pulmón
A) Región de análisis de linfocitos **B)** Región de análisis de granulocitos y macrófagos **C)** Expresión de CD3 (* P < 0.05) **D)** Expresión de CD4, CD8 (* y ** P > 0.05) **E)** Expresión de CCR3 y coexpresión de CD3/CCR3 (* y ** P > 0.05) **F)** Expresión de CD19 (* P > 0.05) **G)** Expresión de CD11b (* P > 0.05) graficas representativas de 1 experimento. n

8.6 Análisis de células totales en ganglios linfáticos mediastinales. Se determinó el número de células a nivel de nódulos linfáticos mediastinales. Se observó una disminución en el número total de células en los ratones CCR9 (-/-) comparados con los ratones CCR9 (+/+)..

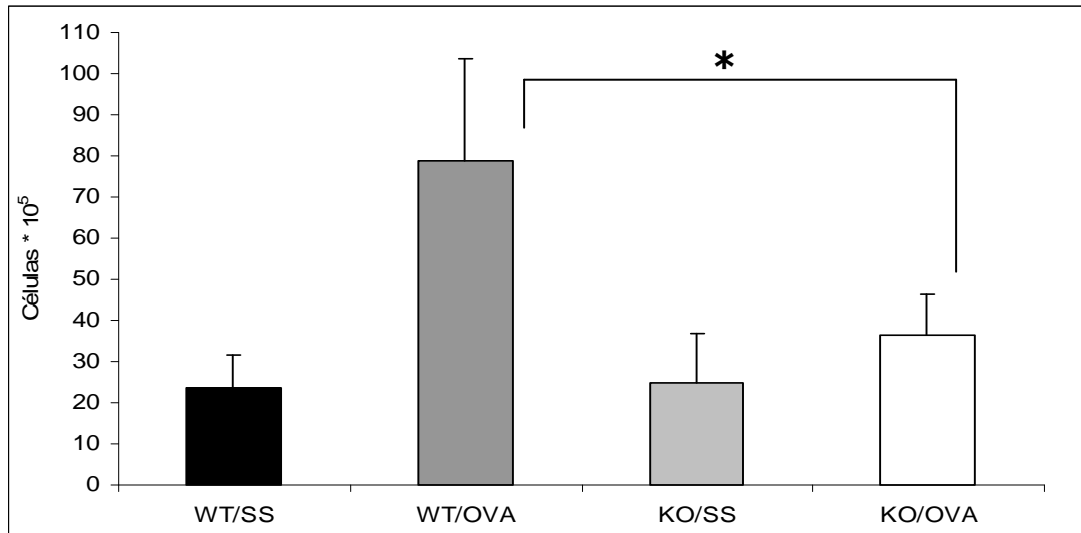


Fig. 11.1 Número total de células en nódulos linfáticos mediastinales. La gráfica corresponde a un experimento representativo. * $P < 0.05$. $n=3$ La ausencia de CCR9, influye en el número de células localizadas en los nódulos linfáticos regionales.

8.6.1 Expresión de marcadores celulares en los ganglios mediastinales. Se evaluó en nódulos linfáticos mediastinales, la expresión de los marcadores celulares: CD3+ como marcador de linfocitos T, CD4+ y CD8+, CCR3, CD19 y CD11b.

Las regiones analizadas que se muestran a continuación (Fig. 10.3 a y b), fueron seleccionadas de acuerdo a su tamaño y granularidad para linfocitos y granulocitos-macrófagos respectivamente. Se encontró una disminución significativa (* $P < 0.05$) de linfocitos T totales (CD3+) y a su vez, de linfocitos T CD4+. y CD8+ (** $P < 0.05$ *** $P < 0.05$). También se observó una disminución significativa del número de linfocitos B (CD19+) comparando CCR9 -/- vs CCR9 +/+ (* $P < 0.05$).

El número de células que expresan el receptor de quimiocinas CCR3, no se ve modificado de manera significativa con respecto a las células procedentes de los ratones (CCR9 +/+); también se analizó el número de macrófagos que expresen CD11b (*P < 0.05) y existe también una disminución significativa de células CD11b+ comparando ratones CCR9+/+ vs CCR9 -/-.

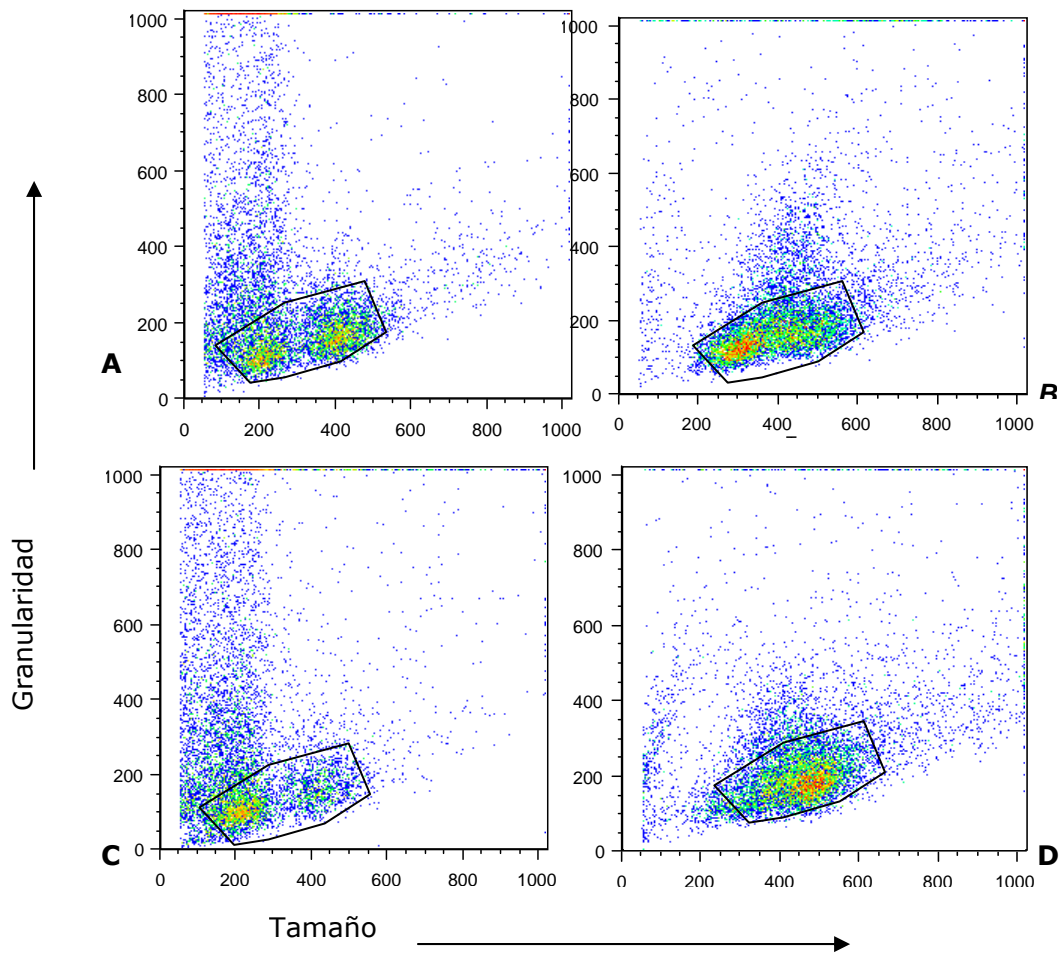


Fig. 11.2 Poblaciones totales de células de ganglios linfáticos. Se analizaron 10000 células por muestra. Gráfico representativo de cada grupo. A) CCR9 +/+ Solución salina B) CCR9 +/+ OVA C) CCR9-/- solución salina D) CCR9 -/- OVA

