

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DEL PAPEL DEL RECEPTOR DE QUIMIOCINAS
CCR9 EN LA REGULACIÓN DEL PROCESO
INFLAMATORIO ALÉRGICO PULMONAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

Q.F.B. CYNTHIA PAOLA
LÓPEZ PACHECO

Tutor: DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA



MÉXICO, D.F.

ENERO 2012



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.

Análisis del papel del receptor de quimiocinas CCR9 en la regulación del proceso inflamatorio alérgico pulmonar

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Eduardo García Zepeda, en el Laboratorio de Investigación sobre la Biología de las Quimiocinas en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eduardo García Zepeda	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM;

Se reconoce la asesoría, invaluable ayuda y apoyo técnico de la Q.F.B. Gisela Du Pont de Lara durante la realización de este proyecto de Maestría.

Se reconoce la invaluable ayuda y apoyo a la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo por su participación activa en la discusión de esta tesis y por su asesoría y colaboración con nuestro grupo de investigación.

Se agradece la colaboración y asesoría para el análisis histológico presentado en el presente trabajo, a la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes. Se reconoce el procesamiento de las muestras para histología en el Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología Celular y Tisular a cargo de la Técnico Verónica Rodríguez Mata.

Se utilizaron los servicios de la unidad de análisis de placas en el laboratorio de la Dra. Clara Espitia Pinzón del Instituto de Investigaciones Biomédicas asesorados por el Dr. Antonio Javier Vallecillo.

Este estudio de maestría fue apoyado con una beca para estudios de posgrado de tiempo completo otorgada por CONACYT.

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Edgar Zenteno Galindo	Facultad de Medicina
Vocal	Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva	Instituto de Biotecnología
Secretario	Dra. Claudia González Espinosa	Centro de Investigación y Estudios Avanzados
Suplente	Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular
Suplente	Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas

ÍNDICE

Abreviaturas	Pág. 3
Resumen	Pág. 4
I. Introducción	Pág. 6
II. Antecedentes	Pág. 21
III. Justificación y planteamiento del problema	Pág. 22
IV. Hipótesis	Pág. 23
V. Objetivos	Pág. 23
VI. Metodología	Pág. 24
VIII. Resultados	Pág. 33
IX. Discusión	Pág. 54
X. Conclusiones	Pág. 62
XI. Referencias	Pág. 63
Anexo 1	Pág. 71
Anexo 2	Pág. 72
Anexo 3	Pág. 74

ABREVIATURAS

Alum	Emulsión de hidróxido de aluminio y magnesio en proporción (1:1)
CCR	Receptor de quimiocinas de la familia CC
CXCR	Receptor de quimiocinas de la familia CXC
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Diethylpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
FACS	Citómetro de flujo
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HE	Hematoxilina/eosina
HRP	Peroxidasa de rábano
LBA	Lavados broncoalveolares
M-MLVRT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina-Moloney
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
OVA	Proteína ovoalbúmina
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT PCR	Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa
SFB	Suero fetal bovino
TAE	Solución de tris-acetato EDTA
TGF- β	Factor transformante de crecimiento beta
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TCR	Receptor de linfocito T
VCAM	Molécula de adhesión a la célula vascular

RESUMEN

Durante la progresión del proceso asmático, existen diversos mediadores que participan en el reclutamiento y activación celular hacia el pulmón, entre los cuales destacan las quimiocinas; éstas son citocinas de bajo peso molecular, a las que se les conoce principalmente por su papel quimioatrayente. La expresión elevada de algunas quimiocinas y sus receptores y la interacción que se lleva a cabo entre éstas y sus receptores se han asociado con la progresión de la inflamación alérgica pulmonar; sin embargo existen receptores cuya participación no ha estudiada con detalle, tal es el caso del receptor CCR9.

El receptor CCR9 se ha identificado como un modulador importante de la respuesta inmune en la mucosa intestinal, aunque también existen antecedentes en donde se sugiere que la expresión de este receptor se induce a través del microambiente inflamatorio presente en la mucosa pulmonar durante la alergia pulmonar, ya que existen reportes donde se demuestra que los eosinófilos, linfocitos T y las células NKT, pueden incrementar la expresión de CCR9. Este trabajo tiene el objetivo de investigar el papel del receptor CCR9 y su ligando, la quimiocina CCL25, en la modulación del proceso inflamatorio durante la alergia pulmonar.

Para cumplir con este objetivo, se utilizó un modelo *in vivo* de inflamación alérgica pulmonar inducido con ovoalbúmina (OVA) en ratones C57BL/6 silvestres y se comparó la respuesta inflamatoria en ratones deficientes del receptor CCR9 (CCR9 *knockout* KO).

Los animales se sensibilizaron vía i.p. con 10 µg de OVA con 10 µL de Al(OH)₃ (Alum) diluido en 100 µL de PBS en los días 1 y 8. Durante los días 15-20 se nebulizó a los animales con OVA al 1% en PBS durante 30 minutos, el día 34 la nebulización fue de 5% en PBS. Veinticuatro horas posteriores al último reto, los animales se sacrificaron y se obtuvieron muestras de tejido, lavados broncoalveolares (LBA) y sueros para analizar la expresión de receptores, quimiocinas y/o citocinas por PCR, citometría de flujo y ELISA respectivamente.

Los resultados no demostraron diferencias significativas en el número total de células en lavados broncoalveolares (LBA) entre los ratones alérgicos silvestres comparados con los deficientes de CCR9; aunque sí se encontraron diferencias en el número de eosinófilos (número de células en conteo diferencial).

En este modelo experimental, en el análisis histológico y morfométrico se encontró una reducción en reclutamiento celular en ausencia de CCR9. En el número o porcentaje de células positivas que expresan los marcadores como CD4, CD8 y CCR3 no se encontraron diferencia en los ratones *ccr9* ^{-/-} ; sin embargo la identificación de eosinófilos de acuerdo a la coexpresión de CD11b/CD11c, y este resultado correlacionó con la disminución en número de eosinófilos observada en LBA por conteo diferencial.

Resultados preliminares por RTPCR indican que la inflamación induce cambios en la expresión de CCR3 y CCR9 en el tejido pulmonar, así como de las quimiocinas CCL11 y CCL25.

Al analizar por ELISA la producción de anticuerpos IgE e IgG1 en suero, no se encontraron diferencias significativas en los ratones deficientes de CCR9.

Estos resultados sugieren que el receptor CCR9 puede estar involucrado en la modulación de la respuesta alérgica en pulmón, afectando la presencia de una población específica de eosinófilos.

El presente trabajo contribuye al conocimiento de la regulación de la respuesta inflamatoria durante la alergia pulmonar y aporta al conocimiento de esta regulación al receptor CCR9 para estudios más específicos acerca de esta regulación y su participación en el reclutamiento a mucosa pulmonar de una o varias poblaciones celulares en el asma.

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es un conjunto de órganos y tejidos linfoides, células y moléculas involucradas en la inmunidad adaptativa o en algunos casos la totalidad de los mecanismos de defensa (1). Para una mejor comprensión de su funcionamiento, se ha dividido al sistema inmunológico en innato y adaptativo. El sistema inmune innato incluye a aquellos mecanismos de reconocimiento de microorganismos a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La presencia de algunos genes que codifican para proteínas con actividad de reconocimiento similar, se ha encontrado tanto en plantas como animales, lo cual sugiere que evolutivamente, la inmunidad innata tiene un origen más antiguo que la división evolutiva de ambos reinos. Los sistemas de reconocimiento innatos (receptores de reconocimiento de patrón) activan mecanismos efectoros como fagocitosis, activación del complemento y secreción de citocinas proinflamatorias. El objetivo de la activación de estos mecanismos es la eliminación del patógeno que amenace la integridad del organismo. Cuando en los organismos vertebrados, estos mecanismos no son capaces de contener la infección, la activación de los mecanismos de defensa del sistema inmune innato conllevan a la activación del sistema inmune adaptativo (2).

El sistema inmune adaptativo involucra el reconocimiento de antígenos mediante receptores cuyos genes se rearreglan durante la ontogenia, (lo cual proporciona una gran variabilidad) y que son expresados por los linfocitos T y B. Otra propiedad que confiere este tipo de inmunidad a los organismos vertebrados, es la generación de memoria inmunológica contra dichos antígenos (2). Actualmente, se han disectado múltiples mecanismos celulares y moleculares que comprenden el reconocimiento de estos microorganismos patógenos y ahora se sabe que el sistema inmune es capaz de distinguir componentes moleculares propios y de esta manera evita la activación en contra de moléculas propias y moléculas inocuas, a través de un mecanismo conocido como tolerancia (3).

La inmunidad innata es responsable de generar procesos perjudiciales: como la inflamación crónica que afecta ciertos órganos lo cual contribuye al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas y que no son mediadas por anticuerpos; sin embargo, la respuesta inmune adaptativa es la responsable también de que se lleven a cabo procesos perjudiciales contra el propio organismo, tales como: enfermedades autoinmunes, el rechazo a transplantes y las alergias y procesos no deseados que favorece el rechazo a transplantes (1).

1. Las alergias

En 1906, Clemens von Porquet, acuñó por primera vez el término “alergia” para relacionarlo a aquellos individuos que poseían predisposición a desarrollar reacciones de hipersensibilidad a ciertas sustancias que generalmente son inocuas para la mayoría de las personas. Posteriormente, en 1963, Gell y Coombs, utilizaron el término “hipersensibilidad” elaborar una clasificación de estas reacciones de acuerdo al tipo de elementos inmunológicos que intervienen en ellas (4) .

De acuerdo a esta clasificación, existen 4 tipos de hipersensibilidad y se les asignó el tipo de acuerdo al mecanismo efector que las genera. La alergia o reacción de hipersensibilidad de tipo I, es una manifestación clínica de una respuesta inmune hacia moléculas de naturaleza proteica que se conocen con el nombre de alérgenos. Esta respuesta es mediada por la inmunoglobulina E (IgE) (5) .

Las reacciones de alergia consisten en una serie de eventos que comienzan con el reconocimiento de la estructura nativa del alérgeno por células dendríticas residentes en la vía de entrada del alérgeno e inducen la producción de IgE alérgeno-específicas. Estas IgE se unen a sus receptores FcεRI que se encuentran expresados en la superficie de las células cebadas, esta interacción culmina en la activación de las células cebadas (6) .

Las reacciones de hipersensibilidad son consecuencia de una desregulación en un proceso que originalmente fue diseñado para prevenir que los parásitos colonizaran las mucosas (7) y esta desregulación afecta la homeostasis de las mucosas, lo que desencadena una activación exacerbada de la respuesta inmune hacia moléculas inocuas. Dentro de las consecuencias de esta activación, no únicamente se encuentra la degranulación de las células cebadas e incremento de la permeabilidad vascular; además, una constante exposición con el alérgeno tiene como consecuencia la hiperplasia de las células caliciformes (productoras de moco), síntesis de mucinas con mayor viscosidad e incremento de los movimientos peristálticos (en el caso de la mucosa intestinal) y una activación del epitelio que se encarga de la producción de citocinas y quimiocinas que favorecen la activación celular y en el caso de la IL-13, la sobreproducción de moco ya que tal como ocurre en mucosa intestinal, en la mucosa pulmonar, se lleva a cabo el incremento en la producción de moco, por lo que las reacciones de hipersensibilidad más comunes que afectan a la mucosa pulmonar son rinitis y asma alérgica (5).

1. ASMA ALÉRGICA. GENERALIDADES

El asma es una de los padecimientos inflamatorios crónicos mas comunes que afecta tanto a niños como adultos en todo el mundo. Este padecimiento afecta las vías respiratorias de individuos susceptibles. La Iniciativa Global para el Manejo del Asma (GINA), es un programa creado desde 1993 mediante una colaboración de el Instituto Nacional de Corazón, pulmón y sangre, Institutos Nacionales de la Salud y la Organización Mundial del la Salud en EUA, como un esfuerzo para alertar a las autoridades médicas, trabajadores para el cuidado de la salud y publico en general, que existe una tendencia al incremento del asma (5). Este organismo define al asma como: *“Un padecimiento crónico inflamatorio de vías aéreas en donde participan algunos elementos celulares y moleculares. La inflamación crónica en el asma se encuentra asociada a la hiperreactividad bronquial que da lugar a episodios recurrentes de sibilancias, dificultad para respirar y tos, particularmente por la noche o en la mañana. Estos episodios se encuentran asociados a una obstrucción variable del flujo de aire que puede ser reversible espontáneamente o con tratamiento”* (8)• .

Se estima que existen 300 millones de personas afectadas en todo el mundo por este padecimiento (9)• ; sin embargo, existe la problemática que no hay una definición precisa y aceptada mundialmente que establezca una comparación en prevalencias reportadas en diferentes partes del mundo. A pesar de esto, se estima que la prevalencia del asma se encuentra entre el 1% y el 18% de la población en diferentes países, con una tendencia a disminuir en América del Norte y Europa y un incremento en la prevalencia en regiones en donde anteriormente ésta era baja, tal es el caso de los países en vías de desarrollo (9)• .

Otra cifra importante dice que en el año 2005, se registraron 250 000 muertes a causa del asma (5), sin embargo, estas cifras no correlacionan con la prevalencia. El costo económico es alto; directamente por las admisiones hospitalarias recurrentes y por el costo de los medicamentos e indirectamente por el ausentismo laboral, por lo cual, es considerado uno de los principales problemas de salud en algunos países (9)• .

En un intento por clasificar al asma de acuerdo a sus manifestaciones clínicas, se ha dividido al padecimiento en asma intrínseca y extrínseca. En el asma intrínseca los síntomas generalmente ocurren en ausencia de un alérgeno. Algunos factores que la desencadenan son estados emocionales extremos o el contacto con algunos agentes químicos como el tabaco, la aspirina, ejercicio, algunos productos químicos o la presencia de infecciones virales que afecten a la mucosa pulmonar. El asma intrínseca generalmente es desencadenada por una infección respiratoria, aunque se ha sugerido que los pacientes con asma intrínseca pudieran ser alérgicos a una sustancia no detectada durante el diagnóstico; sin embargo no se ha encontrado evidencia serológica de alergia mediada por IgE hacia

alergenos ambientales comunes; se ha dicha producción pudiera ser local. De manera similar al asma atópica, las biopsias bronquiales de estos pacientes muestran expresión aumentada de citocinas tipo Th2 y quimiocinas de manera similar a lo que ocurre en el asma atópica; sin embargo se ha observado un mayor número de macrófagos (10) .

El asma atópica es inducida por sustancias conocidas como alergenos. Comúnmente se observa en niños, sin embargo, en muchos casos, los síntomas continúan hasta la edad adulta. En la mayoría de los casos, existen antecedentes familiares con atopia. Los síntomas de esta forma incluyen tos, sibilancias, opresión en el pecho. No existe un tratamiento que cure este padecimiento, sin embargo, los síntomas pueden ser controlados con tratamientos inmunosupresores y con broncodilatadores. Es caracterizada por un infiltrado de eosinófilos y linfocitos Th2 en la mucosa pulmonar y los pacientes son generalmente de menor edad que los pacientes con asma intrínseca (10) .

2. DESARROLLO DEL ASMA ALÉRGICA

FACTORES.

a) Predisposición genética

Se considera que las alergias son padecimientos favorecidos por una predisposición genética pero que se ha sugerido que existe interacción de los factores genéticos con factores ambientales y en el caso del asma, interacción también con el desarrollo de los síntomas clínicos que se presentan en piel o en tejidos como mucosa nasal o pulmonar .

En muchos estudios genéticos se ha demostrado que el asma alérgica y otras alergias tienen un componente hereditario muy importante. Algunos estudios han proporcionado evidencias mediante la falta de transmisión genética en gemelos monocigóticos y la falta de segregación genética de la enfermedad en familias con clara susceptibilidad (11,12) .

El primer indicio que restableció de una relación entre la atopia con predisposición genética fue con el cromosoma 11q13 (13) . En esta región cromosómica se encuentran los genes que codifican para la subunidad β del receptor de alta afinidad Fc ϵ RI y las proteína Htm4 involucrada en el ciclo celular y expresada mayoritariamente por basófilos. Estos estudios se comenzaron a mediados de la década de 1980. A partir de ellos, se han identificado varias regiones cromosómicas. De las más evidentes han sido las regiones 5q23-31, 5p15 y 12q14-24.2 en donde se encuentran genes como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12b, IL-13, IFN- γ , iNOS, FC ϵ RI β etc, (14) . Estos genes se han identificado mediante estrategias de búsqueda de genes candidatos y a través la identificación de múltiples polimorfismos. De

acuerdo a la identificación de estos genes, se han clasificado de con base en la función en la que participan. Como se muestra en la figura 1, existen 4 grupos de genes en donde se encuentran moléculas importantes que participan en la interacción del individuo con el medio ambiente, algunos de ellos son componentes de la inmunidad innata y se han identificado como polimorfismos que alteran el riesgo de desarrollo de alergias. Algunos genes se expresan únicamente en el epitelio bronquial y están relacionados con las funciones de barreras de esta mucosa. Otro grupo es de genes involucrados en la polarización de respuesta Th1/Th2 y que regulan la función efectora como IL13, IL4RA, y STAT6; TBX2, etc. y de proteínas que regulan la eosinofilia como L1RL1, IL33, MYB, y WDR36 (15) .

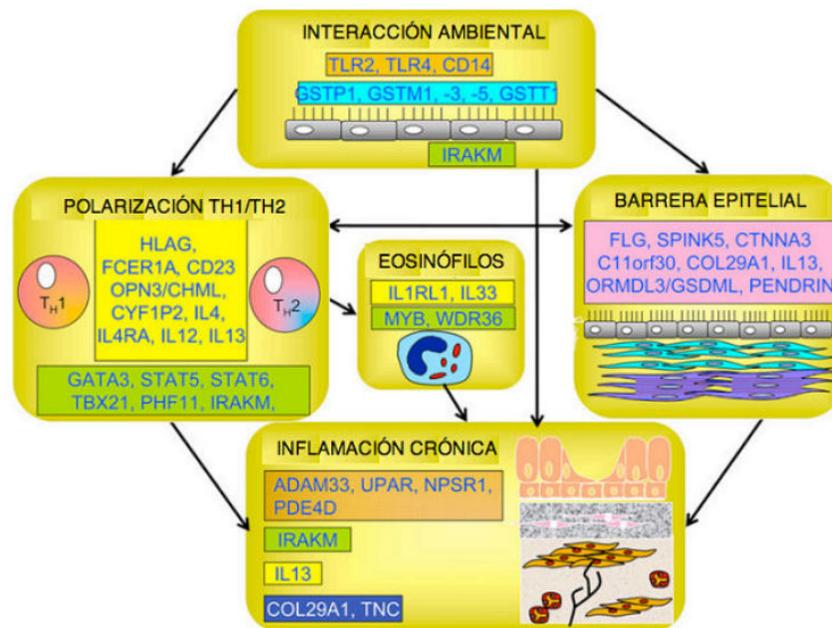


FIGURA 1. Grupos de genes relacionados con la susceptibilidad a desarrollar asma alérgica. Modificado de Holloway, J. et al. 2010 (14). •

b) Exposición a alérgenos.

Los alérgenos son antígenos inductores de las reacciones alérgicas; de naturaleza glicoproteica. Además de la capacidad intrínseca que poseen estas proteínas como moléculas inmunogénicas, algunas poseen actividad de proteasas. Estas proteínas son inductoras de una respuesta humoral mediada por inmunoglobulina tipo E (IgE) y son inocuas en individuos sanos, sin embargo, se les ha atribuido la propiedad como inductoras de alergia por la actividad de proteasa que poseen y que les confiere la capacidad

alergénica en individuos susceptibles (16)• . Tal es el caso del alérgeno prototipo *Dermatophagoides pteronyssinus 1* (Der p 1) proveniente de las especies de ácaros domésticos *D. pteronyssinus*. Esta proteína de la capacidad intrínseca que posee como molécula proteica a activar una respuesta inmune, esta molécula tiene actividad de cisteín-proteasa. Esta proteína se encuentra en partículas del desecho de ácaros y debido al tamaño de estos desechos particulados (10-20 µm) puede ser inhalados. La actividad proteolítica de Der p 1 puede ser optimizada en los humanos debido a el pH óptimo en mucosa pulmonar y estabilidad y/o susceptibilidad a su inactivación por anticuerpos (17)• . La cantidad de este alérgeno en el tejido pulmonar puede ser la óptima debido a la cronicidad en la exposición de los seres humanos al polvo. La activación de la proteasas depende de la presencia de la triada catalítica que contiene a los aminoácidos Cys34, His170 y Asn190 responsables de la activación de la proteasa. El alérgeno de polen de pasto *Phleum pratense 1* (Phl p 1) también tiene actividad de cisteín-proteasa y es homóloga a las proteasas de la familia de la papaína. Sin embargo, mediante comparación de secuencias se ha sugerido que existen motivos estructurales en este y otros alérgenos que no tiene actividad de proteasa y que favorecen sitios de reconocimiento para células del sistema inmune innato. Otra característica importante que se ha encontrado en el estudio de las propiedades estructurales de los alérgenos, es el patrón de glicosilación que puede activar al receptor de manosa presente en las células dendríticas o en el caso de la molécula Ara 1, que en ausencia de glicosilación, es incapaz de inducir activación de monocitos humanos o producción de IL-4 e IL-13 mediada por el receptor DC-SIGN en células dendríticas (17)• .

3. MECANISMOS DEL ASMA ALÉRGICA

Después de mencionar los principales factores que se han relacionado con el desarrollo del asma alérgica, se describirán brevemente los procesos que contribuyen al síndrome del asma alérgica.

a) Hiperreactividad bronquial

La hiperreactividad bronquial se define como un proceso de contracción del músculo liso de la mucosa bronquial. La hiperreactividad puede ser clínicamente inducida para diagnosticar el padecimiento. Generalmente se utilizan compuestos agonistas como la histamina o la metacolina. La hiperreactividad que se cuantifica es aquella cantidad mínima de agonista para lograr una reducción de 20% en el volumen expiratorio forzado. A pesar de que la hiperreactividad bronquial ocurre en la mayoría de los pacientes con asma, también es un síntoma de enfermedad pulmonar obstructiva crónica; sin embargo es el síntoma clave que

define a la inflamación alérgica pulmonar como asma (8)• . En los modelos animales de alergia pulmonar, esta hiperreactividad es un componente muy importante que determina si el proceso alérgico es similar al asma en humanos y es evaluado como una medida directa de la inflamación.

b) Sobreproducción de moco.

El moco es una sustancia viscosa que normalmente funciona como una barrera mecánica, por lo tanto, su función en las mucosas es la de mantener un nivel óptimo de hidratación en el tejido y de retener partículas inertes, bacterias y virus. El moco tiene propiedades antioxidantes y almacena moléculas con actividad de proteasa y antimicrobianas. En las mucosas como la pulmonar o la gastrointestinal, existe una producción basal de moco y los procesos mecánicos para remover este moco son propiedades de la inmunidad innata de las mucosas. Su principal componente son las mucinas (18)• , éstas son glicoproteínas con residuos de serina y treonina repetidos en tandem que comúnmente son glicosilados. La expresión de estas proteínas está regulada por genes llamados MUCs. En las vías aéreas se expresan los genes *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC7*, *MUC8*, *MUC11*, *MUC13*, *MUC15*, *MUC19*, y *MUC20.2*. Las proteínas que mayoritariamente componen el gel son *MUC5AC*, *MUC5B*. Estos genes son regulados por algunas citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β . Además de la contracción del músculo liso, la sobreproducción de moco y la incapacidad de la mucosa bronquial de expulsarlo genera la obstrucción de las vías aéreas que es una consecuencia grave en los pacientes asmáticos (19)• .

c) Remodelación de las vías aéreas.

La inflamación crónica que se lleva a cabo en el asma, tiene como consecuencia una serie de cambios estructurales en las vías aéreas de los pacientes asmáticos. Estos cambios estructurales son: hiperplasia e hipertrofia de las células epiteliales, fibrosis subepitelial, incremento en la masa de músculo liso, hiperplasia de la glándula mucoprodutora y de las células caliciformes, formación de vasos sanguíneos y edema en las vías aéreas (18)• . Estos cambios son producidos como un mecanismo de reparación inducido por la inflamación constante en la mucosa pulmonar. Los mecanismos que inducen a cada uno de estos cambios son complejos y son regulados principalmente por mediadores proinflamatorios, factores de crecimiento y algunas moléculas como enzimas y factores proangiogénicos. Estas moléculas tienen un efecto directo sobre las células que componen las vías aéreas y éstas a su vez favorecen el reclutamiento de otras células proinflamatorias. El edema, hipersecreción de moco, el engrosamiento de la membrana basal y la contracción

del músculo liso contribuyen en gran medida al estrechamiento de las vías aéreas y consecuente resistencia al flujo expiratorio del aire en los pacientes asmáticos.

d) Inflamación.

Las citocinas liberadas al momento de la degranulación de las células cebadas pueden tener efectos como el reclutamiento de eosinófilos a partir de progenitores de médula ósea y el incremento de su sobrevivencia (20). Asimismo, mantienen la producción de IgE por las células plasmáticas y en la inducción de la expresión de VCAM-1 por las células endoteliales. Las citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 aseguran que el ciclo de inflamación persista (21). Las citocinas y quimiocinas que se producen localmente por las células endoteliales o epiteliales, estimulan el reclutamiento de ciertos grupos celulares, tales como: linfocitos T, macrófagos alveolares, células cebadas, células iNKT y eosinófilos principalmente. A continuación se describe cada uno de estos tipos celulares y su contribución al proceso inflamatorio en el asma.

Linfocitos T. A ellos se les atribuye en gran medida las características de inflamación y median la actividad de otras células a través de la secreción de citocinas del perfil Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13 (22). Aunque es importante que las células dendríticas residentes de pulmón, migren a los ganglios linfáticos mediastinales activadas por el antígeno, se ha demostrado que existe una constante migración basal de vigilancia hacia el tejido pulmonar de linfocitos T. También se ha sugerido que los linfocitos T residentes de la mucosa pulmonar pueden ser activados *in situ* (23).

Macrófagos alveolares. Los macrófagos son células distribuidas en diferentes tejidos en donde tienen distintas funciones como: regular homeostasis, remodelación tisular, defensa del hospedero y eliminación de materiales particulados. En tejido pulmonar, los macrófagos alveolares eliminan las partículas que por su tamaño sean capaces de llegar al espacio alveolar y que forman parte de aquellas con las que constantemente hay contacto en la vía aérea. Para eliminar un daño colateral a antígenos inocuos, se encuentran en estado quiescente produciendo baja cantidad de citocinas inflamatorias aunque con alta capacidad fagocítica. Experimentos *in vitro* han demostrado que los macrófagos alveolares suprimen la activación de los linfocitos T mediante la secreción de prostaglandinas, IL-10 y TGF- β (24).

Células cebadas. Las células cebadas salen de médula ósea como células mononucleares CD34+ y Fc ϵ RI+. Viajan 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. La activación es dependiente de IgE y mediada a través de la transducción de señales iniciada por las cinasas de la familia Src, Lyn, Syk y Fyn (25). Los mediadores preformados en sus

gránulos se pueden clasificar en dos categorías: los preformados como la histamina, proteoglicanos y proteasas neutras y algunas citocinas como TNF- α y los mediadores recién sintetizados después de la activación entre los cuales hay numerosas quimiocinas, mediadores lipídicos y factores de crecimiento y angiogénicos, que participan en la activación de la respuesta alérgica, pues tienen efecto directo sobre los vasos, las células epiteliales y el reclutamiento de células proinflamatorias (6).

Células iNKT. Estas células son una subpoblación de células NKT que poseen características de células NK y de linfocito T, además de que pueden expresar los correceptores CD4 y/o CD8 o ninguno. Algunas de estas células expresan un repertorio de receptores TCR altamente conservado, V α 14-J α 18 (ratón) y V α 14-J α 18 (humano) y se conocen como NKT invariante (iNKT). Esto permite que las células 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 tanto TH1 como 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 (26).

Eosinófilos. Los eosinófilos son leucocitos se encuentran estrechamente relacionados con el desarrollo de procesos inflamatorios como son las infecciones parasitarias y las alergias (27). Estas células provienen de un precursor pluripotencial que se desarrolla en la médula ósea y que tiene la capacidad de diferenciarse hacia el linaje eosinófilico mediante la regulación concertada de los factores de transcripción: STAT-1, PU-1 y C/EBP. El microambiente de citocinas es determinante para las decisiones de linaje hematopoyético en médula ósea. Se han descrito las citocinas que participan de manera importante en la diferenciación de eosinófilos son la IL-3, IL -5 y GM-CSF (28,29). IL-5 es una citocina que se encuentra íntimamente relacionada con la diferenciación terminal de los eosinófilos, favorece su salida de médula ósea y que junto con la quimiocina CCL11 (eotaxina-1) induce su migración hacia los tejidos (23) y posterior activación. La IL-5 es producida por linfocitos Th2 y en pocas cantidades por eosinófilos y mastocitos. Se ha encontrado expresión de IL-5 en varios tejidos como piel, vías aéreas, vejiga, corazón y mucosa intestinal. En algunos modelos de inflamación alérgica pulmonar se ha demostrado que existe una disminución en la acumulación de eosinófilos y la hiperreactividad mediante el bloqueo de IL-5 con anticuerpos neutralizantes durante las reacciones inflamatorias alérgicas (30). Los eosinófilos contienen gránulos intracelulares en los cuales se encuentran almacenadas, entre otras moléculas, las enzimas: Peroxidasa de eosinófilos (EPO), la proteína básica principal (MBP), la proteína catiónica de eosinófilos (ECP) y la neurotoxina derivada de eosinófilos. Estas enzimas tienen efectos tóxicos para los tejidos de corazón, pulmón y

células epiteliales de la mucosa pulmonar, modifican las respuestas de contracción del músculo liso y son capaces de promover estrés oxidativo. En los gránulos también se almacenan citocinas preformadas . La ECP tiene actividades adicionales no tóxicas como supresión de la proliferación de linfocitos T y síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos B, inducción de la degranulación de los mastocitos y estimulación de la secreción de moco y producción de glicosaminoglicanos en fibroblastos. La MBP altera directamente la contracción del músculo liso e inducción de la degranulación de basófilos y células cebadas (30)• . Una vez diferenciados, pueden ingresar a la circulación sistémica y migrar de manera homeostática hacia intestino, útero y pulmón en bajas cantidades. Sin embargo, durante una respuesta alérgica, éstas células son reclutadas hacia pulmón ya que expresan receptores para quimiocinas de la familia CC, como CCL3, CCL5 , CCL11, CCL24 y CCL26 aunque ninguna de estas es específica para eosinófilos (31)• y que son producidas en su mayor cantidad por las células epiteliales activadas (32)• . Posterior a la migración hacia pulmón, lo eosinófilos participan en múltiples funciones incluyendo: presentación de antígeno, producción de citocinas y quimiocinas y degranulación y liberación de mediadores preformados.