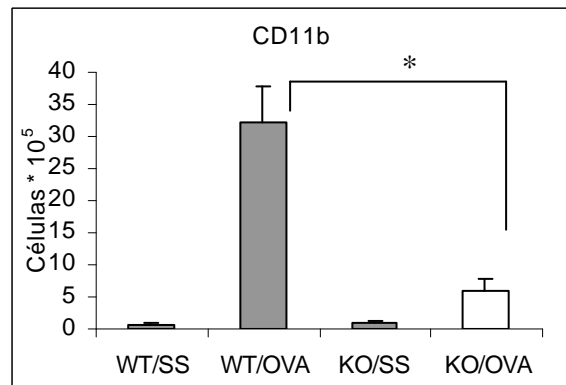
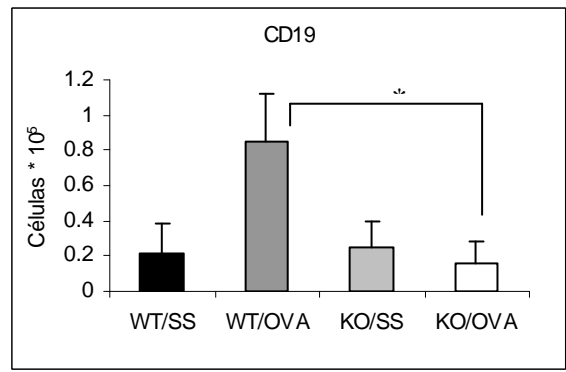
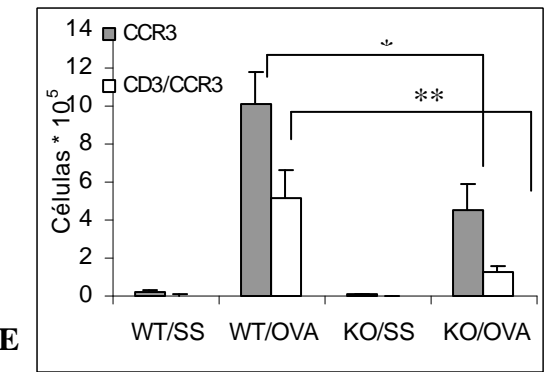
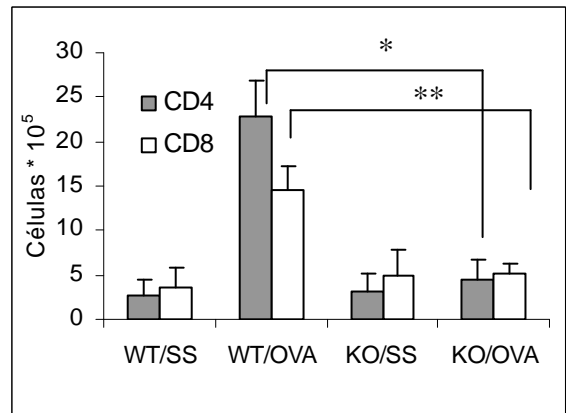
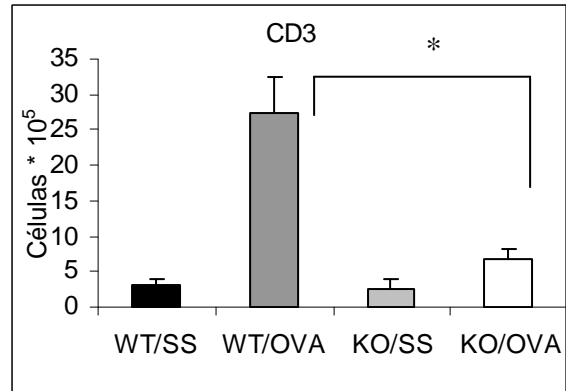
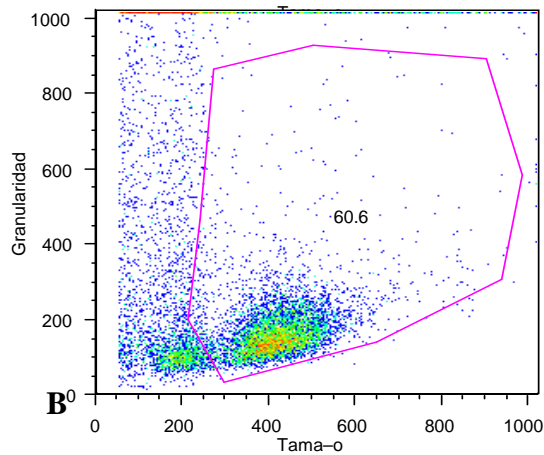
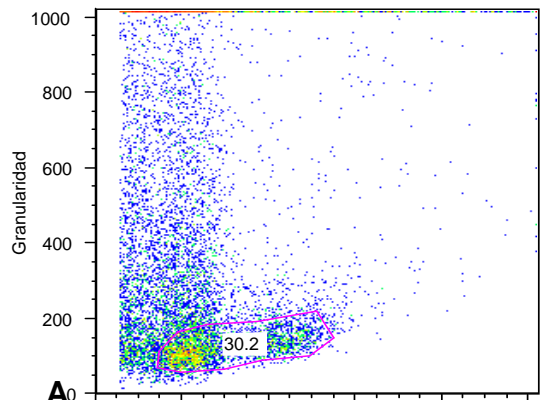


Fig. 11.3 Análisis de la expresión de marcadores por citometría de flujo en ganglios mediastinales A) Región de análisis de linfocitos B) Región de análisis de macrófagos C) Expresión de CD3 (* P<0.05) D) Expresión de CD4, CD8 (* y ** P < 0.05) E) Expresión de CCR3 y coexpresión de CD3/CCR3 (* y ** P < 0.05) F) Expresión de CD19 (* P< 0.05) G) Expresión de CD11b (* P< 0.05) graficas representativas de 1 experimento. n = 4

8.7 Análisis de la expresión de citocina en LBA por ELISA. Se analizó la expresión de IL-4 en LBA como citocina característica de respuesta Th2, la IL-10 como citocina involucrada en regulación y TNF- α como citocina pro inflamatoria y de respuesta efectora Th1 por medio de ELISA. El análisis cuantitativo muestra que no hay efecto sobre la expresión de IL-4, aunque IL-10 si disminuye considerablemente, mientras que TNF- α no es modificado de manera significativa cuando no se expresa CCR9.

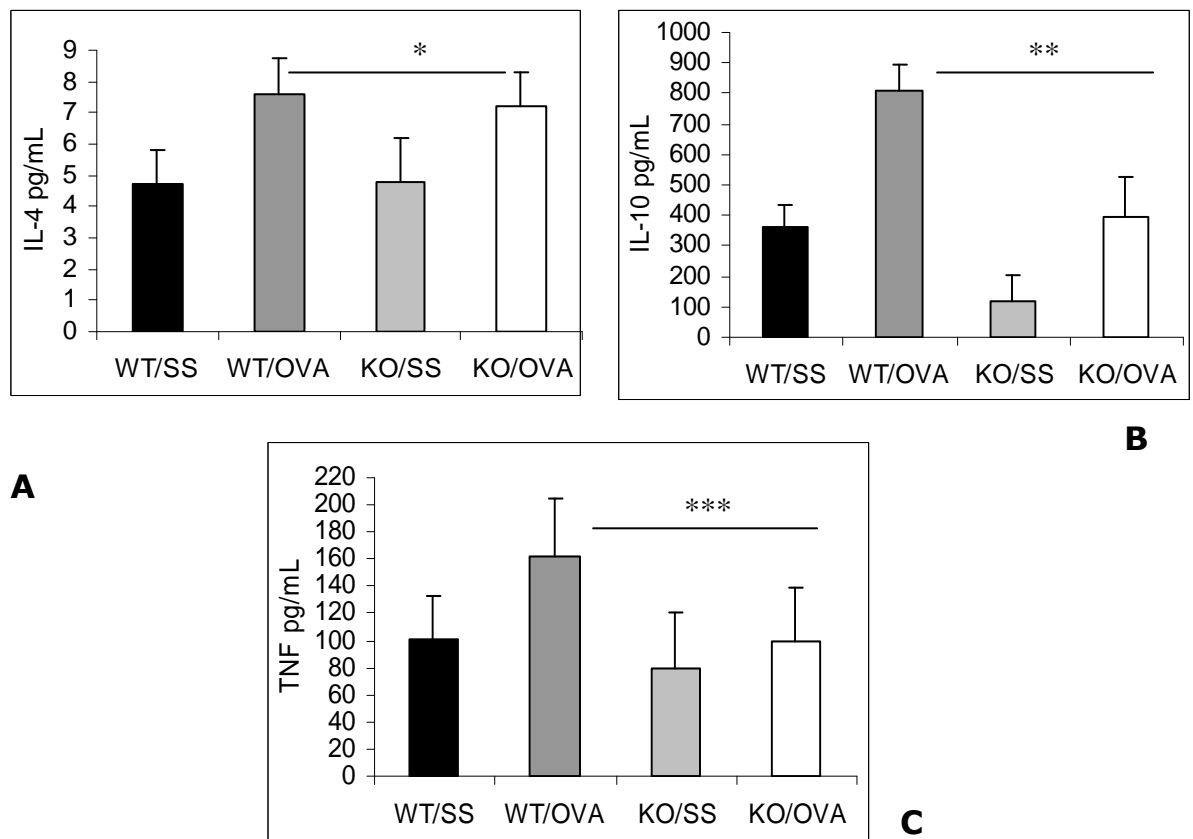


Fig. 12 Determinación de citocinas en LBA por ELISA. Gráficas representativas de dos experimentos independientes **A)** Determinación de IL-4. (* $P > 0.05$) **B)** Determinación de IL-10 (** $P < 0.05$) **C)** Determinación de TNF- α . (** $P > 0.05$) gráficas promedio de 2 experimentos independientes $n=4$

8.8 Análisis de la expresión de mRNA de citocinas Th1, Th2 y marcador intracelular Foxp3. Se evaluó la presencia de mRNA en tejido de IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ . Así mismo se analizó la expresión de RNA mensajero del factor intracelular FoxP3 como marcador de células T reguladoras.

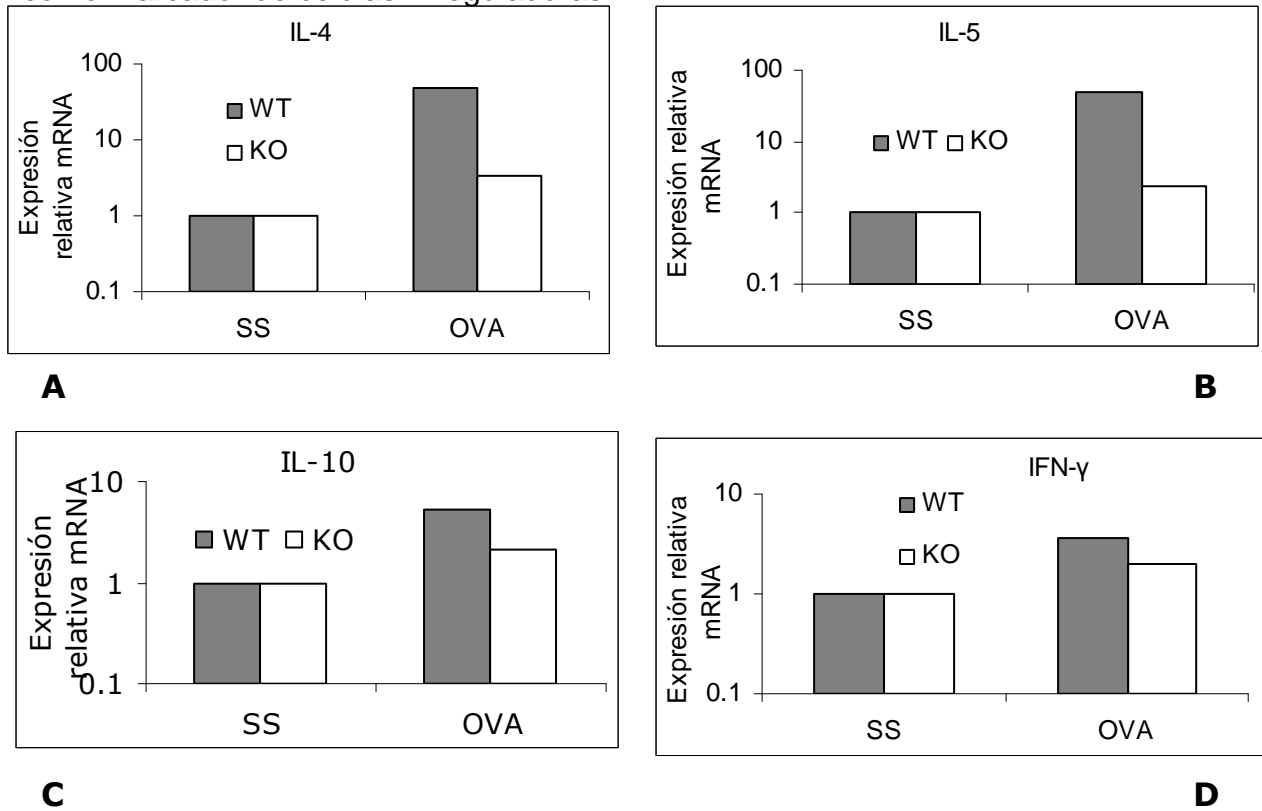


Fig. 13 Expresión relativa de citocinas en RNA extraído de pulmón por RT-PCR en tiempo real. Gráficas representativas de dos experimentos independientes. A) IL-4 B) IL-5 C) IL-10 D) IFN- γ Expresión relativa al valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ obtenido en cada muestra.