4. QUIMIOTAXIS, TRÁFICO LEUCOCITARIO Y SU RELACIÓN CON LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR

Cada tejido se encarga de la secreción de ciertas sustancias quimioatrayentes para las células del sistema inmune. Este mensaje de movilidad está determinado por la expresión de un perfil de moléculas quimioatrayentes específico. Estas moléculas incluyen: mediadores lipídicos inflamatorios (prostaglandinas y leucotrienos), antimicrobianos (quimerina, defensina) citocinas, derivados microbianos (fMet-Leu-Phe), proteínas derivadas del complemento (c3a, c5a) y quimiocinas (33)• .

Las quimiocinas son péptidos de 8-10 kDa. Actualmente, se han identificado 50 péptidos y 20 receptores. Las quimiocinas se dividen en 4 subfamilias (familia CC, familia CXC, familia CX3C y familia XC) y son reconocidas por receptores acoplados a proteínas G principalmente del tipo G α i. En algunos casos, la interacción receptor-quimiocina son exclusivos de un solo ligando, para otros receptores de quimiocinas, su activación puede ser mediada por más de una quimiocina y de la misma manera, algunas quimiocinas pueden interactuar con más de un receptor (34)• . La expresión de las quimiocinas, especialmente durante la inflamación, se regula mediante transcripción inducible (generalmente por activación de receptores de citocinas), traducción, secreción y recambio. En el caso de las quimiocinas CXCL16 y CX3CL1, que son expresadas como componentes

transmembranales y que son escindidas por metaloproteasas. Estas quimiocinas también funcionan como moléculas de adhesión.

La principal función que se ha descrito de las quimiocinas es conferida por su capacidad quimioatrayente. Inicialmente, participan en el proceso de arresto celular durante la extravasación y se encargan de mediar la agregación y la activación de las integrinas, lo cual da lugar a interacciones de alta afinidad y avidéz con sus ligandos expresados por el endotelio; sin embargo, regulan procesos como : angiogénesis, diferenciación Th1/Th2, organogénesis, sobrevivencia celular, apoptosis, metástasis y recientemente se les ha descrito una función antimicrobiana (35)• .

Las quimiocinas se clasifican de acuerdo a la homología estructural que existe en el extremo N-terminal. La familia **CXC** contiene a las quimiocinas que tienen tres aminoácidos entre el extremo N-terminal y la primera cisteína (Glu-Leu-Arg) conocidas como ELR-quimiocinas y además existe un aminoácido de separación entre las dos cisteínas conservadas. 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 además son inhibitoras de la angiogénesis (36)• . La familia **CC** contiene quimiocinas en donde en su extremo N-terminal, se encuentran dos cisteínas adyacentes. A las quimiocinas de la familia CC 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 (37)• . Durante la inflamación alérgica pulmonar, algunas quimiocinas de esta familia inducen la degranulación de eosinófilos y basófilos y proliferación de músculo liso. En la estructura de las quimiocinas de la familia **XC**, sólo existe una cisteína en el extremo N-terminal. Las quimiocinas de la familia XC 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 **CX3C** es representada por un único miembro, la quimiocina fractalcina. Contiene varias regiones, un dominio tipo quimiocina, una región tipo mucina y que le permite expresarse transmembranalmente con repeticiones serina-treonina y muchos polisacáridos laterales (38)• .

5. RELACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES CON LA ALERGIA PULMONAR

La sobreexpresión de algunas quimiocinas se relaciona con la progresión de múltiples procesos inflamatorios. En el caso de la inflamación alérgica pulmonar, la quimiocina CCL11 (eotaxina-1) es producida por las células epiteliales en respuesta a la estimulación con IFN- γ e IL-4 e IL-13 principalmente y funciona de manera sinérgica con IL-5 para inducir el reclutamiento de eosinófilos hacia pulmón. Esta quimiocina regula los niveles homeostáticos de eosinófilos en tracto gastrointestinal y regula también la hematopoyesis. La quimiocina CCL24 (eotaxina-2) también es reconocida por el receptor CCR3 expresado de mayoritariamente en eosinófilos y linfocitos TH2. Esta quimiocina también actúa en conjunto con la citocina IL-5 para inducir la eosinofilia en pulmón y la producción de IL-13. CCL26 (eotaxina-3) se induce en mucosa bronquial en etapas tardías de la alergia y mantiene el reclutamiento sostenido de eosinófilos (39)• . CCL13 (MCP-1) es una quimiocina secretada principalmente por células del epitelio pulmonar, es inducida a través de citocinas proinflamatorias y ejerce actividad quimioatrayente y de activación en macrófagos, eosinófilos y linfocitos TH2. Se han encontrado algunos polimorfismos específicos en genes codificantes para las quimiocinas del grupo de las *eotaxinas* y se han asociado con números elevados de eosinófilos en pacientes asmáticos. Algunos receptores de quimiocinas pueden ser expresados en los linfocitos TH2 como CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5 y esta expresión es un mecanismo por el cual diferentes subtipos migran hacia pulmón. Estos linfocitos migran preferencialmente en respuesta a las quimiocinas CCL11, CCL22, CCL17 y CCL1. La quimiocina CCL11 puede ser reconocida por CCR3, mientras que CCL17 y CCL22 pueden interactuar con CCR4. CCR1 también es expresado por eosinófilos en bajos niveles (40)• . El receptor CCR4 es importante para inducir la migración de linfocitos Th2 hacia pulmón. Los ligandos, CCL17 y CCL22, sin embargo, no se ha demostrado que en ausencia de este receptor no se desarrolle la inflamación alérgica pulmonar; sin embargo, la participación de este receptor y sus ligandos es importante para la modulación indirecta del reclutamiento de eosinófilos a través de los linfocitos tipo TH2 (40)• .

Otro receptor que se ha involucrado de manera importante con la inflamación pulmonar es el receptor CCR1. Hasta ahora se ha descrito claramente que su único ligando es la quimiocina CCL8. La expresión de esta quimiocina se encuentra aumentada en algunos modelos experimentales y se sugiere que tiene un papel en el reclutamiento de eosinófilos y es dispensable para el reclutamiento de linfocitos TH2 (41)• .

5.1 Regulación temporal en la expresión de quimiocinas durante la alergia pulmonar.

Los eosinófilos son células protagonistas en el desarrollo de la inflamación alérgica pulmonar; sin embargo, existen otras células con participación importante tanto durante el inicio como en la amplificación de la respuesta inflamatoria. Se han caracterizado a las quimiocinas que participan en el reclutamiento de diferentes grupo celulares; sin embargo, aunque en los pacientes es difícil definir claramente las etapas de la inflamación, es importante conocer que existe una regulación temporal en la expresión de diferentes quimiocinas (42). Dentro de estas quimiocinas se encuentran CCL5, CCL11 y CCL12, que inducen migración in vitro e in vivo de eosinófilos, son factores quimioatrayentes para linfocitos T (CCL5, CCL11) y monocitos (CCL12) y se ha demostrado, que la inducción en la expresión y disminución correlaciona con los distintos tipos celulares que se reclutan hacia la mucosa pulmonar, posterior al contacto con el alérgeno. (43).

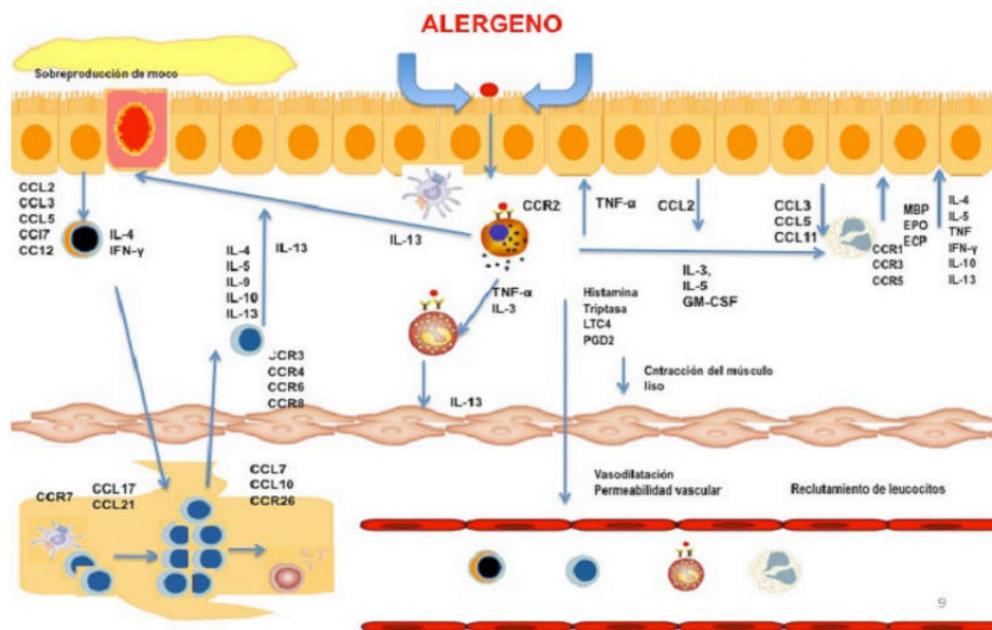


FIGURA 2. Esquema de la regulación en el microambiente proinflamatorio durante la inflamación alérgica pulmonar. Se esquematiza la regulación en la expresión de mediadores proinflamatorios por los diferentes grupos celulares que participan en la inflamación durante la fase aguda, que ocurre dentro de los primeros minutos hasta horas después del estímulo alérgico y es modulada por los 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. Esto induce la liberación de mediadores preformados y la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico sintetizados que son espasmógenos y vasoactivos, tales como: Histamina, leucotrienos C4,D4, E4, prostaglandina D2 y enzimas

recién sintetizadas (triptasa, quimasa y carboxipeptidasa) y que 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. Posteriormente, se induce un infiltrado inflamatorio de células mononucleares y eosinófilos. En esta fase crónica han pasado varias horas después del contacto con el alérgeno y aquí está involucrado el reclutamiento de linfocitos T_H2.

6. EL RECEPTOR DE QUIMIOKINAS CCR9

CCR9 es un receptor de quimiocinas perteneciente a la familia CC que se caracterizó originalmente durante los experimentos en donde se buscaba analizar a los receptores de quimiocinas que participan durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo. En un inicio, fue llamado GPR-9-6 y su expresión se encontró restringida únicamente a timo. Su ligando único, la quimiocina CCL25 (TECK por *Thymus Expressed Chemokine*), es expresada por las células dendríticas en la médula del timo. CCL25 es expresado también por las células estromales y dendríticas en el timo y en intestino delgado por las células epiteliales y dendríticas, por lo que, a este receptor, también se le atribuye una función muy importante durante el reclutamiento homeostático de células hacia intestino delgado. Las subpoblaciones que responden de manera quimiotáctica ante el estímulo con CCL25 son: timocitos CD4⁺ CD8⁺ dobles positivos y los timocitos CD4⁺ y CD8⁺ simples positivos (44)• (45) .

CCR9 se encuentra codificado por un gen único en el cromosoma 3. Las modificaciones post-traduccionales que tanto CCR9 como otros receptores de quimiocina puede tener, se realizan en los residuos ácidos cercanos al extremo N-terminal. En este receptor se ha identificado un sitio blanco de N-glicosilación en la región N-terminal (Asn32). Asimismo, existen cisteínas conservadas en las regiones intracelulares 1 (Cys119) y 2 (Cys198). Además, contiene un residuo de cisteína en el extremo carboxilo terminal que puede ser palmitoilado. Se conocen dos isoformas productos de procesamiento alternativo del ARN de CCR9. La isoforma CCR9A contiene 12 aminoácidos adicionales en su extremo amino terminal en comparación a CCR9B. Otra diferencia que existe entre ambas isoformas del receptor es la cantidad de ligando necesaria para su activación. Para activar a CCR9A, se requiere una menor concentración de CCL25. En linfocitos T, la expresión de ambas isoformas se mantiene en una proporción de 10:1 (CCR9A :CCR9B) (46)• .

Para una mejor comprensión acerca del papel de este receptor en la regulación de los procesos homeostáticos e inflamatorios, se ha generado un ratón deficiente de CCR9. El ratón *knockout* para CCR9 (deficiente) es viable, fértil y sin anomalías morfológicas aparentes (47)• .

No se han reportado diferencias en la expresión de otros receptores de quimiocinas que sugieran eventos compensatorios. A pesar de que se ha demostrado una participación importante de CCR9 en el desarrollo de los linfocitos T en el timo, en el ratón deficiente de CCR9 no hay diferencias ni el número en las subpoblaciones de timocitos y recientemente se ha sugerido que esto pudiera ser por una cooperación de CCR9 con el receptor CCR7, el cual pudiera compensar la ausencia de CCR9 (48) .

En cuanto al porcentaje de los linfocitos $T\gamma\delta$, es dos o tres veces mayor en el ratón CCR9 $-/-$ que en el ratón CCR9 $+/+$. En la mucosa intestinal, existe una disminución en 2 veces del número de linfocitos T intraepiteliales del ratón CCR9 $-/-$ y el número de linfocitos $T\gamma\delta$ es 5 veces menos en el genotipo CCR9 $-/-$. También se ha estudiado detalladamente la participación de CCR9 en el desarrollo linfocitario, se sabe que la ausencia de CCR9, limita temporalmente el desarrollo de linfocitos T durante el desarrollo, sin embargo, no es indispensable para este efecto y en el desarrollo embrionario, las diferencias en celularidad que se han determinado pueden ser compensados en el día 20 de gestación. Este fenómeno también se observa en los linfocitos B en médula ósea y esto se manifiesta en la disminución de células pre-proB ante la ausencia del receptor (47) .

II. ANTECEDENTES

Actualmente no se existen evidencias experimentales que impliquen al receptor CCR9 en la regulación del proceso inflamatorio durante la alergia pulmonar. Como se mencionó en la introducción, la función descrita de manera más detallada de este receptor de quimiocinas, es su participación durante la ontogenia de los linfocitos T en el timo ya que es expresado durante la transición de timocitos DN4 (dobles negativos) a DP (dobles positivos) y esta expresión se relaciona con la expresión constitutiva de su ligando único el estroma tímico (49)• .

En la periferia, CCR9 participa como regulador de la homeostasis intestinal, favoreciendo el reclutamiento de los linfocitos hacia intestino delgado (50)• ; sin embargo aún no se describe el papel que este receptor tiene como regulador en la inmunidad de mucosas pulmonar (51)• .

Por otro lado, Las células iNKT participan de manera importante en el asma alérgica; aunque no se ha identificado cómo regulan el microambiente en pulmón ya que son capaces de secretar IL-4 e IFN- γ . Se ha encontrado una sobreexpresión de CCR9 en células iNKT de pacientes con asma alérgica, y aunque se ha reportado que CCL25 no se expresa de manera constitutiva en pulmón, si se ha demostrado sobreexpresión en mucosa bronquial de pacientes asmáticos (52)• .

El microambiente de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en pulmón es crucial en el desarrollo de la enfermedad. Se ha relacionado a la citocina IL-4 con el progreso del asma alérgica, porque esta citocina tiene capacidad de favorecer el incremento en la expresión de CCR9 en linfocitos T CD4 (53)• ; sin embargo aún no se ha explorado esta inducción en otros tipos celulares que participan durante la inflamación alérgica pulmonar.

En el caso de los eosinófilos, se ha descrito que existen un incremento en la expresión de CCR9 en eosinófilos de lavados broncoalveolares en pacientes alérgicos después de un reto alérgico (54)• . Además, se ha reportado que en líneas celulares de eosinófilos, éstos son capaces de migrar hacia CCL25 previo un estímulo pronflamatorio (55)• .

Además de todo lo anterior, existe un antecedente preliminar en nuestro grupo de investigación, en donde se sugiere que en un modelo experimental de alergia pulmonar en ratones deficientes de CCR9, existe menor número de eosinófilos en los lavados broncoalveolares comparado con el número de eosinófilos en ratones silvestres. Esto podría establecer una relación en el incremento de CCR9 para favorecer el reclutamiento de esta población celular hacia el pulmón en condiciones de inflamación (56)• .

II. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma alérgica es un padecimiento crónico inflamatorio que se ha convertido en un problema mundial, afectando a 300 millones de personas aproximadamente durante la última década. Se estima una prevalencia mundial de la enfermedad de entre 1 y 18% (9). En México se estima que más de 10 millones de personas se encuentran afectadas por este padecimiento y cerca del 50% son menores de 15 años. La prevalencia en México corresponde entre 10-15% y cada año mueren alrededor de 4000 personas a causa de esta enfermedad (57). A pesar de que no es una de las enfermedades consideradas como de alta mortalidad, se estima que el padecimiento consume cerca del 15% del ingreso económico en las familias afectadas y debido a que se han alcanzado proporciones epidémicas, se ha incrementado el interés en el tratamiento de la enfermedad y en el estudio de los mecanismos moleculares que están involucrados en la progresión del proceso inflamatorio.

El asma involucra una serie de células que son muy características del padecimiento, como eosinófilos y linfocitos T_H2 principalmente y asimismo de múltiples mediadores proinflamatorios que resultan en cambios fisiológicos importantes.

Debido a que actualmente no se ha estudiado en un modelo *in vivo*, el papel regulador del receptor de quimiocinas CCR9 en el proceso inflamatorio alérgico, es necesario analizar la respuesta inflamatoria inducida en modelos animales que proporcionen evidencia sobre la participación de CCR9 en la inflamación alérgica pulmonar.

IV. HIPÓTESIS

La hipótesis que deseamos poner a prueba en este trabajo es que, debido a que durante el proceso inflamatorio alérgico pulmonar, se reclutan a la mucosa pulmonar células que participan como moduladores de la inflamación y que expresan el receptor de quimiocinas CCR9, es posible hipotetizar que al inducir el proceso inflamatorio mediante un modelo experimental de inflamación alérgica pulmonar con ovoalbúmina, será menor el número y distinto el tipo de células inflamatorias reclutadas en el pulmón y por tanto la respuesta inflamatoria en los ratones deficientes de CCR9 (*knock-out* KO) al compararlos con ratones silvestres (*wild-type* WT)

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación del receptor CCR9 en la modulación del proceso inflamatorio en un modelo murino de alergia pulmonar inducida con ovoalbúmina (OVA) mediante la comparación de la respuesta inflamatoria obtenida en ratones silvestres con los deficientes del receptor CCR9.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inducir un proceso inflamatorio alérgico con ovoalbúmina en ratones silvestres y en ratones deficiente de CCR9.
- Cuantificar la respuesta de inmunoglobulinas IgE e IgG1 OVA-específicas en ratones silvestres y en ratones deficiente de CCR9.
- Determinar el número de células en lavados broncoalveolares y caracterizar las poblaciones celulares presentes en tejido pulmonar en ratones silvestres y en ratones deficiente de CCR9.
- Cuantificar la producción de IL-5 en lavados broncoalveolares en ratones silvestres y en ratones deficiente de CCR9.
- Evaluar la expresión de citocinas (IL-5), quimiocinas (CCL11) y los receptores de quimiocinas (CCR3 y CCR9) mediante RT-PCR en tiempo real en ratones silvestres y en ratones deficiente de CCR9.

VII. MÉTODOS

7.1 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES CCR9 (-/-) MEDIANTE PCR.

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

Se obtuvieron las colas de ratones de 4 semanas y se colocaron en un tubo eppendorf; posteriormente se agregaron 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 de la cola. 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 LOS RATONES CCR9 (-/-)

Se utilizó 1 μ L de ADN extraído a partir de la cola. Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2.5 μ L de amortiguador de reacción para la Taq Polimerasa sin MgCl₂, 0.5 de mezcla de nucleótidos, 1 μ L de MgCl₂ 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

Se utilizó un modelo agudo de inflamación alérgica pulmonar inducida con ovoalbúmina. Se utilizaron 4 grupos de ratones hembras C57BL/6 de 8 semanas con genotipo CCR9 (+/+), CCR9 (-/-) para ser inmunizados con OVA y sus respectivos controles de solución salina (SS). Al día **0** del modelo, a los ratones se les administraron 10 μ g de OVA con 10 de hidróxido de aluminio (Alum) como adyuvante en 100 μ L de solución salina como vehículo. Al día **8**, se administraron vía intraperitoneal 10 μ g de OVA por mg Alum en 100 μ L 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 de 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 sacrificaron a los animales, obteniendo lavados broncoalveolares (LBAs), sueros, tejido pulmonar, timo y ganglios para su posterior análisis.

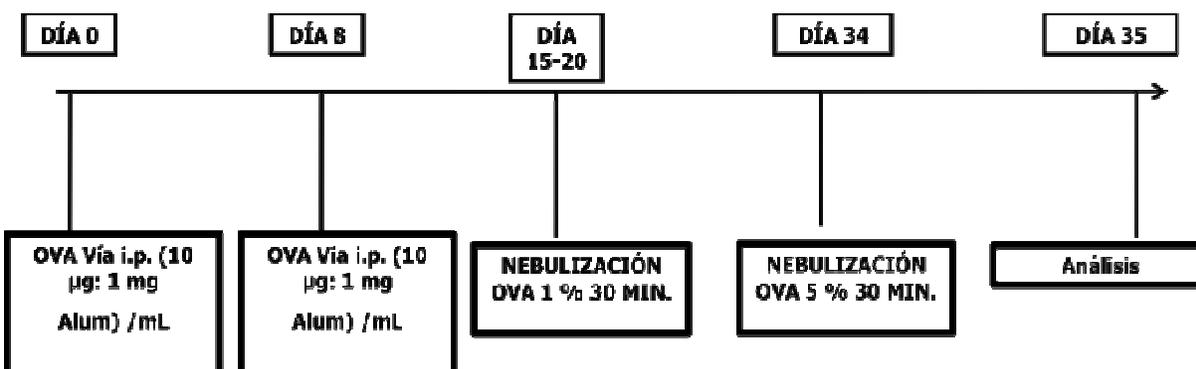


FIGURA 3. Descripción del modelo de inflamación alérgica pulmonar utilizado.

El modelo alergia pulmonar se realizó en ratones C57BL6 de 8 semanas. Se administraron 10 μ g de ovoalbúmina (OVA) en una suspensión con hidróxido de aluminio como adyuvante a cada ratón los días 0 y 8. A partir del día 15 y hasta el día 20, se nebulizó a los ratones con una solución de OVA al 1% en PBS. El reto por nebulización se repitió el día 34 con una solución de OVA al 5% en PBS. Los animales se sacrificaron a las 24 horas del último reto.

7.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ANÁLISIS

Para anestesiarse a los animales, se administraron 70 μ L de la mezcla de xilacina y ketamina (Ver Anexo) por vía intraperitoneal. Se procedió a realizar la punción cardiaca hasta que el ratón se encontró en fase de sedación. La sangre obtenida, se colocó en tubos de 1.5 mL con 10 μ L de EDTA 0.5 M. La sangre obtenida se agitó cuidadosamente por inversión un par de veces. De cada ratón se obtuvieron aproximadamente entre 400 y 800 μ L de sangre.

Para obtener suero, la sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. El suero se almacenó en alícuotas a -70°C . Una vez sacrificado el ratón por exanguinación, se realizó una incisión en la piel a la altura del abdomen y se retiró la piel para exponer la caja torácica y cuidadosamente se localizó y expuso la tráquea. Una vez expuesta, se coloca alrededor de ella un hilo, con extremo cuidado se realizó una incisión pequeña. Posteriormente se introdujo a través de ella una cánula intratraqueal, ésta se inmovilizó con hilo realizando un par de suturas quirúrgicas.

Posteriormente se ajustó a la cánula, una jeringa de 1 mL sin aguja. Mediante esta jeringa, se administraron 900 μ L de PBS (solución salina isotónica) y se recuperó el mismo volumen que se introdujo. Una vez llena la jeringa con el líquido recuperado (lavado broncoalveolar), éste se colocó en tubos cónicos de 15 mL y se colocó a 4°C . Para cuantificar citocinas, inmunoglobulinas u otras proteínas se almacenó el primer mililitro de lavado. Este procedimiento se repitió hasta obtener 4 o 5 mL de lavado broncoalveolar.

Para recuperar todas las células del lavado, el primer mililitro se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Del lavado broncoalveolar se pueden realizar dos alícuotas y se almacenaron a -70°C para el posterior análisis de IgE anti-OVA, IgG1 e IgG2a anti-OVA por ELISA.

Para realizar el conteo diferencial, se obtuvieron 100 μ L para fijar las células con citocentrífuga (Cytofuge), ajustando a 20,000 células en 100 μ L. Los frotis, se tiñeron mediante la técnica de Wright/Giemsa con una solución Diff Quick (Dade Behring) durante 5 minutos.

Para realizar el análisis histoquímico, los tejidos se insuflaron con solución fijadora (etanol absoluto). Se almacenaron a -70°C para ser realizar posteriormente los cortes histológicos y teñir para hematoxilina-eosina (H/E) y ácido peryódico de Schiff (PAS).

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

7.4 ENSAYO DE QUIMIOTAXIS UTILIZADA PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES CCR9 (-/-)

Los timocitos son células que por la expresión constitutiva del receptor CCR9, son capaces de responder a la quimiocina CCL25. Para evaluar la actividad de timocitos procedentes de los ratones utilizados en este modelo, se obtuvieron los timocitos el día del sacrificio y se preparó una curva con las siguientes concentraciones de quimiocina CCL25: 0, 10, 50 y 100ng/mL en HBSS suplementado con BSA 0.05%. Se preparó una membrana de quimiotaxis de poro de 0.5 μm incubándola con fibronectina humana (20 $\mu\text{g/mL}$) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron con PBS antes del ensayo.

Las células se preincubaron con calceína (1 mg/mL) 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 inferior 30 μL de cada una de las concentraciones de quimiocina por triplicado y utilizando como blanco HBSS. En la parte de arriba, se colocaron 50 μL de suspensión celular con 250 000 de timocitos por pozo. Se incubó la cámara durante 2 horas a 37°C con 5% de CO₂.

Al finalizar la incubación, se desarmó la cámara y se lavó la cara superior de la membrana con PBS IX con cuidado de no eliminar las células que migraron 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 DE LOS RATONES CCR9 (+/+) Y CCR9 (-/-)

El conteo total fue realizado en cámara de Neubauer el día de sacrificio de los animales. Para realizar el conteo diferencial, se adhirieron las células a un portaobjetos 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 con tinción de Wright/Giemsa con una solución Diff Quick (Dade Behring) durante 5 minutos.

Se distinguieron macrófagos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Se utilizó cada muestra por duplicado, tomando en cuenta 200 células por laminilla. El conteo fue realizado en un análisis ciego con el objetivo de 40X de un microscopio de luz.

7.6 ANÁLISIS DE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUJO (FACS).

Las células obtenidas de LBA, se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo cóncavo. Posteriormente, se centrifugan a 2500 rpm y se resuspendieron en amortiguador para FACS. Se ajustó en cada pozo el número a un millón de células por mL y se centrifugaron a velocidad máxima a 4°C durante 15 seg. Se lavaron en 150 μ L de amortiguador de FACS y se centrifugaron a velocidad máxima y 4°C. Se resuspendieron en 20 μ L de dilución de anticuerpo anti-CD14/CD16 para evitar la unión de los anticuerpos primarios a los receptores para fracciones Fc, posteriormente se realizó un lavado con 150 μ L de amortiguador para FACS. Se resuspendieron en 20 μ L de dilución de anticuerpos primarios específicos para las moléculas CD4, CD8, CCR3, Gr-1, CD11b, CD11c y se incubaron a 4°C y en la oscuridad durante 20 minutos. Se centrifugaron a 4°C y velocidad máxima durante menos de 1 minuto y se lavaron las células con 150 μ L de amortiguador de FACS. Se centrifugaron de la misma manera y finalmente se resuspendieron en 150 μ L de PBS 1X, con 50 μ L de paraformaldehído al 4% en PBS.

Posteriormente se pasaron las muestras en un FACS Calibur BD y utilizando el software *Cell Quest*. Para realizar el análisis de datos se utilizó el software *FlowJo*. Por cada muestra se analizaron 10,000 células y para realizar el análisis se crearon las regiones que contiene a los linfocitos y a la región de granulocitos-monocitos. Los porcentajes obtenidos se relacionaron con los números totales y los datos se reportan como número de células totales. Las gráficas que se muestran son representativas correspondientes a 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba estadística t de student.

7.7 EXTRACCIÓN DE ARN PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR RT-PCR

El procedimiento se llevó a cabo 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 μL 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 μL 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 μL de H₂O libre de RNAsas y de esta dilución se tomaron 2 μL 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.

Posteriormente se corrieron 2 μL de RNA resuspendido en 8 μL de amortiguador TAE 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 cADN.

Para la síntesis de cADN, se mezclaron: 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 H₂O libre de RNAsas cbp 12 μL y se calentaron a 65°C durante 5 min para desnaturalizar las cadenas de RNA. Posteriormente, se llevaron rápidamente a hielo. Se agregaron 4 μL de amortiguador para la enzima 5X (Promega). 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 PARA ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.