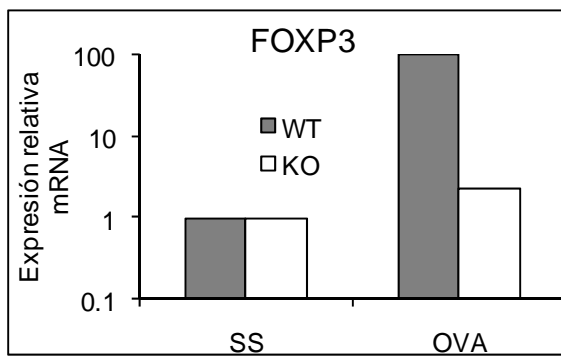


Fig. 14 Expresión relativa de mRNA del marcador intracelular FoxP3. Gráfica representativa de 2 experimentos independientes.

8.9 Determinación del perfil de quimiocinas en tejido pulmonar por RT-PCR en tiempo real. La ausencia de CCR9 tiene efecto sobre la expresión de las quimiocinas CCL2, CCL5, CCL11 y CC12. Los resultados muestran que la expresión de los genes de quimiocinas se modifica en el ratón deficiente de CCR9. Las quimiocinas CCL2 y CCL11 disminuyen su expresión en condiciones de inflamación, mientras que CCL5 y CCL12 incrementan su expresión en el ratón deficiente de CCR9.

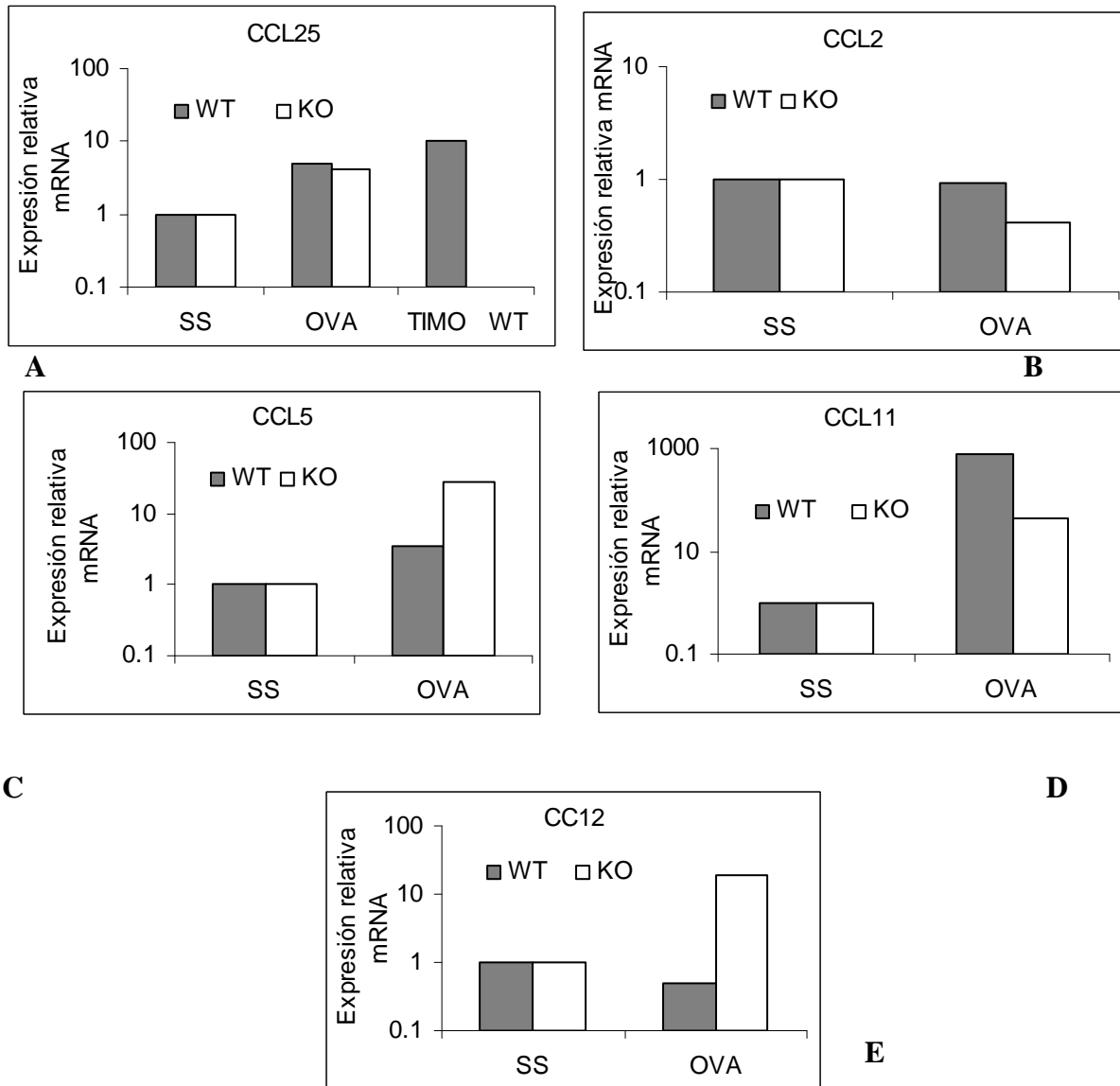


Fig. 15 Expresión relativa de quimiocinas en RNA extraído de pulmón por RT-PCR en tiempo real. Gráficas representativas de dos experimentos independientes. Expresión relativa al valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ obtenido en cada muestra **A)** Se incluye a la expresión de CCL25 en timo como control **B)** CCL2 **C)** CCL5 **D)** CCL11 **E)** CCL12.

8.10 Análisis de la expresión de receptores de quimiocinas en ausencia de CCR9 en ratones alérgicos. En ratones CCR9 (+/+), la expresión de CCR9 aumenta lo que demuestra su probable papel en la inflamación alérgica. Se uso como control mRNA de timo. Mientras que CCR3 y CCR5 se encontraban disminuidos. La expresión de CCR4 aumenta lo que indicaría una posible compensación por la falta de CCR9.

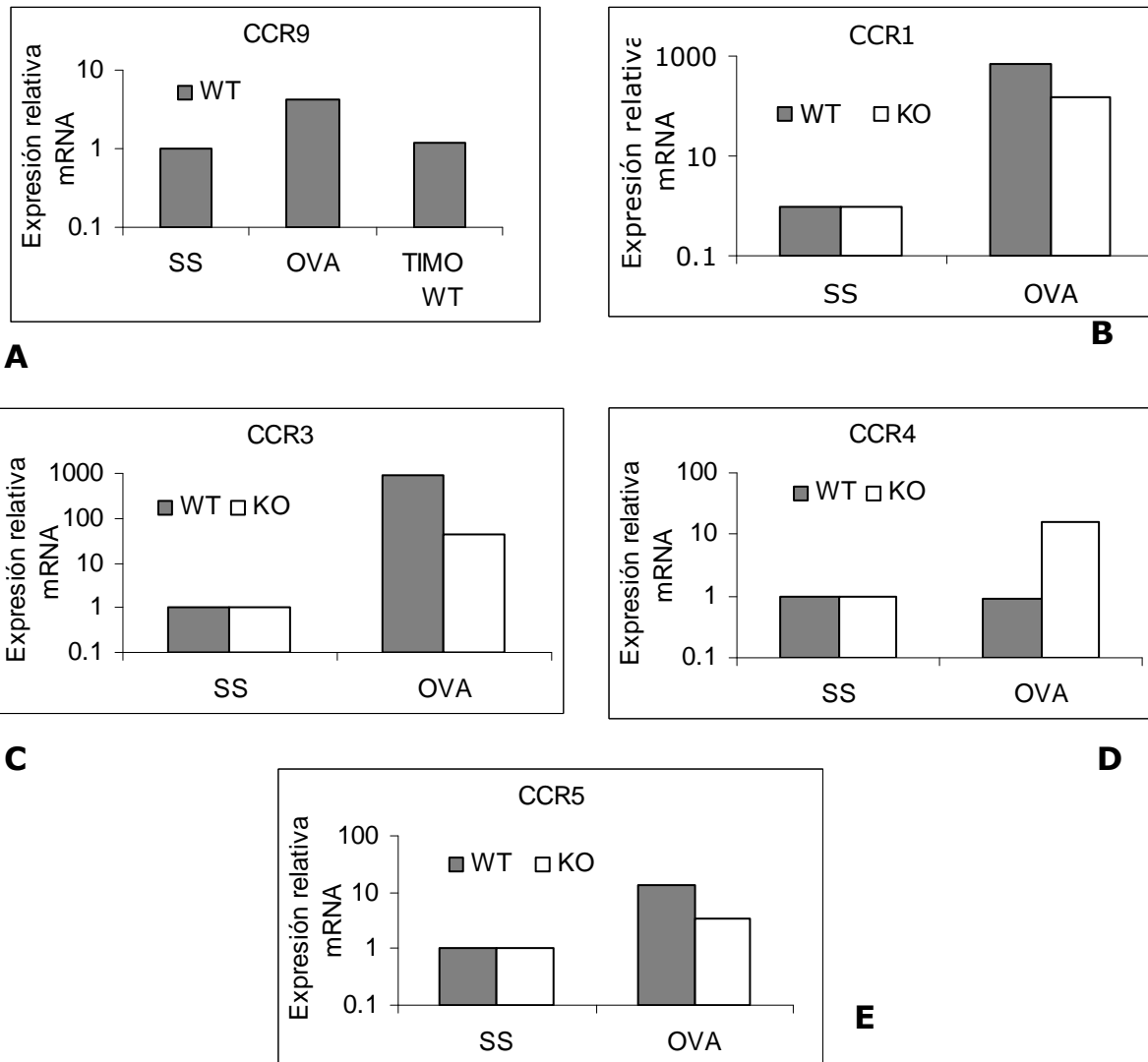


Fig. 16 Expresión relativa de receptores de quimiocinas en RNA extraído de pulmón por RT-PCR en tiempo real. Gráficas representativas de dos experimentos independientes. Expresión relativa al valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ obtenido en cada muestra **A)** Se incluye tejido de timo como control positivo **B)** CCR1 **C)** CCR43 **D)** CCR4 **E)** CCR5

8.11 Análisis por histología del proceso inflamatorio alérgico inducido por OVA en ausencia de CCR9. En los tejidos por H/E, aparentemente existe menor cantidad de infiltrado en el ratón deficiente de CCR9, comparando con CCR9 (+/+) a nivel perivascular y peribronquial. (Panel 1-3) Además, en la tinción con PAS, se observan diferencias en el patrón de moco secretado (Panel 4)

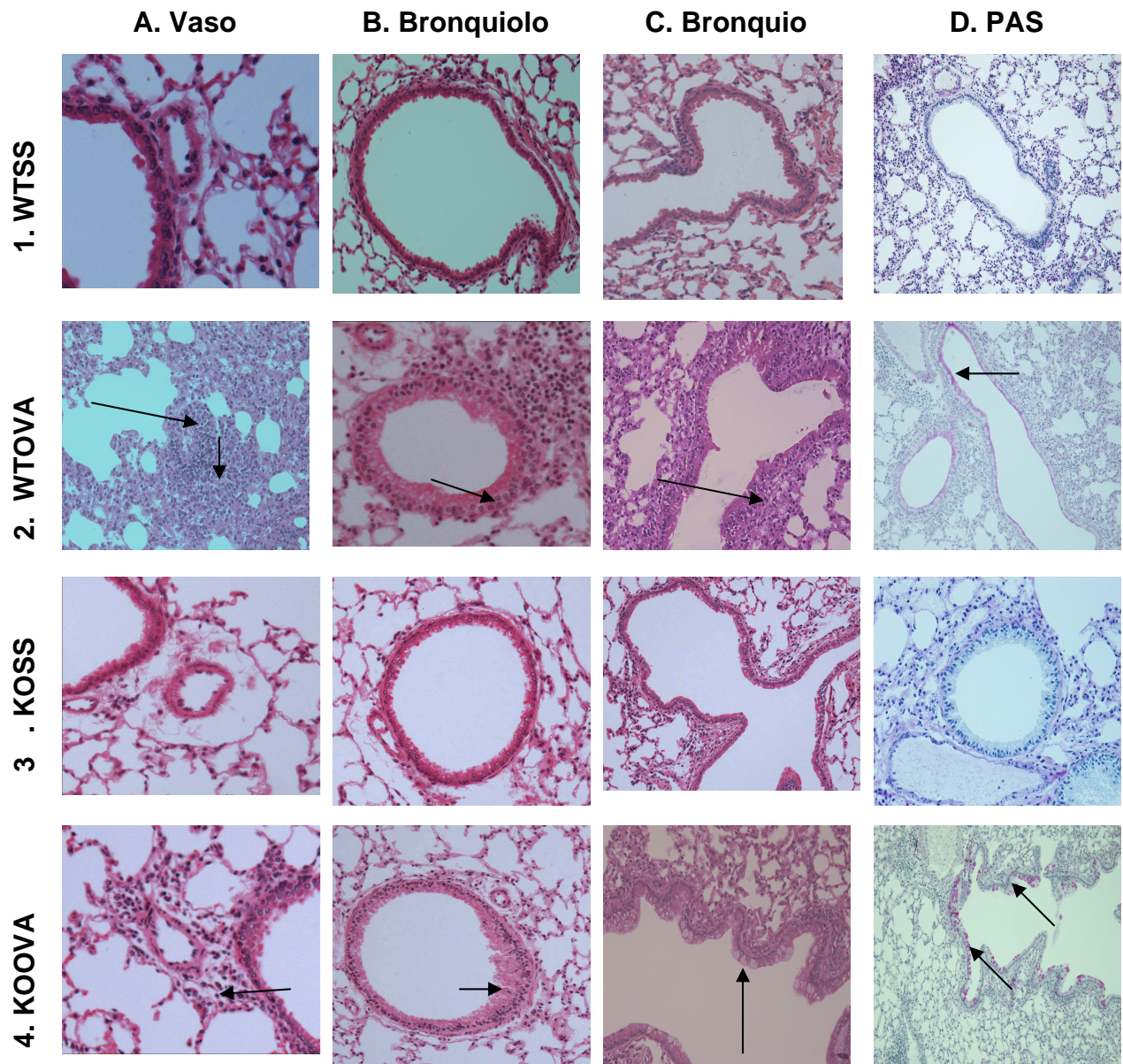
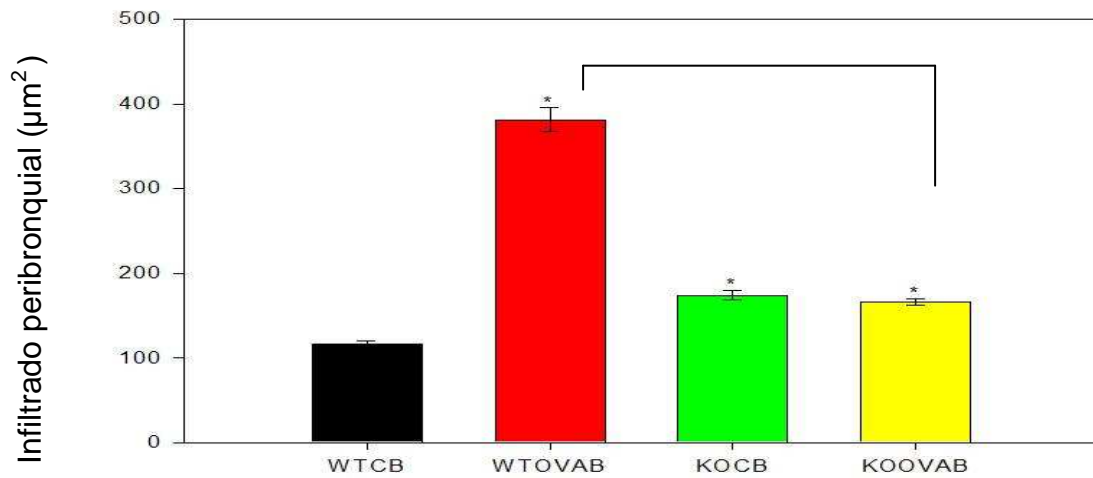


Fig. 17. Análisis histológico de cortes de tejido pulmonar en parafina. A, B, C Tinción con hematoxilina-eosina (HE). D) Tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Aumento 400 X. Imágenes representativas de dos experimentos independientes.

8.12 Análisis cuantitativo del proceso inflamatorio por histología. Al analizar por morfometría la región de infiltrado inflamatorio (mononuclear y polimorfonuclear) perivascular y peribronquial respectivamente, a ambos niveles se observa una disminución en el infiltrado inflamatorio en ausencia de CCR9 comparando con CCR9

+/ **A**



B

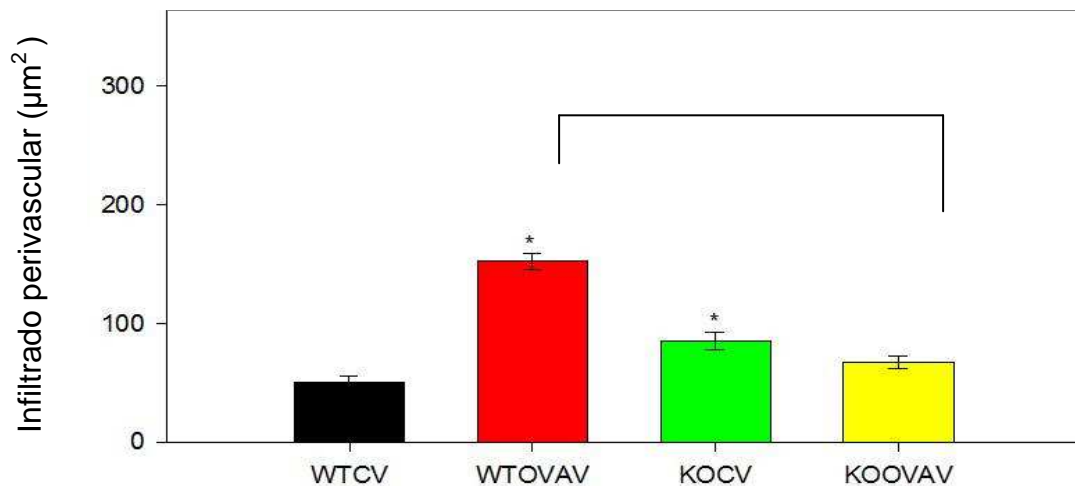


Fig. 18 Análisis morfométrico en cortes histológicos de tejido pulmonar. Se tomaron 2-3 campos por cada imagen. Gráficas promedio de 2 experimentos independientes. A) Diámetro bronquial B) Diámetro vascular. Diferencias significativas P<0.05

9. DISCUSIÓN

El asma es un proceso patológico en vías aéreas cuyo desarrollo y evolución depende en gran medida del reclutamiento de células como eosinófilos y linfocitos CD4+ Th2 principalmente [65]. Un aspecto importante de todos los desórdenes inflamatorios es el reclutamiento excesivo al sitio de inflamación. Es esencial que este reclutamiento sea regulado por citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de matriz y quimiocinas [66]. Recientemente se han descrito algunos receptores de quimiocinas que participan en el reclutamiento de las distintas poblaciones celulares en la alergia pulmonar y a su vez, afectan la magnitud de dicha respuesta y su resolución. Tal es el caso del receptor CXCR1, CXCR3, [67] CCR1, CCR3, CCR4 [68-70].