Para verificar la expresión de actina en todas las muestras, se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2 μ L de cDNA, 2.5 μ L de amortiguador de reacción para la Taq Polimerasa sin MgCl₂, 0.75 μ L de MgCl₂ 50 mM, 0.5 μ L de primer específico para amplificar sentido, 0.5 μ L de primer antisentido, 0.1 μ L de Taq Polimerasa (Invitrogen) y agua libre de RNAsas y DNAsas hasta un volumen final de 25 μ L. Se amplificaron en un termociclador (MyCycler BioRad) a las condiciones especificadas para los cebadores (ver anexo I). Se corrieron 10 μ L de las muestras con 1 μ L 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 μ L de cDNA obtenido por muestra y el reactivo SYBR green [Master Mix] (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos específicos y las condiciones de reacción se mencionan en el Anexo I. 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. 1 Especificaciones para PCR tiempo real

REACTIVO	Para una reacción de 10 μ L
SYBR Green (Applied Biosystems)	5
Agua libre de endonucleasas	3.6
Oligonucleotidos 10 μ M c/u	0.2
cDNA	1

7.11 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS EN LBA POR ELISA

Para determinar la cantidad de IL-5 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 trabajo (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 y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se agregó la enzima peroxidasa y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

Se lavaron y adicionaron 100 μ L de sustrato ABTS (KPL) para revelar y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción con 100 μ L de SDS 10%. Se leyó la absorbancia a 492 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 100 μ L de NaHCO₃ 0.1 M pH 8.3 por pozo y se incubaron toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se lavaron 4 veces con 300 μ L de solución de lavado, se bloquearon con 200 μ L de solución de trabajo y se incubaron durante 1 hr 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-ratón IgE (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 lavan las placas y se adicionaron 100µL de solución sustrato ABTS KPL (Solución A / Solución B) (1:1) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se agregaron 50 µL de H₂SO₄. Finalmente se terminó la absorbancia en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Los datos se reportan como absorbancia determinada a 492 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 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 µm² 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.

Para cuantificar las células PAS positivas en las muestras teñidas con ácido peryódico de Schiff (PAS), los cortes histológicos fueron analizados en un microscopio NIKON Optiphot con el objetivo 40 X. De cada muestra se contaron un total de 20 campos y se contaron 3 láminas por grupo.

7.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias significativas entre los grupos: Silvestre control (WTSS) vs. deficientes de CCR9 control (KOSS) y silvestres tratados con ovoalbúmina (WTOVA) vs. deficientes de CCR9 tratados con ovoalbúmina (KOOVA) fueron determinadas mediante el análisis estadístico *t student* para datos desapareados a dos colas. Los valores de P<0.05 se consideraron como significativos.

VIII. RESULTADOS

Los modelos experimentales de asma han sido utilizados ampliamente para describir la participación de múltiples moléculas durante el reclutamiento leucocitario. Los modelos de asma agudos, proveen información necesaria acerca de lo que ocurren durante las primeras horas posteriores al estímulo alérgico. En este trabajo, se utilizó un modelo murino de alergia pulmonar aguda. Como se esquematiza en la figura 3, el modelo consiste en una sensibilización con el alérgeno experimental que es la proteína ovoalbúmina (OVA). Aún está en discusión el uso de esta molécula como un alérgeno experimental por sus limitaciones de acuerdo a sus propiedades estructurales, como falta de actividad de proteasa que tienen la mayoría de los alérgenos o la inducción de tolerancia (22); sin embargo esta molécula es ampliamente utilizada como alérgeno experimental en las vías aéreas por su capacidad de inducir una respuesta inflamatoria cuando es administrada en la vía respiratoria.

1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

Para el modelo de alergia pulmonar inducido en este trabajo, una de las estrategias que permite analizar cualitativamente a las células inflamatorias, su interacción con la barrera estructural pulmonar y la localización de éstas *in situ*, es la histología mediante cortes histológicos de pulmón y la tinción de éstos con hematoxilina/eosina.

En la FIGURA 4A se muestra la imagen de un bronquiolo no respiratorio en condiciones normales. No se observa hiperplasia ni hipertrofia de las células epiteliales. Aunque en la imagen pueden observarse algunas células infiltradas al epitelio pulmonar; no se observa ningún foco inflamatorio ni células inflamatorias que rodeen el bronquio.

Cuando se induce alergia en ratones silvestres (**FIGURA 4B**), se observa una gran cantidad de infiltrado inflamatorio que rodea al vaso e incluso hay células proinflamatorias que rodean el bronquiolo, también existe una evidente hipertrofia de las células epiteliales y las células caliciformes.

Dentro de las células que constituyen este infiltrado, se encuentran los macrófagos, linfocitos y eosinófilos. En condiciones inflamatorias, los macrófagos alveolares se encuentran activados y contribuyen a la generación de especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias. Los linfocitos efectores provenientes de los ganglios mediastinales, modulan la inflamación mediante la secreción de IL-4, IL-13 y e IL-5. La IL-5 es una citocina crucial en el reclutamiento y activación de los eosinófilos en la mucosa pulmonar y se localizan en el lumen bronquiolar y el intersticio.

En la figura 4, en el acercamiento se observa que las células que forman parte de este infiltrado son células mononucleares y granulocitos.

El ratón deficiente de CCR9 no muestra diferencias estructurales en condiciones basales con respecto al ratón silvestre (*wildtype* WT) que pudieran ser asociadas al genotipo CCR9^{-/-}, se observa libre de inflamación o algún daño estructural intrínseco(**FIGURA 4C**); sin embargo, al comparar el ratón deficiente de CCR9 (*knockout* KO), visualmente se observa menor cantidad infiltrado inflamatorio.

Uno de los objetivos de este trabajo de investigación es establecer el modelo experimental y de acuerdo a las imágenes de histología, aún en ausencia de CCR9, se puede inducir alergia en este ratón, ya que se observan los focos de inflamación característicos que rodean al vaso y al bronquiolo; sin embargo, la inflamación que se induce es menor en el ratón KO (**FIGURA 4D**). En el acercamiento de la figura, también se observa un reclutamiento de células mononucleares como en el ratón WT y granulocitos, sin embargo, al analizar con base en sus características morfológicas, se observa menor número de granulocitos en el ratón KO

Por lo tanto, a pesar de que solamente se realizó análisis cuantitativo de las imágenes histológicas y resta por realizar análisis morfométrico, es claro que en este modelo experimental, existe menor número de células en el tejido de los ratones deficientes de CCR9 comparado con los ratones silvestres.

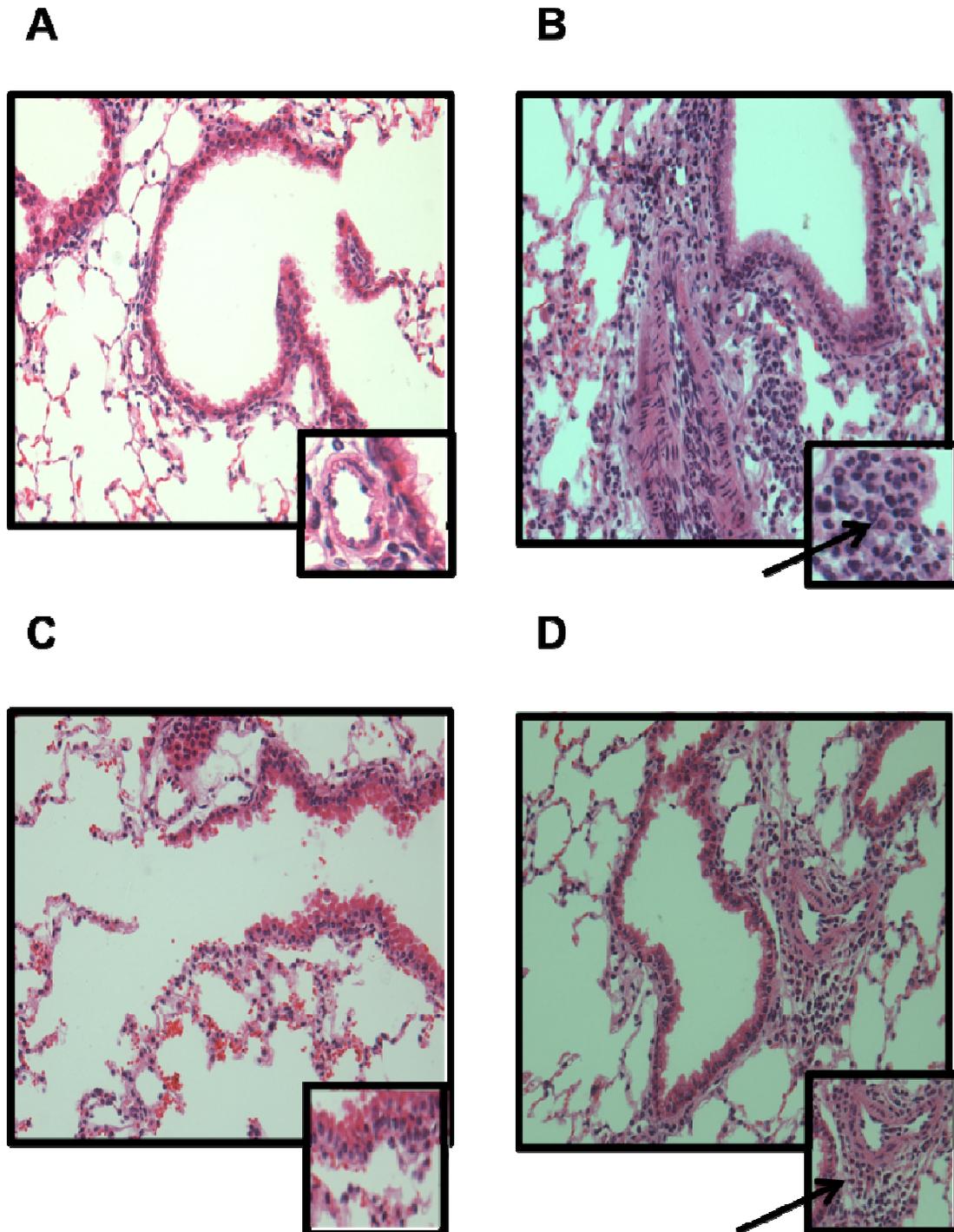


FIGURA 4. EXISTE MENOR INFILTRADO INFLAMATORIO EN PULMÓN EN AUSENCIA DE CCR9. Imágenes representativas de cortes histológicos fijados con etanol absoluto. Tinción hematoxilina/eosina. Aumento 400x. A) Ratón silvestre control (**WT/SS**), B) Ratón silvestre inmunizado con OVA (**WTOVA**), C) Ratón deficiente de CCR9 control (**KO/SS**) Y D) Ratón deficiente de CCR9 inmunizado con OVA (**KO/OVA**). Cada imagen tiene un acercamiento evidenciando células inflamatorias (Flechas)

Una de las consecuencias más importantes de la inflamación crónica durante la alergia pulmonar, es la hipersecreción de moco por las células caliciformes. EL moco obstruye las vías aéreas dificultando el flujo del aire. La sobreproducción de moco puede evidenciarse experimentalmente mediante histoquímica, ya que existen tinciones que hacen evidente la presencia de mucinas. Las mucinas son glicoproteínas adosadas a la membrana de las células caliciformes con un alto contenido de oligosacáridos. Las células con alto contenido de polisacáridos forman un compuesto colorido en presencia del reactivo de Schiff y ácido peryódico (PAS); por lo tanto, en una tinción con PAS, las mucinas de carácter químico básico se toman una coloración rojiza. La determinación de mucinas por la técnica de PAS es una evidencia importante que permite analizar de manera indirecta a la inflamación alérgica pulmonar.

En la inflamación alérgica pulmonar, en condiciones basales, la producción de moco, no es evidente con la tinción de PAS, en ausencia o presencia de CCR9 (**FIGURAS 5A y C**); sin embargo, en este modelo se logró inducir la sobreproducción de moco como se observa los resultados (**FIGURA 5B**). Independientemente de la expresión de CCR9, se induce la producción de mucinas en los animales CCR9 (-/-) y cualitativamente no hay diferencias en la cantidad de células PAS+ (**FIGURA 5D**) comparado con los observado en los ratones silvestres.

Para analizar cuantitativamente la producción de moco, se tomaron diferentes campos por muestra y se contaron las células PAS positivas, representando la producción de moco con propiedades básicas en un estudio ciego. Al comparar el número de células PAS+ de los ratones WT con los ratones KO, se confirma lo observado en el análisis cualitativo, ya que no se observan diferencias significativas en la cantidad de células PAS+ (**FIGURA 6**).

Por lo tanto, estas observaciones sugieren que para el tipo de mucinas con propiedades básicas que son detectadas mediante la tinción con PAS y que son inducidas en este modelo, CCR9 no es indispensable, pues en su ausencia el moco se sigue sobreproduciendo de manera similar que en los ratones silvestres.

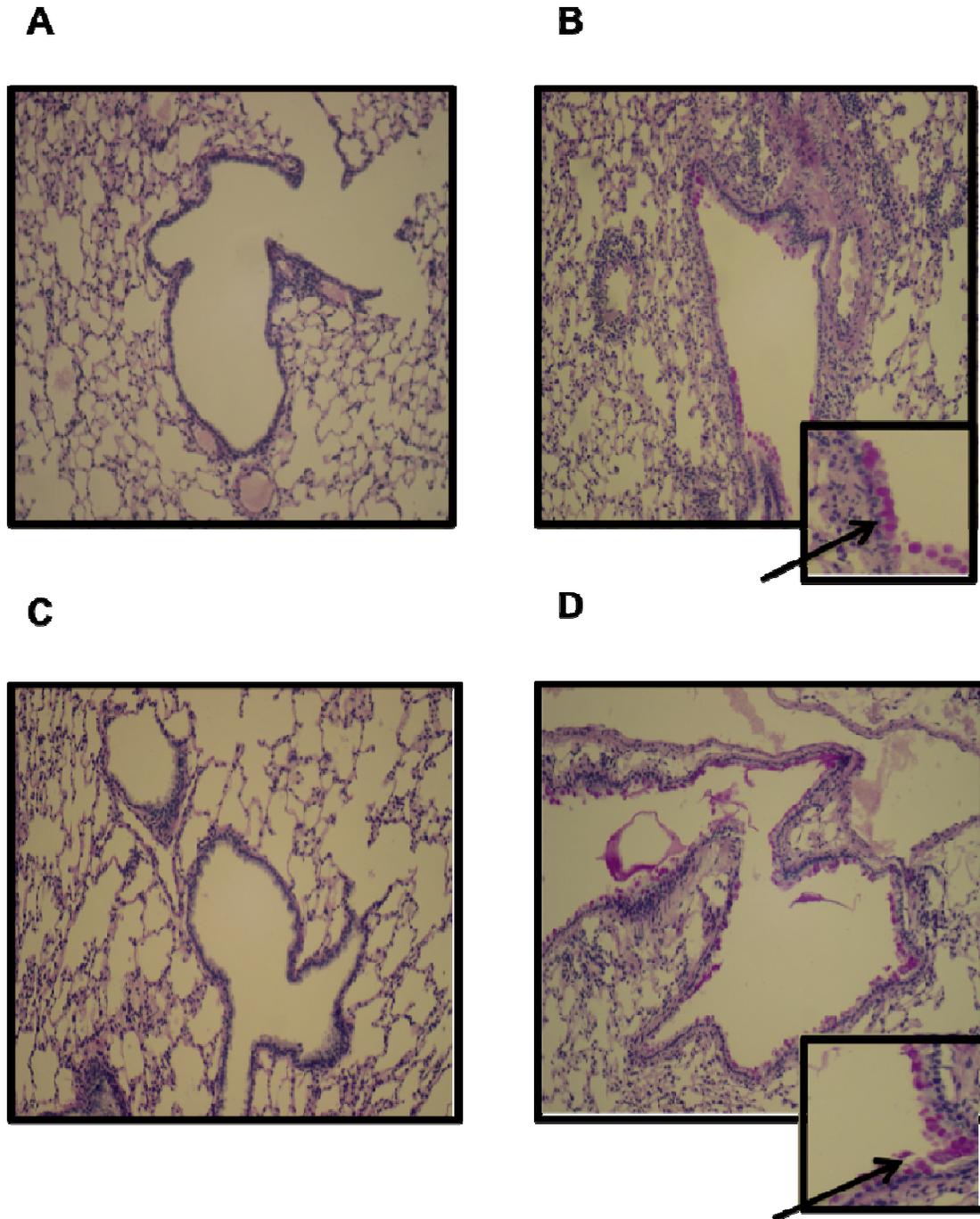


FIGURA 5. CCR9 NO ES IMPORTANTE PARA LA PRODUCCIÓN DE MOCO EN CÉLULAS PAS POSITIVAS EN TEJIDO PULMONAR

Imágenes representativas de cortes histológicos fijados con etanol absoluto. Tinción con ácido peryódico de Schiff. Aumento 200X. A) Ratón WT/SS, B) WTOVA, C) KO/SS Y D) KO/OVA.