El receptor CCR9 participa en el reclutamiento homeostático a mucosa intestinal y desarrollo de linfocitos T intraepiteliales [30]. Es un receptor que se expresa diferencialmente en macrófagos, células B plasmáticas, células dendríticas plasmacitoides y células iNKT. Es de interés en este trabajo evaluar su papel en el desarrollo y regulación del proceso inflamatorio alérgico pulmonar.

Para cumplir con el objetivo se utilizó un modelo murino de inflamación alérgica inducido por OVA. Se compararon la cepa de ratones silvestres con la cepa de ratones deficientes en CCR9 (Fig. 6, 7). Este modelo se basa en una sensibilización aguda con OVA, (Fig. 5) la cual es una proteína ampliamente utilizada como alérgeno en modelos experimentales de alergia pulmonar. [57]

Inicialmente, se analizó la expresión de anticuerpos característicos de un proceso alérgico: IgE, IgG1 y de IgG2a como representante de perfil Th1. Se cuantificaron los niveles de estos anticuerpos en suero y los resultados demuestran que la cantidad de inmunoglobulinas en suero no se vio modificada por ausencia de CCR9.(Fig. 8) Esto sugiere aunque CCR9 se expresa en el linfocito B, el cambio de isotipo que se lleva a cabo en éstas células a los anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a, no depende de CCR9.

Debido a que una característica muy importante del proceso alérgico es el reclutamiento celular, se analizó la cantidad de células totales presentes en LBA.

Aunque el número total de células se redujo aparentemente en ausencia de CCR9 (CCR9^{-/-}), esta disminución no fue significativa (Fig.9.1); sin embargo, estas posibles diferencias pudieran relacionarse con un tipo celular determinado.

Para comprobar esto, se identificaron morfológicamente para cuantificar la cantidad de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos en LBA y tejido pulmonar. Este análisis reveló que hay diferencias en el reclutamiento eosinofílico (Fig. 9.2). Se sabe que los eosinófilos son las primeras células que dirigen la respuesta alérgica previa activación de los mastocitos. Esto puede ser importante debido a que esta población celular tanto en periferia como en LBA expresa CCR9 inducido por la exposición a un alérgeno. [61].

Para caracterizar mejor el fenómeno inflamatorio, se analizó la expresión de marcadores de superficie representativos de ciertos tipos celulares de acuerdo a su tamaño y granularidad (Fig. 9.4 a, b)

Otra población importante que dirige el curso del proceso alérgico en pulmón, es la de linfocitos T CD4⁺ que polarizan la respuesta hacia Th2 [71], y los linfocitos T CD8⁺ que son células que predominan en el infiltrado inflamatorio primario. Para valorar el efecto de la deficiencia de CCR9 sobre las subpoblaciones de linfocitos T, se buscó inicialmente por citometría de flujo el marcador CD3⁺ que caracteriza a la población celular de linfocitos T y a su vez, se analizaron diferencialmente a las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en LBA. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en ausencia de CCR9, (Fig. 9.4 c,d), lo que sugiere que el reclutamiento a vías aéreas de linfocitos T no depende de CCR9.

Por otra parte, se analizó la expresión de CCR3 que es un receptor que incrementa su expresión en condiciones de alergia y esto es importante en eosinófilos y linfocitos Th2, sin embargo, no son las únicas células que expresan este marcador de importancia en alergia [70], es probable que por esto no existieran diferencias significativas ($P > 0.05$) en la expresión de este receptor en ausencia de CCR9. (Fig. 9.4e)

Con el fin de caracterizar detalladamente las poblaciones celulares en LBA, se analizó la población que distingue a linfocitos B por la expresión de CD19 (Fig. 8.4 d) ya que

son las células que se encargan de producir anticuerpos específicos contra el alérgeno [72] y también se analizó la población de macrófagos a través de su marcador de superficie CD11b (Fig. 9.4 g) por ser las células inmunes más representativas en pulmón en condiciones de homeostasis [73]. Para ninguno de los dos casos se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en cuanto al número de células presentes en LBA, lo cual es importante ya que los macrófagos son APC y tienen un papel muy importante en el reconocimiento y presentación del antígeno a los linfocitos T.

Para poder correlacionar las células en LBA con las células en tejido, se realizó el análisis por citometría para el tejido pulmonar disgregado con colagenasa. A diferencia del análisis de LBA, este experimento considera otras células como son las de superficie epitelial y músculo liso; sin embargo se obtuvieron resultados similares a los de LBA.

En condiciones de inflamación alérgica, el número de células se incrementa aproximadamente 7 veces en el genotipo CCR9 (+/+). Ocurre algo similar en ausencia de CCR9 (Fig., 10.1) lo que se relaciona con los resultados obtenidos en LBA, lo que sugiere que además de que el receptor CCR9 no tiene efecto sobre el número total de células reclutadas, tampoco lo tiene en la proliferación de las células epiteliales que conforman el tejido. Para este caso se analizaron a las poblaciones de acuerdo a sus marcadores por citometría de flujo de la misma manera que se analizaron en LBA. (Fig. 10.3) y los resultados demuestran que no hay diferencia significativa en cuanto al número de cada población celular analizada, lo cual también confirma los resultados obtenidos en LBA.

Los nódulos linfáticos son los órganos linfoides secundarios encargados de inducir la respuesta inmune adaptativa, es por ello que se procedió a analizar el proceso inflamatorio en este órgano. Lo que resultó fue el haber encontrado una disminución celular total significativa ($P < 0.05$) en ausencia del receptor en condiciones de alergia. (Fig. 11.1). Este resultado sugiere que la respuesta inmune que se lleva a cabo en el ganglio regional no interfiere con el reclutamiento que sucede en el pulmón después de

un estímulo. Se sugiere para completar este estudio, evaluar lo que sucede a nivel de otros órganos secundarios como el bazo para determinar si existe un fenómeno regulador por parte de CCR9 en otros órganos linfoides secundarios.

Para caracterizar mejor a las poblaciones celulares en ganglio, se analizaron a estas células a través de sus marcadores de superficie. El análisis se hizo de acuerdo al tamaño y granularidad (Fig 11.3 a y b). Debido a que la respuesta adaptativa que se lleva a cabo en los ganglios se debe a la presentación de antígeno a los linfocitos T y a la cooperación al linfocito B por parte del linfocito T, es muy importante conocer lo que ocurre en cuanto a esta población de linfocitos T en ausencia de CCR9. Interesantemente, se redujo de manera significativa ($P < 0.05$) el infiltrado inflamatorio para los linfocitos T CD3 o posiblemente la proliferación de las subpoblaciones CD4+ y CD8+.(Figs. 11.3 c,d). Es importante resaltar, que en condiciones de homeostasis, estas diferencias no se observan, por lo que esta disminución podría atribuirse a la ausencia del receptor CCR9 en condiciones de inflamación. Existe el antecedente de que los linfocitos T CD8+ expresen CCR9 más que los CD4+ [36] y además esta subpoblación linfocitaria también es importante en el desarrollo del asma, [74] por lo que sería muy interesante analizar la coexpresión de estos marcadores y la de CCR9.

Al analizar la expresión de CCR3 (Fig. 11.3 e), los resultados demostraron que también existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en ganglio. Es importante saber que en este órgano no se esperaban alta cantidad de eosinófilos ya que no es un sitio de reclutamiento para estas células, es por esto, que la expresión de CCR3 en este órgano no se debería a esta población celular sino a otras que también expresan al receptor como linfocitos B, macrófagos y linfocitos T.[37, 67]

Como parte del análisis en ganglios mediastinales, se evaluó la expresión de CD11b ya que los macrófagos participan en este sitio como células presentadoras de antígeno y los resultados demostraron que el número de macrófagos disminuye significativamente ($P < 0.05$) en ausencia de CCR9. (Fig. 11.3e)

El número de linfocitos B que existan en ganglio, será importante porque además de ser células presentadoras de antígeno, son las células que realizaran cambio de isotipo y de ese órgano salen a periferia como células productoras de anticuerpos [7].

El análisis mostró que también existe una disminución significativa de linfocitos B en ganglio en ausencia de CCR9 (Fig. 11.3f).

La importancia de estudiar en detalle al microambiente es debido a que ahí se encuentran mediadores inflamatorios como las citocinas que pueden modular este proceso en cada etapa del proceso alérgico[54], por esto se analizó la expresión de algunas citocinas en LBA.

Se relaciona a la citocina IL-4 en alergia de manera importante con el cambio de isotipo a IgE y con la activación y el reclutamiento de eosinófilos y ésta además es producida por linfocitos Th2 (7); en este análisis la expresión de IL-4 en LBA no demostró tener una diferencia significativa al comparar el ratón CCR9 (+/+) con el ratón CCR9 (-/-) (Fig. 12 a), lo cual podría sugerir que las células que producen esta citocina no disminuyen por efecto de CCR9 o incluso que la producción de IL-4 en cada célula se viera modificada; sin embargo también se debe considerar que pudiera existir una compensación en su producción por parte de otras células como fibroblastos que también la secretan.

Se determinó por ELISA, la cantidad de TNF- α en LBA. Esta es una citocina proinflamatoria que favorece el reclutamiento celular al sitio de inflamación. En este experimento, en condiciones normales, esta citocina es expresada de la misma manera en ambos genotipos de CCR9, sin embargo en condiciones de inflamación, se reduce la cantidad de TNF- α en ausencia de CCR9 (Fig. 12 c); aunque esta disminución no es significativa ($P < 0.05$). La disminución de la expresión de TNF- α en los animales deficientes de CCR9 podría relacionarse con cierta disminución de factores de transcripción activados como NF- κ B. Esto podría ser comprobado utilizando ensayos de fosforilación de las moléculas involucradas en la cascada de activación de dicho factor de transcripción.