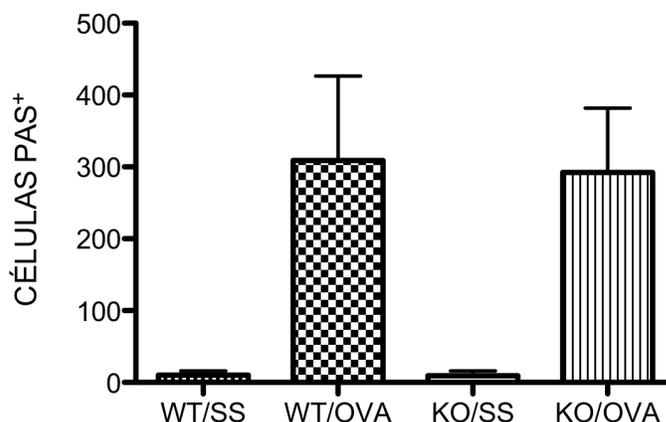


FIGURA 6. CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS PAS POSITIVAS. Se cuantificó el número de células PAS positivas por campo en un total de 20 campos en un microscopio óptico. El número de células positivas se representa en 20 campos por laminilla con un aumento de 400X . Promedio de 5 laminillas por grupo. No se observaron diferencias significativas. $P > 0.05$

CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO

El análisis histológico permite observar cambios morfológicos y estructurales del tejido pulmonar, y proporciona información acerca de la cantidad y localización en la mucosa del infiltrado inflamatorio. Sin embargo, no permite distinguir de manera precisa a todas las subpoblaciones celulares que participan. Para el análisis diferencial, se distinguieron a los siguientes tipos celulares, de acuerdo a las características morfológicas evidenciadas con la tinción de Wright: macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. El análisis cuantitativo se realizó a partir de lavados broncoalveolares (LBA).

En este fluido se obtuvieron células provenientes del lumen bronquiolar. Como se mencionó previamente, las células residentes en el pulmón normal son los macrófagos alveolares y algunos linfocitos. En los ratones WT y deficientes de CCR9 en condiciones basales, existe una cantidad similar de células totales provenientes de los LBA (**FIGURA 7**).

Como era de esperarse, al inducir inflamación, este número aumenta significativamente y representa el incremento en las células infiltradas; sin embargo, al compararlos con la condición normal (WTOVA), existe menor número de células inflamatorias en ausencia de CCR9 (KOOVA) , aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa; es importante mencionar que existe una correlación de este resultado con lo obtenido en el análisis histológico, ya que cualitativamente también hay menor número de células en los ratones deficientes de CCR9, lo que podría sugerir que hay alguna población celular que dependa de CCR9 para migrar a pulmón en condiciones de inflamación.

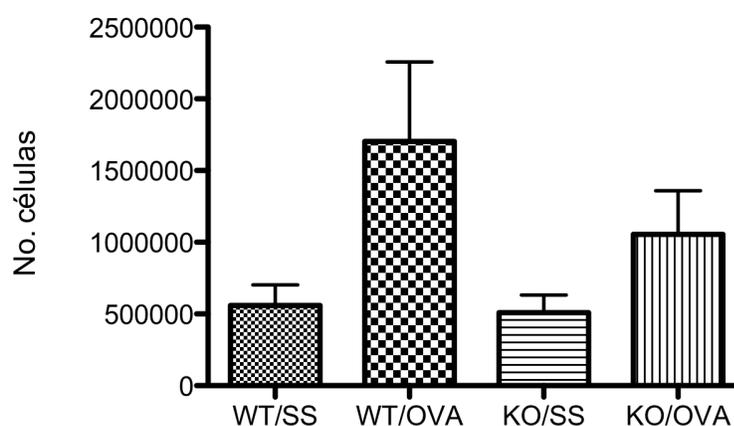


FIGURA 7. EXISTE MENOR NUMERO DE CÉLULAS EN LOS LBA DE RATONES DEFICIENTES DE CCR9. Se obtuvieron 4 mL de lavados broncoalveolares y se determinó el número de células totales. Los datos representan el promedio de 4 muestras diferentes. Figura representativa de 3 experimentos independientes n=4 Prueba estadística t student. No hay diferencias significativas $P > 0.05$

La caracterización morfológica de las células provenientes en el lavado se realizó en laminillas con frotis teñidos mediante la técnica Wright. En los modelos de alergia pulmonar, clásicamente se analizan las poblaciones más importantes que son macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos.

En el conteo diferencial de estos tipos celulares por sus características morfológicas, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de macrófagos en los ratones WT alérgicos en comparación con los KO, ni tampoco en los linfocitos (**FIGURA 8**). Sin embargo, aunque esta diferencia no es significativa, se observa menor número de linfocitos en los ratones deficientes de CCR9, es necesario aumentar el número de individuos para confirmar este resultado. En este modelo la cantidad de neutrófilos que se induce es muy baja y no se observaron diferencias de neutrófilos en ausencia o presencia del receptor CCR9. Algo muy interesante y que confirma lo sugerido en trabajo previo de este grupo de laboratorio es que en ausencia del receptor CCR9, se observa un número menor de eosinófilos en ausencia de CCR9 y esto es significativo.

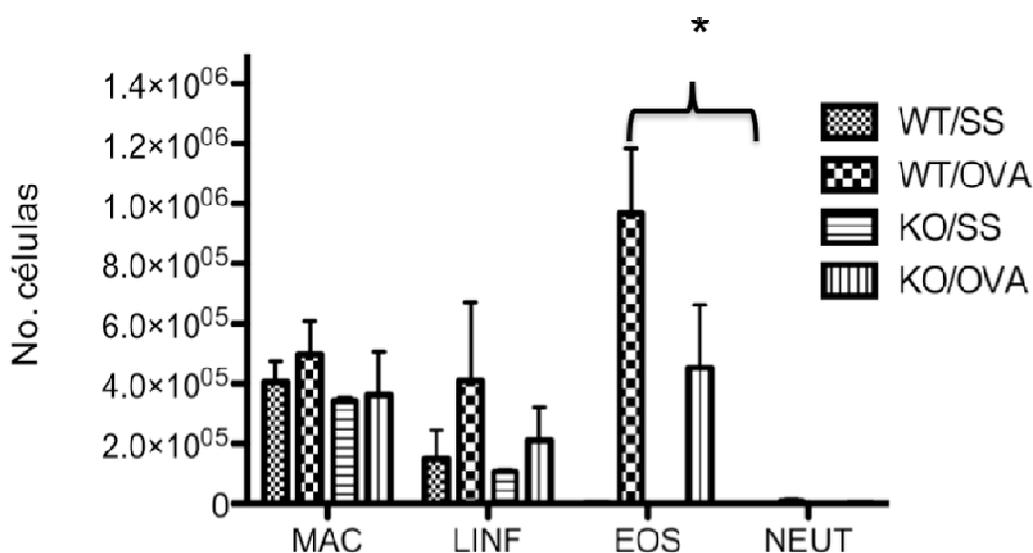


FIGURA 8. HAY MENOR CANTIDAD DE LINFOCITOS Y EOSINÓFILOS EN AUSENCIA DE CCR9 DURANTE LA INFLAMACIÓN PULMONAR. Se citocentrifugaron 20,000 células provenientes de LBA y se tiñeron con Wright para determinar por sus características morfológicas macrófagos (MAC), linfocitos (LINF), eosinófilos (EOS) y neutrófilos (NEUT). Gráfica representativa de 3 experimentos independientes. Promedio representativo n=4. Prueba t student. *P< 0.05

Para confirmar los resultados obtenidos por citocentrifugación, se caracterizaron fenotípicamente a las subpoblaciones de acuerdo a la expresión de marcadores específicos en LBA mediante citometría de flujo. En la Figura 9 se muestran diagramas de puntos representativos de las muestras correspondientes. En un primer análisis, se seleccionaron 2 poblaciones generales de acuerdo a los criterios de tamaño y granularidad.

De un total de 10, 000 células analizadas se puede observar que en los ratones WT y KO controles (SS), se definen las poblaciones residentes que son macrófagos alveolares y una población de linfocitos (**FIGURA 9 A y C**). En las muestras correspondientes a WT y KO de los ratones alérgicos (**FIGURA 9B y D**), aparece una evidente población que de acuerdo a su tamaño y granularidad pudieran ser eosinófilos y la población de linfocitos aumenta de tamaño, consecuencia de su estado de activación.

Por lo tanto en los ratones inmunizados con OVA, en ausencia del receptor de quimiocinas CCR9, existen diferencias en tamaño y granularidad en comparación a las condiciones normales, lo cual sugiere una modificación que pudiera ser de activación de la población en los ratones en ausencia de CCR9. (eje ordenadas).

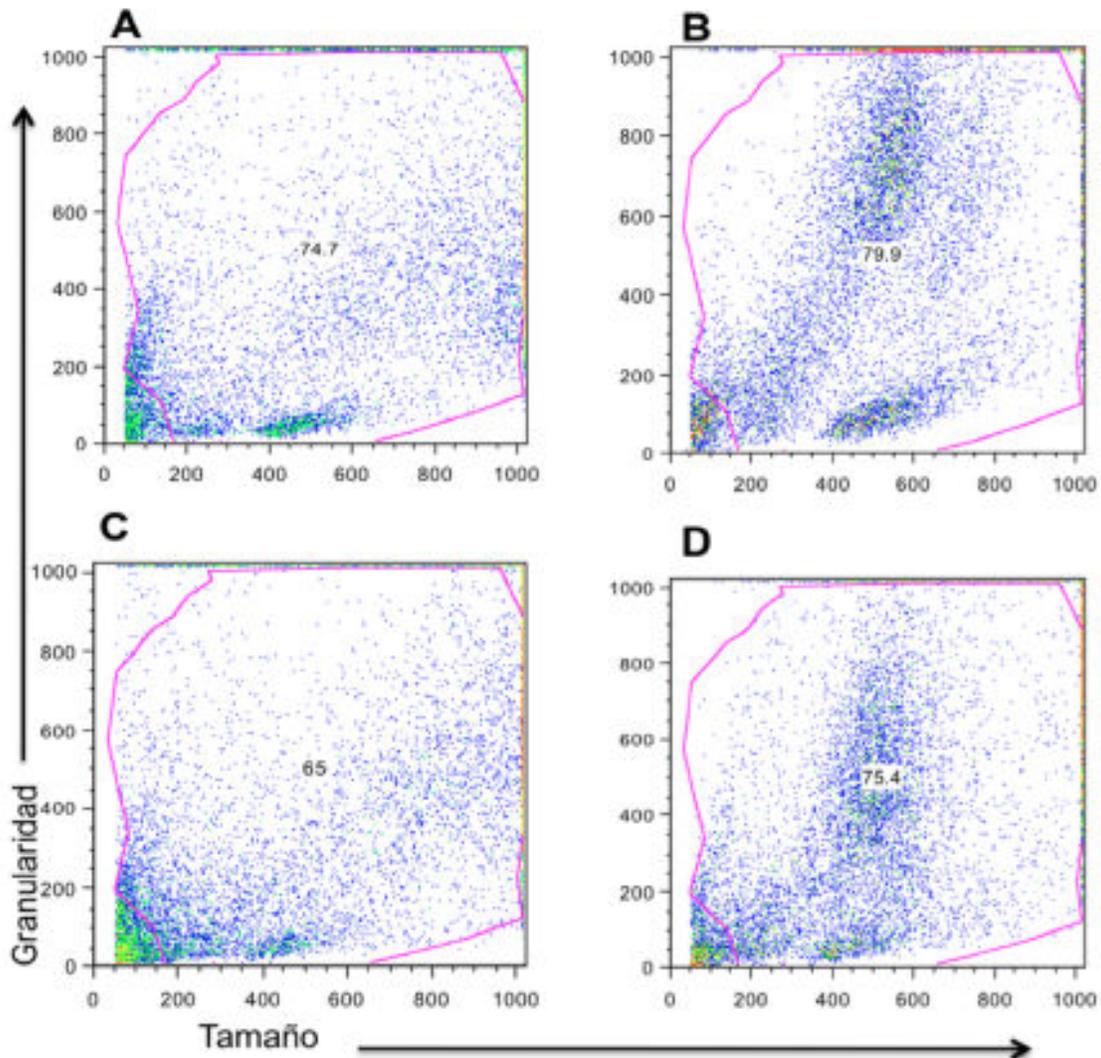


FIGURA 9. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO. EXISTEN DIFERENCIAS EN TAMAÑO Y GRANULARIDAD EN AUSENCIA DE CCR9. Diagramas de puntos representativos de cada muestra de acuerdo a tamaño y granularidad. A) WT/SS, B) WTOVA, C) KO/SS y D) KO/OVA. Figura representativa de 3 experimentos independientes n=4 por experimento. Nótese que en los ratones deficientes de CCR9, existen diferencias en cuanto a tamaño y granularidad de las poblaciones al compararlas con los ratones WT.

Para analizar a cada población se realizaron subregiones de acuerdo al tamaño y granularidad a las que se llamaron R1= Linfocitos y R2= Granulocitos/macrófagos. De acuerdo a la selección de la región R1, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos en los ratones WTOVA vs. KOOVA; a pesar de que existe una tendencia a disminución de linfocitos totales en los ratones KO alérgicos, estas diferencias no son significativas. Sin embargo, sugieren que una pequeña subpoblación de linfocitos se ve afectada en ausencia de CCR9 (**FIGURA 10 B, C**).

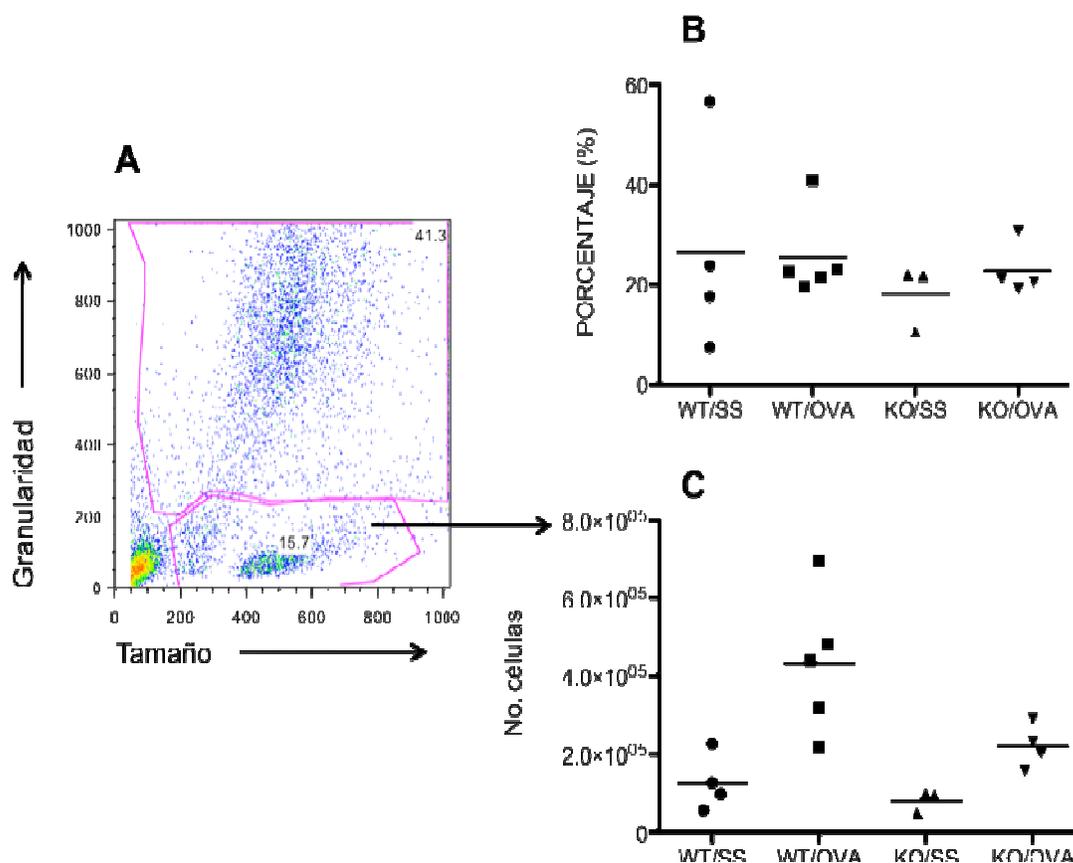


FIGURA 10. EN AUSENCIA DE CCR9 SE OBSERVAN MENOS LINFOCITOS EN LBA. Se muestra **A**) Diagrama representativo de puntos para esquematizar las regiones seleccionadas para el análisis de linfocitos y granulocitos/macrófagos de acuerdo al tamaño y granularidad. **B**) Porcentaje de linfocitos totales **C**) Número de linfocitos por grupo. Promedios representativos de 3 experimentos independientes n=4 No hay diferencias significativas entre los grupos WT/OVA vs. KO/OVA P> 0.05

De la región de linfocitos (R1) se analizaron a las células de acuerdo a la expresión de CD4 y CD8 (**FIGURA 11 A-D**).

La caracterización de los linfocitos CD4 es importante porque dentro de esta población celular se encuentran los linfocitos TH2 que modulan el curso de la inflamación alérgica pulmonar. En el presente trabajo se observó que para los linfocitos T CD4, no existen diferencias significativas en porcentaje al comparar la condición normal con la deficiencia de CCR9 (CCR9 KO) (**FIGURA 11 E**), sin embargo, cuando se refieren estos porcentajes a números de células totales, existe una diferencia significativa al comparar a los ratones deficientes de CCR9 con la cepa silvestre (**FIGURA 11F**).

La participación de los linfocitos T CD8 aún se encuentra en discusión, ya que se ha sugerido que una pequeña población de linfocitos citotóxicos son importantes en la alergia pulmonar, ya que en ratones que carecen de linfocitos T CD8 existe una disfunción en la hiperreactividad normalmente observada en los ratones silvestres y también se ha sugerido que esta población de linfocitos T CD8+ pudieran servir para mantener a una población de células T reguladoras. Durante el análisis de la población T CD8, no se observaron diferencias significativas en porcentaje ni en número de células (**FIGURA 11 G, H**). Sin embargo aún no se descarta que pudieran ser importantes para el desarrollo de hiperreactividad, parámetro que aún queda por analizar de este modelo

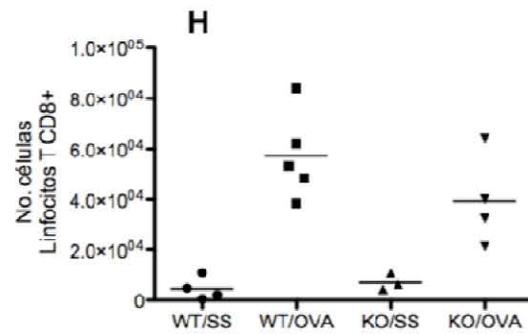
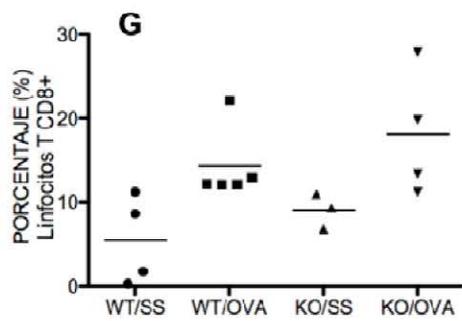
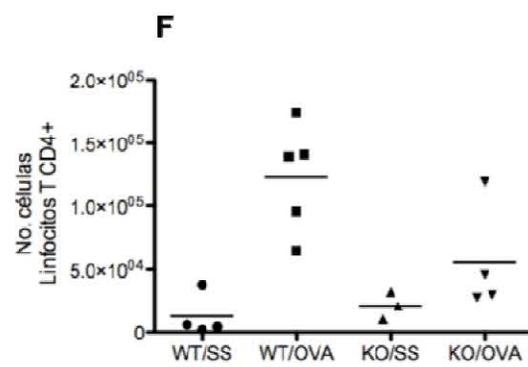
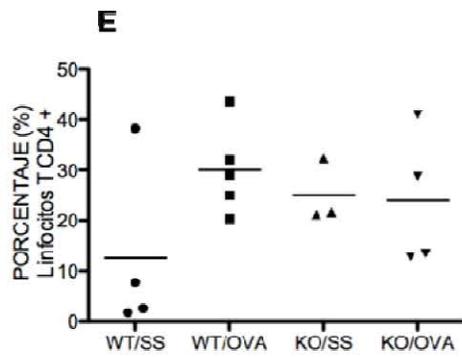
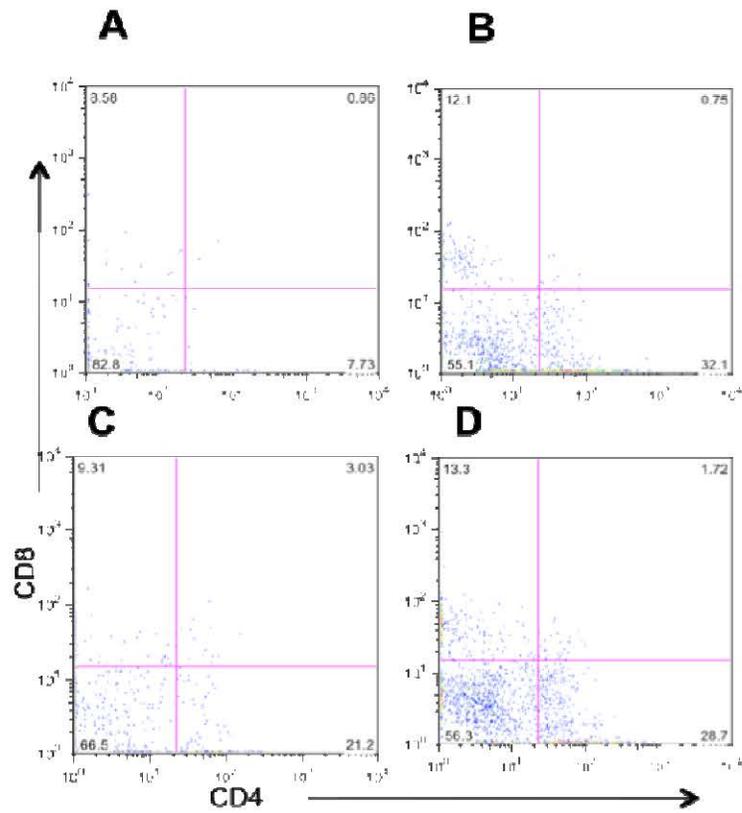


FIGURA 11. LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ ES LA POBLACIÓN MÁS AFECTADA POR AUSENCIA DE CCR9 EN LBA. A-D Se muestran diagramas de puntos representativos de cada grupo A) WT/SS, B) WT/OVA, C) KO/SS y D) KO/OVA de acuerdo a la expresión de CD4 o CD8. Las figuras E-H muestran los promedios representativos de 3 experimentos independientes de E) porcentaje linfocitos T CD4+ F) Promedios de número de células linfocitos T CD4 G) Promedio de porcentaje de linfocitos T CD8+ H) Promedios de números de células linfocitos T CD8+

Del análisis citoquímico se observó una disminución en la población de eosinófilos en ausencia de CCR9, por esto, fue de gran interés analizar a la población de eosinófilos en la región de granulocitos/macrófagos obtenida en el diagrama de puntos de la figura 10 A.

En esta región se encuentran potencialmente poblaciones de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y algunas células dendríticas. De acuerdo a las características de tamaño y granularidad, no se observaron diferencias significativas en porcentaje de células de la región de granulocitos/macrófagos (**FIGURA 12 B**). El número de células no muestra diferencias significativas en ausencia de CCR9 (**FIGURA 12 C**); sin embargo se observa una clara tendencia a menor número de células, lo que correlaciona con un menor número de eosinofilos en el conteo diferencial.

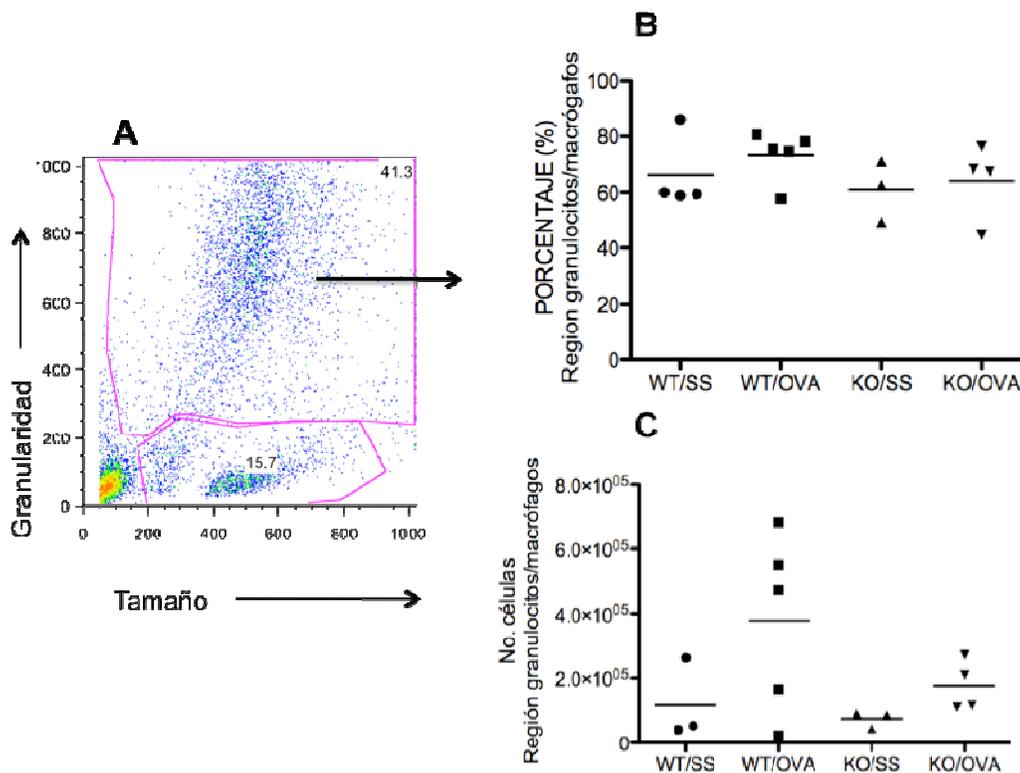


FIGURA 12. ANÁLISIS DE LA REGIÓN DE GRANULOCITOS / MACRÓFAGOS. Se muestra **A)** Diagrama representativo de puntos para esquematizar las regiones seleccionadas para el análisis de linfocitos y granulocitos/macrófagos de acuerdo al tamaño y granularidad. **B)** Porcentaje de granulocitos totales **C)** Número de células por grupo. Promedios representativos de 3 experimentos independientes n=3 P> 0.05

El análisis de granulocitos que se realizó no permite distinguir con precisión a las poblaciones celulares que se encuentran en la región de granulocitos, potencialmente podrían encontrarse células cebadas, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, principalmente. Por los resultados obtenidos en el conteo diferencial, es un receptor de quimiocinas expresado por eosinófilos, linfocitos Th2 y basófilos. Gr-1 es una integrina que se encuentra expresada ampliamente por los granulocitos y macrófagos. En primer lugar se utilizó a ambas moléculas para intentar distinguir a una población potencial de eosinófilos. De la región correspondiente a los granulocitos/macrófagos, se analizó a las células que coexpresaran estos dos marcadores. En la FIGURA 13 se observa que en los respectivos ratones control existen células dobles positivas y este fenómeno no correlaciona con lo obtenido en los conteos diferenciales, donde se confirmó que la cantidad de eosinófilos es muy baja en ausencia de inflamación, lo que sugiere que este doble marcaje

podiera no resultar muy específico solo para eosinófilos. A pesar de esto, al inducir inflamación, no se observan diferencias en los ratones KO vs. WT en porcentaje (FIGURA 13 E) pero si hay menor número de células doble positivas en los ratones deficientes de CCR9 (FIGURA 13 F), fenómeno que correlaciona con que sugerentemente existe menor número de eosinófilos en los ratones KO.