Cabe señalar, que TNF- α es una citocina secretada en las primeras horas del estímulo antigénico y al momento del análisis ya habían pasado más de 24 horas, momento al cual esta citocina podría disminuir su expresión a causa de la secreción de otros mediadores tales como IL-4, IL-5, IL-10 y TGF- β . [39]

Como parte del análisis de citocinas, se cuantificaron los niveles de IL-10. El papel de la IL-10 se relaciona con la regulación del proceso inflamatorio (7). En el ratón deficiente de CCR9, se observó una reducción significativa ($P < 0.05$) en los niveles de IL-10 (Fig. 12 b). Aunque aparentemente, en el ratón deficiente de CCR9, ocurre una disminución en el reclutamiento de acuerdo al análisis de números totales, esta disminución de IL-10 podría ocurrir por la ausencia de células T reguladoras que produzcan IL-10 y que no son reclutadas por efecto de CCR9.

La transcripción de mRNA ocurre antes de que este sea traducido a proteínas. Este mRNA una vez sintetizado, cuenta con algunas formas de regulación y dependiendo de éstas, las proteínas son sintetizadas y expresadas en las células. Con base en esto, se analizó la cantidad relativa de mRNA presente en el tejido pulmonar.

Al analizar por RT-PCR en tiempo real la expresión relativa de citocinas en el proceso inflamatorio alérgico, se encontró que en los niveles de mRNA de IL-4 e IL-5 disminuyeron aparentemente (Fig. 13 a, b). Esto puede relacionarse con la cantidad de IL-4 en LBA.

Se analizó también por RT-PCR, la expresión relativa de elementos de regulación como la citocina IL-10 y el factor intracelular Foxp3. Contrario a lo que se hubiera esperado después de haber encontrado menor número de células inflamatorias en el ratón CCR9 $-/-$, existe menor cantidad también de estos elementos (Fig. 13 c y Fig. 14) que se han involucrado con la regulación de los procesos inmunes por parte de las células T reguladoras.

Esto puede ser importante porque en un proceso inflamatorio crónico como lo es el asma, un elemento de resolución y remodelación importante es la respuesta inmune. Si no existe una regulación adecuada mediada por citocinas, el proceso evoluciona hacia fenómenos patológicos de fibrosis [38].

Finalmente se analizó a una citocina de fenotipo Th1. Por las características del fenómeno inflamatorio que se lleva a cabo en este modelo, hay cierto nivel de IFN- γ detectado, sin embargo al comparar a la cepa silvestre con el fenotipo deficiente de CCR9, el nivel de IFN- γ es menor en ausencia de CCR9 (Fig, 13 d).

Las quimiocinas participan de manera importante en el reclutamiento y activación de las células en el fenómeno alérgico.[75], Se comparó la expresión relativa del mRNA de ciertas quimiocinas en tejido pulmonar por RT-PCR en tiempo real. Para tener un control de expresión de CCL25, se utilizó tejido de timo ya que en este tejido se expresa en niveles más altos [27, 31].

Tal como se esperaba, los resultados demostraron una expresión relativa de mRNA de CCL25 similar en el ratón deficiente y la cepa silvestre (Fig. 15 a), ya que el fenotipo de esta quimiocina no depende de la expresión del receptor CCR9; aunque en los ratones alérgicos se estimula la expresión de CCL25 en pulmón, no se expresa tan eficientemente como ocurre en timo.

CCL2 es una quimiocina que durante el proceso alérgico inflamatorio favorece la deposición de colágeno por fibroblastos, incrementa la producción de TGF- β e induce la fibroproliferación [76]. Se han detectado polimorfismos de esta quimiocina que se relacionan con asma en humanos [77]. Se determinó la expresión relativa de CCL2 y no hay un cambio aparente en su expresión en ausencia de CCR9 (Fig. 15 b), esto sugiere que la expresión de CCL2 en animales alérgicos es CCR9/CCL25-dependiente.

Se analizaron también los niveles de otras quimiocinas como CCL5[78], CCL11 [79] y CCL12 [80] las cuales han sido involucradas en el desarrollo del asma. De manera interesante, la expresión de CCL5 y CCL12 se incrementa en ausencia de CCR9 (Fig. 15 c, e), esto parece indicar que la ausencia de CCR9 induce un efecto compensatorio de estas dos quimiocinas.

CCL11 es producida principalmente por células epiteliales estimuladas con citocinas y la neutralización de CCL11 *in vivo* con anticuerpos específicos reduce la acumulación de eosinófilos en pulmón [81]. En este modelo, CCL11 se encuentra disminuida (Fig. 15 d) y esto es consistente con el hecho de que disminuyan los eosinófilos que dependen en gran medida de CCL11 para su reclutamiento.

Los receptores de quimiocinas son un blanco terapéutico muy importante para el tratamiento del asma. La regulación en la expresión del mensajero depende, entre otras cosas, de otros receptores de quimiocinas y de sus ligandos. Por ello y por las diferencias encontradas en la transcripción de estos ligandos, en este estudio se interesó en analizar la transcripción de mRNA de algunos receptores.

Para confirmar la expresión de CCR9, se utilizó tejido de timo, ya que se sabe que en este tejido la expresión del receptor se debe a los timocitos en desarrollo y principalmente en los que se encuentran en la transición DN a DP [30, 35] y en este modelo, los resultados demostraron aparentemente mayores niveles de mRNA en los animales alérgicos a OVA y tratados como CCR9 (+/+) que en timo.(Fig. 16)

El receptor CCR3 se encuentra íntimamente involucrado con el fenómeno alérgico porque es expresado en dos tipos celulares cruciales en la inducción de inflamación: eosinófilos y linfocitos Th2. El antagonismo de este receptor promete ser una estrategia terapéutica válida para el tratamiento del asma. El reclutamiento eosinofílico a pulmón posterior a un reto antigénico, se reduce en el ratón deficiente de CCR3 y existe un incremento de hiperreactividad inesperado cuando se bloquea CCR3 con anticuerpos, sugiriendo que los eosinófilos no llegan a pulmón pero si se acumulan.[82] En el presente estudio, los ratones alérgicos/deficientes de CCR9 tienen aproximadamente 10 veces menos en sus niveles de CCR3 que los CCR9 (+/+) (Fig. 16 c), esto es muy importante porque el reclutamiento eosinofílico depende principalmente de este receptor.

Se analizó expresión relativa de mRNA de CCR5 y la de CCR1. Se encontró un aumento en la expresión de estos dos receptores que pueden tener un papel importante en el reclutamiento de células mononucleares que expresan estos receptores. (Flg 16 b,d)

CCR4 y su ligando CCL22 contribuyen al reclutamiento de las células Th2 a pulmón. En contraste, la deficiencia de CCR4 no ofrece ninguna protección al desarrollo de asma o de hiperreactividad [83, 84]. En este estudio, se obtuvo una cantidad elevada de mRNA de CCR4, esto es de casi 10 veces con respecto al ratón normal. Esto podría ser una debido a una compensación por la ausencia con la expresión de otros receptores de quimiocinas.

Posteriormente, para caracterizar las poblaciones *in situ*, se analizaron por histología las diferencias entre los grupos tratados y controles para cada fenotipo de CCR9. Aparentemente el infiltrado peribronquial y perivascular es mayor cuando está presente CCR9.

El análisis de las muestras indica que la mayor parte de este infiltrado en los animales alérgicos son eosinófilos y esto puede relacionarse directamente con los conteos celulares y con las cantidades de mRNA (Fig. 17).

La tinción con PAS que pone de manifiesta la presencia de moco, reveló una producción poco uniforme de moco por las células calciformes del epitelio bronquial en los ratones deficientes de CCR9. Es evidente que en ratones CCR9 (+/+) hay un patrón de secreción de moco que rodea completamente el perímetro del bronquiolo, lo que no ocurre en el ratón deficiente de CCR9. Esto propone investigar a detalle si CCR9 modula directamente la secreción de moco o a través de las mucinas en las células mucoproducidas. Sería recomendable utilizar otras tinciones que revelaran otros tipos de mucopolisacáridos tales como Azul Alciano o incluso evaluar la expresión de genes involucrados con la producción de moco tal como MUC5.

Se cuantificaron las poblaciones celulares asociadas al tejido pulmonar por un método morfométrico, confirmando que tanto el infiltrado perivascular como peribronquial es cuantitativamente menor en el ratón CCR9 (-/-) (Fig. 18).

CCR9 y su ligando se expresan en bajas concentraciones en condiciones basales en tejido pulmonar; en un proceso inflamatorio alérgico un aumento de la expresión de CCR9 en las células reclutadas puede regular y modular este proceso.

El presente trabajo demuestra que el receptor CCR9 participa en el reclutamiento celular de eosinófilos en pulmón y de linfocitos T CD4+, CD8+, linfocitos B y macrófagos en ganglios mediastinales, aunque no se afectó de manera significativa el desarrollo de la respuesta alérgica humoral. La respuesta inmune que se ve afectada en ganglios mediastinales por la ausencia de CCR9, abre una serie de cuestiones importantes acerca de que dicha regulación pudiera llevarse a cabo en ganglio y no en pulmón.

La regulación que pudiera deberse a CCR9 en el asma alérgica, aún no está descrita, sería necesario, evaluar la participación de otras quimiocinas, citocinas y receptores de quimiocinas que participan en el microambiente y el efecto que pudiera tener el receptor en la actividad y activación de eosinófilos y de linfocitos T.

Los modelos animales de inflamación alérgica pulmonar se utilizan ampliamente para probar nuevas alternativas para el tratamiento del asma y conocer mejor lo que ocurre a nivel celular y molecular. Aunque un solo modelo no demuestra lo que ocurre realmente en el proceso asmático, sí permite sugerir lo que pasa en el proceso patológico.

El presente modelo experimental permitió evaluar la inflamación alérgica pulmonar, que comprende el reclutamiento celular a nivel pulmonar, producción de moco y nos permitió evaluar la respuesta inmune en ganglios. Para completar esta investigación, sería interesante evaluar la hiperreactividad para relacionar de mejor manera este modelo a lo que ocurre en el asma, ya que este fenómeno es característico en este padecimiento y poblaciones celulares específicas como las iNKT se han relacionado de manera importante con este proceso patológico.

10. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un modelo de inflamación alérgica pulmonar en ratón deficiente de CCR9 (CCR9 -/-).
- Se comparó el proceso inflamatorio en la cepa de ratón silvestre (CCR9 +/+) y la cepa deficiente (CCR9 -/-).
- El análisis del número de células totales en lavados broncoalveolares (LBA) y tejido pulmonar no demuestra diferencias significativas; sin embargo en los ganglios mediastinales del ratón alérgico sí se observó una disminución significativa.
- El análisis histológico y morfométrico demostró menor reclutamiento celular en ausencia de CCR9 hacia pulmón en condiciones de alergia.
- Al analizar el LBA, se observó que en ratones no hay diferencia en ningún tipo celular analizado, sin embargo, en CCR9 (-/-), se observó una disminución significativa en cuanto al número de eosinófilos.
- El análisis de los tipos celulares de acuerdo a la expresión de marcadores superficiales: CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b, CCR3 no se vio modificada en ausencia de CCR9 en LBA ni en tejido pulmonar. Sin embargo, estos marcadores se redujeron significativamente en CCR9 (-/-) comparado con CCR9 (+/+) en los ganglios mediastinales.
- La ausencia de CCR9 modifica la expresión de otros receptores como CCR2, CCR4, CCR3 y CCR5 en el tejido pulmonar.
- No se observó diferencia significativa en la respuesta humoral OVA- específica de las inmunoglobulinas IgE, IgG2a e IgG1 en ausencia de CCR9.
- Los resultados al evaluar el perfil de citocinas en LBA, demostraron que no hay diferencia en la expresión de IL-4 ni TNF- α . En el caso de IL-10, se observa disminución en los niveles en el ratón deficiente de CCR9.
- Los niveles de mRNA de quimiocinas como CCL2, CCL5, CCL11 y CCL12 se afecta en ausencia de CCR9.
- La expresión de Foxp3 se ve modificada en ausencia de CCR9 en condiciones de inflamación.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Parslow A, et al. Inmunología médica básica y clínica M. Moderno, Editor. 2005. p. 538
2. Janeway C, M.R., Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p.197-216.
3. Creagh E, O.L., TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. . *TRENDS in immunology.*, 2006. 27: p. 352-357.
4. Drayton D, L.S., Mounzer R, Ruddle N. , Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat immunol*, 2006. 7: p. 344-353.
5. Sprent J, S.C., T cell memory. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 551-579.
6. Chen , Z., Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum.*, 2007. 17: p. 456-462.
7. Abbas, A., *Cellular and Molecular Immunology*. 2005, ed. W B Saunders Co. p. 598.
8. Janeway, C.J.T., in *Immunobiology: the Immune System in Health and Disease*. 2007, ed. GP New York,.
9. Akbari O, D.R., Umetsu DT, Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*, 2001. 2: p. 725-31.
10. Medoff B, T.S., Luster, A, T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol*, 2007. 32: p. 265-230.
11. Janeway C, e.a., *Inmunobiology*, Garland Science. p. 928
12. Billadeau D, J.J., Gomez T, Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7: p. 131-143.

13. Takahashi Y, O.H., & Takemori T, Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity*, 2001. 14: p. 181-192.
14. Nagasawa T, Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6: p. 107-116.
15. Kim C, The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr Opin Hematol*, 2005. 12: p. 298-304.
16. Luster A, Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Eng J Med.*, 1998. 338: p. 436-445.
17. Charo I. Ransohoff R, The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Eng J Med.*, 2006. 354: p. 610-621.
18. Mantovani A, B., R. Locati M, Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6: p. 907-920.
19. Baggiolini M, Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998. 392: p. 565-568.
20. García-Zepeda E, C.C., Rothenberg M, Sarafi M, Lavigne F, Hamid Q, Murphy P, Luster A. , 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*, 1996. 157: p. 5613-5626.
21. Belperio JA, K.M., Arenberg DA, , CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*, 2002. 68: p. 1-8.
22. Arenberg DA, Z.A., Strom SR, et al., The murine CC chemokine, 6C-kine, inhibits tumor growth and angiogenesis in a human lung cancer SCID mouse model. *Cancer Immunol Immunother*, 2001. 49: p. 587-592.
23. Ley K, L.C., Cybulsky M, Nourshargg S., Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7: p. 678-689.
24. Allen S, C.S., Handel T., Chemokine: Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 787-820.

25. Allen S, C.S., Handel T. , Chemokine: Receptor, Structure, Interactions, and Antagonism *Annu Rev Immunol*, 2001. 25: p. 787-820.
26. Rossi D, Z.A., The biology of chemokines and their receptors. . *Annu Rev Immunol*, 2007. 18: p. 217-242.
27. Vicari A, F.D., et al, TECK: A novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. . *Immunity*, 1997. 7: p. 291-301.
28. Nomiyama H, A.K., Kasuda J, Imai T, Miura O, Yoshie O, Matsuda Y. , The human CC chemokine TECK (SCYA25) maps to chromosome 19p13.2. *Genomics*, 1998. 51: p. 311-317.
29. Wikinson B, O.J., Jenkinson E., Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J Immunol*, 1999. 162: p. 3873-3879.
30. Kunkel E, C.J., Heraldson G, Pan J, Boisvert J, Roberts A, Ebert E, Vierra M, Goodman S, Genovese M, Wardlaw A, Greenberg H, Parker C, Buthcher E, Andrew D, Agace W. , Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional specialization of the mucosal immune system immunity. *J Exp Med*, 2000. 192: p. 761-767.
31. Youn B, K.C., Smith F and Broxmeyer, H. , TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood*, 1999. 94: p. 2533-2536.
32. Zaballos A, G.J., Varon R, Ardavin C, Márquez G., Cutting Edge: Identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol*, 1999. 22: p. 5671-5675.
33. Yu C, P.K., Zaitseva M, Golding H, Farber J. , CCR9A and CCR9B: Two receptors for the chemokine CCL25/TECK/Ckb-15 that differ in their sensitivities to ligand. *J Immunol*, 2000. 164: p. 1293-1305.

34. Norment A, B.L., Gantner B, Bevan M. , Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. . J Immunol, 2000. 164: p. 639-648.
35. Zabel B, A.W., Campbell J, Heath h, Parent D, Roberts A, Ebert E, Nasim K, Qin S, Zovko M, LaRosa G, Yang Li-Li, Soler D, Butcher E, Ponath P, Parker C, Andrew D., Human G Protein-coupled receptor GPR.9.6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. J Exp Med, 1999. 190: p. 1241-1255.
36. Papadakis K, P.J., Nelson V, Chen L, Binder S, Ponath P, Andrew D, Targan S., The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. . J Immunol, 2000. 165: p. 5069-5076.
37. Wurbel M, M.M., Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig M, Richelme M, Carrier A, Malissen B., Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B- cell development and a reduction in T-cell receptor gd+ gut intraepithelial lymphocytes. Blood, 2001. 98: p. 2626-2632.
38. Busse W, E.J., Sheppard S, Banks-Schlegel S, Airway Remodeling and Repair. Am J Respir Crit Care Med, 1999. 160: p. 1035-1042.
39. Karp W, Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 255-281.
40. Lane S and L. T., Mast cell effector mechanisms. J Allergy Clin Immunol, 1996. 98: p. S67-72.
41. Abkbari O, F.J., Hoyte E, Gerald B, Wahlstrom J, Kronenberg M, DeKruyff R, Umetsu D. , CD4+ invariant T-cell-receptor + natural killer T cells in bronchial asthma. New Eng J Med, 2006. 354: p. 1117-1130.
42. Jinquan T, L.W., Yuling H, Lang C. , All roads lead to Rome: pathways of NKT cells promoting asthma. Arch Immunol Ther Exp, 2006. 54: p. 335-340.

43. Vignola A, P.F., Capiieu L. , Airway remodeling assessed by sputum and high resolution computed tomography in asthma and COPD. *Eur Respir J*, 2004. 24: p. 910-917.
44. Pini L, H.Q., Shannon J., Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics. *Eur Respir J*, 2007. 29: p. 71-77.
45. Opal, S.M., DePalo, V. A. , Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 2000. 117: p. 1162-1172.
46. Letterio, J., Roberts, A. B. , Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 137-161.
47. Li, M.O., Flavell, R. A. , Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- β and interleukin-10. *Immunity*, 2008. 28: p. 468-476.
48. Cookson W, The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*, 1999. 402: p. B5-10.
49. Van Eerdewegh P, Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, 2002. 415: p. 878-891.
50. Galli S, T.M., Piliponsky A, The development of allergic inflammation. *Nature*, 2008. 454: p. 445-454.
51. Stein R, Respiratory syncytial virus in early life and risk of atopic wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet*, 2002. 354: p. 541-545.
52. Shrikawa T, E.T., Shimazu S, Hopkin J., The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*, 1997. 275: p. 77-79.
53. Umetsu D, M.J., Akbari O, Macaubas C, DeKruyff R, Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Rev Immunol*, 2002. 3: p. 715-720.
54. Benayoun L, D.A., Dombret M, Aubier M, Petrolani M. , Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. 167: p. 1360-1368.
55. Reber L, D.S.C., Frossard N. , Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*, 2006. 533: p. 327-340.

56. Nials A, U.S., Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease Mod & Mech*, 2008. 1: p. 213-220.
57. Epstein M, Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Tox Pathol*, 2006. 57: p. 41-44.
58. Passalacqua G, Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to *Parietaria* species: A double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy Clin Immunol*, 1999. 104: p. 964-968.
59. Zdanowicz M, Pharmacotherapy of asthma. *American Journal of Pharmaceutical Education* 2007. 71: p. 1-12.
60. Sen Y , Y.B., Yuling H, Luokun X, et al, V24-Invariant NKT Cells from Patients with Allergic Asthma Express CCR9 at High Frequency and Induce Th2 Bias of CD3+ T Cells upon CD226 Engagement. *J Immunol*, 2005. 175: p. 4914-4926..
61. Liu L, J.N., Busse W, Kelly E. , Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112: p. 556-562.
62. Masoli M, F.D., Hotl S, Beasley R. , The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*, 2004. 54: p. 469-478.
63. Beasley R. The global burden of asthma report, Global initiative for asthma (GINA). 2004; Available from: <http://www.ginasthma.org2004>.
64. Busse W, S.T., Lemanske Rf, , Asthma. *N Eng J Med*, 2001. 344: p. 350-362.
65. Bousquet J, J.P., Busse W, Johnson, Vignola A, Asthma. From Bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161: p. 1720-1745.
66. Proudfoot A, Chemokine receptors multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev*, 2002. 2: p. 106-116.

67. Campbell J, B.C., Symon F, Qin S, Murphy K, Hodge M, Andrew D, Buthcer E, Wardlaw A., Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J Immunol*, 2001. 166: p. 2842-2848.
68. Heath H, Q.S., Rao P, Lijun W, LaRosa G, Kassam N, Ponath P Mackay C, Chemokine receptor usage by human eosinophils. *J Clin Invest*, 1997. 99: p. 178-184.
69. Luckacs N, M.A., Hogaboam C, Chemokine receptors in asthma: Searching for the correct immune targets. *J Immunol*, 2003. 22: p. 11-14.
70. Humbles AA , L.B.F.D., Okinaga S , Lora J , Al-Garawi A, Martin TR, Gerard NP, Gerard C The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Immunology*, 2002. 99: p. 1479-1484.
71. Cohn L, E.J., Geoffrey C., Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*, 2003. 22: p. 789-815.
72. Manz R, H.A., Hiepe F, Radbruch A. , Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol*, 2004. 23: p. 367-386.
73. Holt P, S.D., Wikstrom M, Jahnsen F., Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nature reviews*, 2008. 3: p. 142-154.
74. Busse W, L.R., Asthma. *New Engl J Med*, 2001. 344: p. 350-362.
75. Oliveira S, L.N., The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. . *Brazil J Med Biol Res*, 2003. 36: p. 1455-1463.
76. Hogaboam CM, B.-L.C., Lipinski S, Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Kunkel SL, Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models. *J Immunol*, 1999. 163: p. 2193.

77. Chelbi H , G.A., Lacheb J , Ghandil P , Hamzaoui K , Hamzaoui A , Combadiere C A polymorphism in the CCL2 chemokine gene is associated with asthma risk: a case-control and a family study in Tunisia. *Genes Immun*, 2008. 9: p. 575-581.
78. Muro M, M., L, Torio Am Pagan J, Álvarez-López M,. , CCL5/RANTES chemokine gene promoter polymorphisms are not associated with atopic and nonatopic asthma in a Spanish population 2008. 35: p. 19-23.
79. Kim J, M.A., Nemzek A, Bolgos B, Siddiqui J, Remick, D, Eotaxin Represents the Principal Eosinophil Chemoattractant in a Novel Murine Asthma Model Induced by House Dust Containing Cockroach Allergens. *J Immunol*, 2001. 167: p. 2808-2815.
80. Teran M, CCL chemokines and asthma. *Immunol Today*, 2000. 21: p. 235-242.
81. Proudfoot A, P.C., Rommel C, Wells TN., Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. . *Semin Immunol*, 2003. 15: p. 57-65.
82. Humbles A, L.B., Friend D, Okinaga S, Lora J, Al-garawi A, Martin T, Gerard N, Gerard C, The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness *PNAS*, 2002. 99: p. 1479-1484.
83. Conroy DM , L.C., Hodge MR , Andrew DP, Williams TJ , Pease JE , Sabroe I, CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation. *J Leukoc Biol*, 2003. 74: p. 558-563.
84. Lloyd C, R.S., Chemokines in allergic airway disease. *Curr Op Pharmacol*, 2003. 3: p. 443-448.

APÉNDICE I. OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS Y SUS CONDICIONES DE REACCIÓN.

Condiciones de reacción:

Paso 1 (1 ciclo): 94°C, 1min

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

B-Actina

Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG
Antisentido: GGTCTCAAACATGATGTGGG

Tamaño del producto: 218pb
Temperatura de disociación: 83.8°C

TNF α

Sentido:GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC
Antisentido:ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG

Tamaño del producto: 300pb
Temperatura de disociación: 82.3°C

IL-5

Sentido ACCTTGACTGCTTTCTACTCAT
Anti. :AGAACTCTTGCAGGTAGTCTAGG

Temperatura de disociación: 82.3°C

CCR1

Sentido: GGGACATCATCAAACCAGACC
Antisentido: GCCAACCAAGCAGAAGACAGC

Tamaño del producto: 262pb
Temperatura de disociación: 80.7°C

CCR2

Sentido: CATTGACCCCCACATAGGGAT
Antisentido: TTGTTGGAGAGAAGTTCCGAAGG

Tamaño del producto: 230pb
Temperatura de disociación:

CCR3

Sentido: TTCTCACCAGGAAGAAACGGA
Antisentido: GGAGGTGACTGAGGTGATTGC

Tamaño del producto: 135 pb
Temperatura de disociación: 77°C

CCR5

Sentido: ATCGTGTAAGCTCAGTCTATACCC

Antisentido: GCATGTATCTTGGCCCTCTATGAT

Tamaño del producto: 150 pb

Temperatura de disociación: 77°C

CCL11

Sentido:

CTGAAGAGCTACAAAAGAATCACCAACA

Antisentido:

GACCCCAAGAAGAAGTGGGTCCAGGATG

Tamaño del producto: 135 pb

Temperatura de disociación: 78.3°C

CCR9

Sentido: TCCGAAGGGATCTGGTGAAG

Antisentido: GAATGAAACCCACTGGGCC

Temperatura de disociación: 78 °C

IL-10

Sentido: TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA

Antisentido: GGAGAAATCGATGACCGCGC

Temperatura de disociación: 78.3°C

IFN-γ

Sentido: AACGCTACACACTGCATCTTGG

Antisentido: GCCGTGGCAGTAACAGCC

Temperatura de disociación: 78.3°C

CCL2

Sentido: TGATCCCAATGAGTAGGCTG

Antisentido: GGGCAGATGCAGTTTTAAAT

Tamaño del producto: 201pb

Temperatura de disociación: 81.1°C

CCL12

Sentido: TTTCCACACTTCTATGCCTCC

Antisentido: GCAGTATGGTCCTGAAGATCA

Tamaño del producto: 201pb

Temperatura de disociación: 81.8°C

CCL25

Sentido: GCCTGGTTGCCTGTTTTGTT

Antisentido: CAGCAGTCTTCAAAGGCACCT

Temperatura de disociación: 77°C

FOXP3

Sentido: GGTACACCCAGGAAAGACAG

Antisentido: ATCCAGGAGATGATCTGCTTG

Temperatura de disociación: 77 °C

CCL5

Sentido: CAAGTGCTCCAATCTTGACAGTC

Antisentido: TTCTCTGGGTTGGCACACAC

Temperatura de disociación: 78.3°C

APÉNDICE II REACTIVOS Y SOLUCIONES

SOLUCIONES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO	
<p><i>Amortiguador para FACS</i></p> <p>PBS 1X esteril cbp 100 mL SFB 2 mL Azida de sodio 0.5 mL</p>	
SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE DNA	
<p><i>Buffer de lisis</i></p> <p>Tris 1M pH 8.5 100 mL NaCl 5 M 10 mL SDS 10% 4 mL EDTA 0.5 M 2 mL H₂O cbp 200 mL Proteinasa K 20 mg</p>	<p><i>Proteinasa K</i></p> <p>Proteinasa K 20 mg H₂O 10 mL</p>
SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA	
<p><i>PBS 10x</i></p> <p>KCl 200mg/L KH₂PO₄ 200mg/L NaCl 8000mg/L Na₂HPO₄ 1150mg/L Agua desionizada</p>	<p><i>Agua tratada con DEPC</i></p> <p>0.05% de DEPC en H₂O tridestilada se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se esteriliza por autoclave.</p>

<p><i>TAE 1X</i></p> <p>Tris Base 0.1M EDTA 0.001M Agua tratada con DEPC El pH debe ser 8.3</p>	<p><i>Amortiguador de carga para ARN (10X)</i></p> <p>Glicerol 50% (v/v) EDTA 0.1 M pH 8.3 Azul de bromofenol 0.05%</p>
<p><i>Gel de Agarosa</i></p> <p>TAE 1X Agarosa 1.5% p/v Agua desionizada estéril</p>	
<p>SOLUCIONES PARA ELISA</p>	
<p><i>Solución de Lavado para ELISA</i></p> <p>KCl 200mg/L KH₂PO₄ 200mg/L NaCl 8000mg/L Na₂HPO₄ 1150mg/L Agua desionizada 200mL pH 7.4 Tween 20 0.05% v/v</p>	<p><i>Amortiguador de Carbonatos</i></p> <p>pH 9.5 Para 200mL (10X) Na₂CO₃ 3.2g NaHCO₃ 5.86g Agua desionizada</p>
<p><i>Solución de Trabajo para ELISA</i></p> <p><i>pH 7.4</i></p> <p>KCl 200mg/L KH₂PO₄ 200mg/L NaCl 8000mg/L Na₂HPO₄ 1150mg/L Agua desionizada</p>	

H_2SO_4 2N Para 100mL H_2SO_4 10.2 ml Agregar agua destilada hasta 100mL	

REACTIVOS

- Proteinasa K (Invitrogen, Alemania)
- OVA (USB EUA)
- Suero Fetal Bovino (Hyclone)
- Albúmina Serica Bovina (Sigma-Aldrich)
- Inject Alum (PIERCE)
- Solución salina Isotónica NaCl 0.9 % calidad inyectable (SSI) (Laboratorios Pisa, México)
- Etanol absoluto (JTBaker, México)
- Cloroformo (JTBaker, México)
- Alcohol isopropílico (JTBaker, México)
- Agarosa (BIO-RAD UEA)
- Bromuro de Etidio (GIBCO EUA)
- Heparina Grado 1A (Sigma Alemania)
- Azul de tripano (GIBCO Alemania)
- Xilacina (Laboratorios Pisa, México)
- Diff Quick (Dade Behring, Suiza)
- Poli L-lisina (Sigma, EUA)
- Peroxido de Hidrógeno 1X (Pierce, EUA)
- TMB microwell Substrate (BD Optics)
- dGTP, dATP, dCTP, dTTP (100 mM) (Promega,USA).
- SYBR Green Master Mix 2x (Applied Biosystems, Inglaterra)