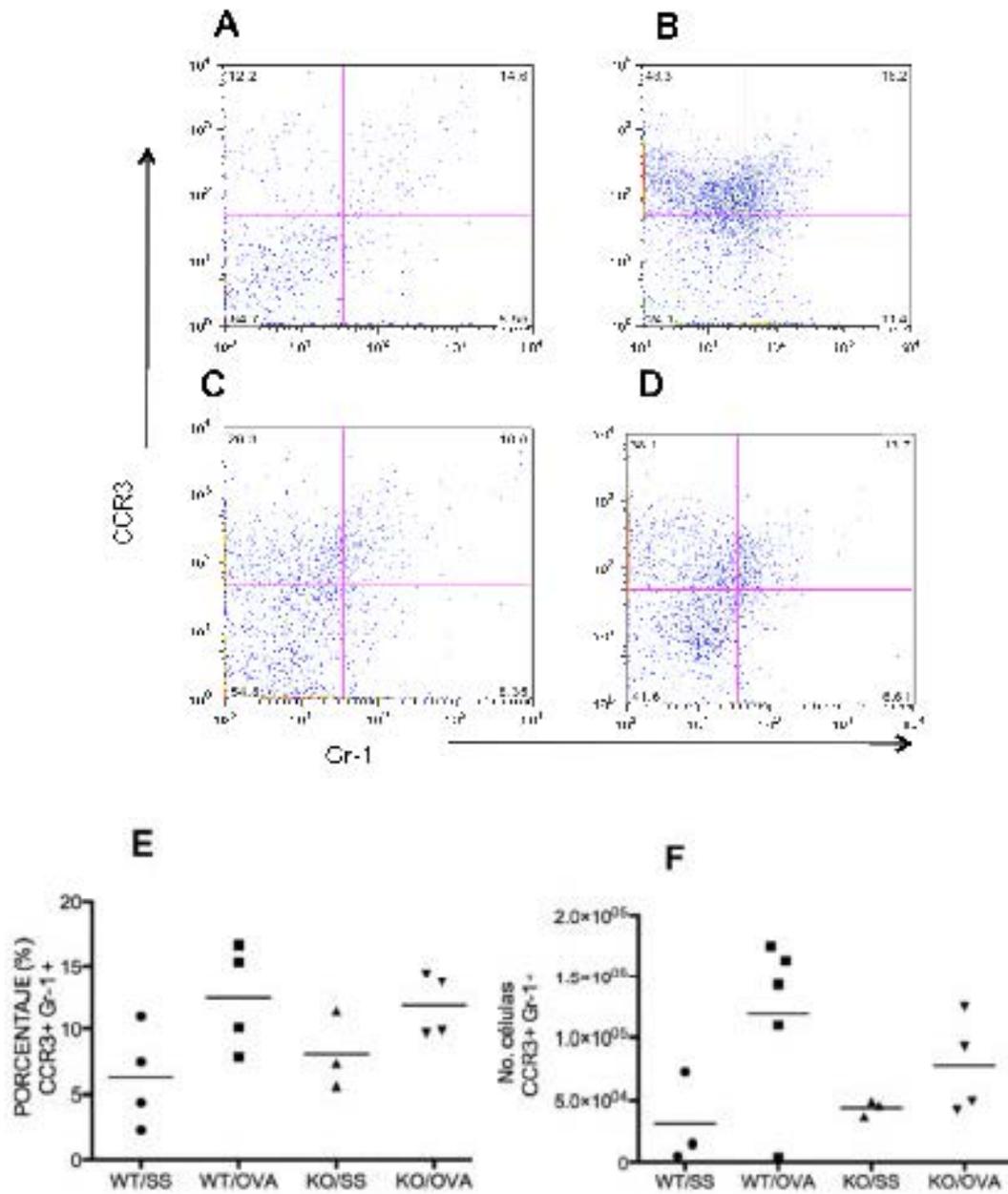


FIGURA 13. DISMINUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES QUE COEXPRESAN CCR3 Y Gr-1 EN LOS RATONES DEFICIENTES DE CCR9 A-D Se muestran diagramas de puntos representativos de cada grupo **A) WT/SS, B) WT/OVA, C) KO/SS y D) KO/OVA** de acuerdo a la coexpresión de CCR3 y Gr-1 Las figuras **E-F** muestran los promedios representativos de 3 experimentos independientes n=4. No hay diferencias significativas. **E) Porcentaje linfocitos T CD4+** **F) Promedios de número de células doble positivas** P < 0.05

Existen estudios que se han encargado de analizar detalle cada una de las poblaciones presentes en lavados broncoalveolares de ratones inmunizados. De acuerdo a la coexpresión de CD11b y CD11c se pueden distinguir distintos tipos celulares: macrófagos alveolares, células dendríticas y granulocitos. A una población potencial de granulocitos en pulmón se le define por su fenotipo CD11c-/CD11b+.

Para corroborar los resultados obtenidos previamente, utilizamos este doble análisis para cuantificar a los eosinófilos en los ratones deficientes de CCR9 (**FIGURA 14**). En los ratones alérgicos aparece una población CD11c-/CD11b+(**FIGURA 14 B,D**) que no existe en los ratones control (**FIGURA 14 A,C**). Cuando se analiza a esta población de acuerdo a la expresión de CD11b y la granularidad (**FIGURA 14E**) , se observan dos poblaciones que potencialmente son eosinófilos en distintos estados de activación ya que expresan en distintas cantidades a la integrina CD11b. Al cuantificar a la población que se nombró CD11b^{med}, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células (**FIGURA 14F**), sin embargo en el número total de células, hay una tendencia a disminuir de células en los ratones deficientes de CCR9 (**FIGURA 14G**) al compararlos con los ratones silvestres. Al analizar a la población CD11b^{hi}, se observó que tanto en el porcentaje de células en los ratones KO a comparación de los WT (**FIGURA 14H**) así como en el número de células existe menos cantidad de estas células(**FIGURA 14I**).

Es necesario subrayar el hecho de que estas poblaciones se encuentran ausentes en los ratones control, lo que confirma que se trata de poblaciones infiltradas presentes en lavados broncoalveolares durante el proceso inflamatorio y que son granulocitos.

Al correlacionar este resultado con lo observado en el conteo diferencial por morfología, se apoya el hecho de que existe una población de eosinófilos que depende de la expresión de CCR9 ya sea en ellos mismos o que indirectamente existiera otra población que de acuerdo a nuestros resultados pudiera ser de linfocitos T CD4 (**FIGURA 11**) que se encuentren modulando el reclutamiento de los eosinófilos a la mucosa pulmonar.

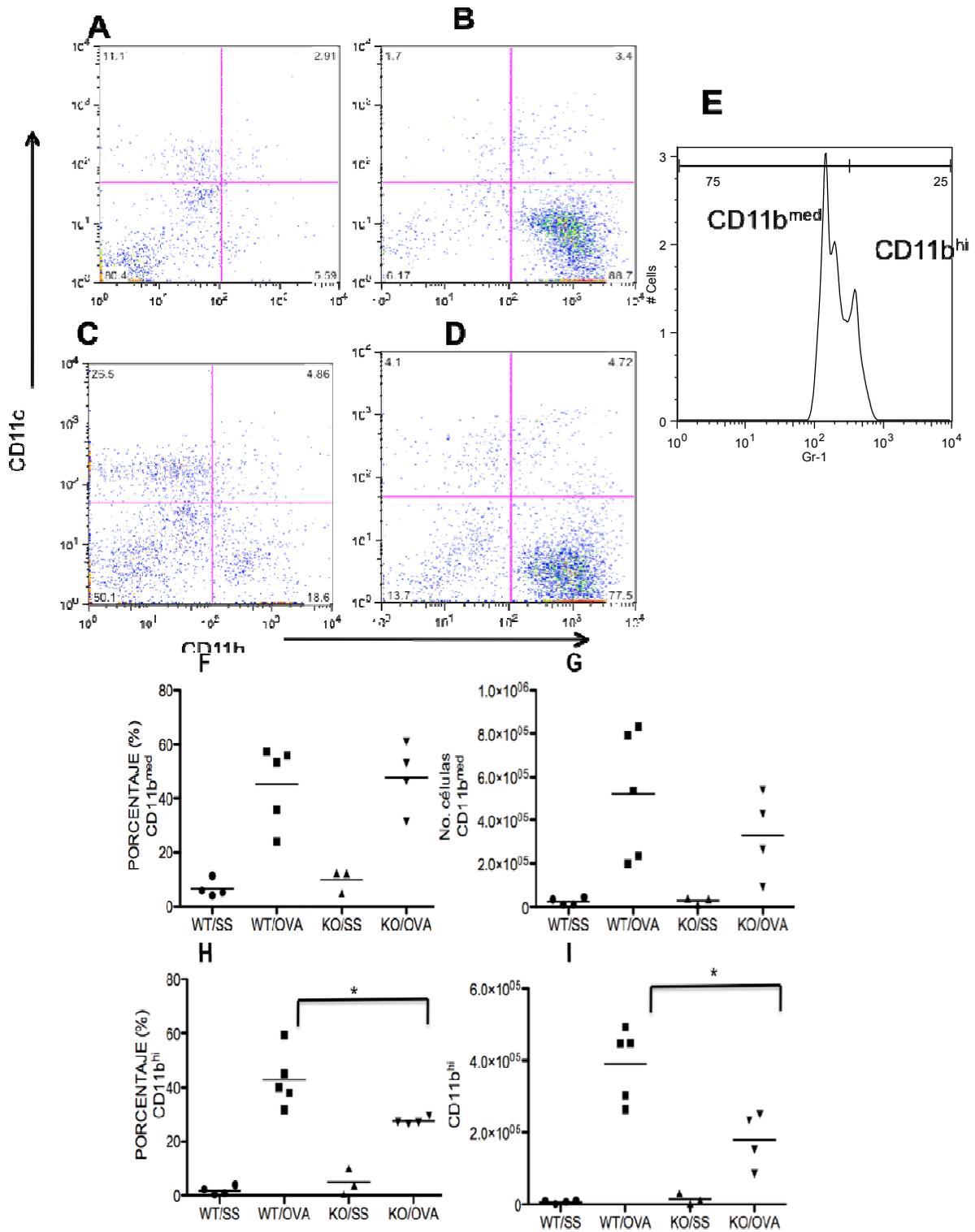


FIGURA 14. CCR9 PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE UNA POBLACIÓN QUE EXPRESA LOS MARCADORES CD11b y CD11c A-D Se muestran diagramas de puntos representativos de cada grupo A) WT/SS, B) WT/OVA, C) KO/SS y D) KO/OVA de acuerdo a la coexpresión de CD11b y CD11c. E) Imagen representativa del análisis de las subpoblaciones de la región CD11c- CD11b+. Las figuras F-G muestran los promedios representativos de 3 experimentos independientes n=4. F) Porcentaje células CD11b+.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS OVA-ESPECÍFICAS.

Además de la producción de moco, otra consecuencia importante mediada por las células inflamatorias es la producción de inmunoglobulinas IgE e IgG1 OVA-específicas por los linfocitos B. Algo importante de hacer notar, es que como se ha demostrado en este modelo previamente, se inducen inmunoglobulina específicas para ovoalbúmina al comparar los ratones control con los sensibilizados (**FIGURA 15**). Cuando se comparan los ratones deficientes de CCR9 con los WT, no se observan diferencias, lo cual sugiere, que a pesar de que hay una población ausente por la deficiencia de CCR9 en los ratones alérgicos, esta población no participa para inducir una efectiva respuesta de anticuerpos en suero.

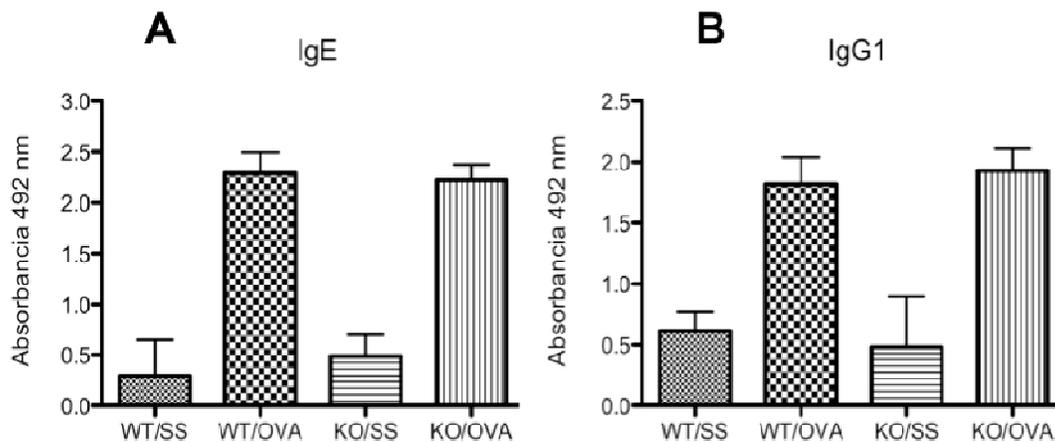


FIGURA 15. CCR9 PARECE NO MODULAR LA PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE IgE e IgG1 OVA-ESPECÍFICAS. Se cuantificó la producción de inmunoglobulinas en suero mediante ELISA. Las gráficas son promedio de 3 experimentos independientes n=4. No hay diferencias significativas $P > 0.05$

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS, LIGANDOS Y CITOCINAS.

El receptor de quimiocinas CCR9 no se expresa en pulmón en condiciones normales. Se utilizó tejido de timo como control positivo de la expresión de CCR9. Como es de esperarse, en condiciones de inflamación, la expresión de CCR9 se encuentra incrementada a comparación de las condiciones control, esto pudiera ser por el reclutamiento de células que expresen este receptor por lo tanto, es de vital importancia, demostrar que su ligando único (CCL25) se puede inducir en tejido pulmonar en condiciones inflamatorias, donde también se utilizó al timo como control positivo. Algo interesante es que en condiciones basales, en ausencia de CCR9 existe mayor expresión de su ligando lo que sugiere una regulación basal del ligando por su receptor. En condiciones inflamatorias el ligando es capaz de expresarse aún en ausencia de CCR9.

Como se mencionó anteriormente, el receptor CCR3 es sobreexpresado en condiciones de alergia, por las células inflamatorias (linfocitos Th2 y eosinófilos). Algo interesante es que en ausencia de CCR9, el receptor CCR3 se ve disminuido aunque no de manera significativa.

Sin embargo, la tendencia se observa en todos los experimentos por lo que se sugiere que esta disminución puede ser por la población ausente de eosinófilos en los ratones KO. Su ligando, la quimiocina CCL11 también se ve disminuida por lo que pudiera ser una explicación de por qué existe menos número de eosinófilos.

La citocina IL-5 es de suma importancia para la producción y activación de los eosinófilos. En lavados broncoalveolares no se observa disminución en los ratones deficientes de CCR9 como se hubiera esperado, pero esto se podría explicar asociando esta citocina cuantificada con un mayor consumo en los ratones WT a pesar de que el RNA mensajero indica menor expresión en los ratones WT.

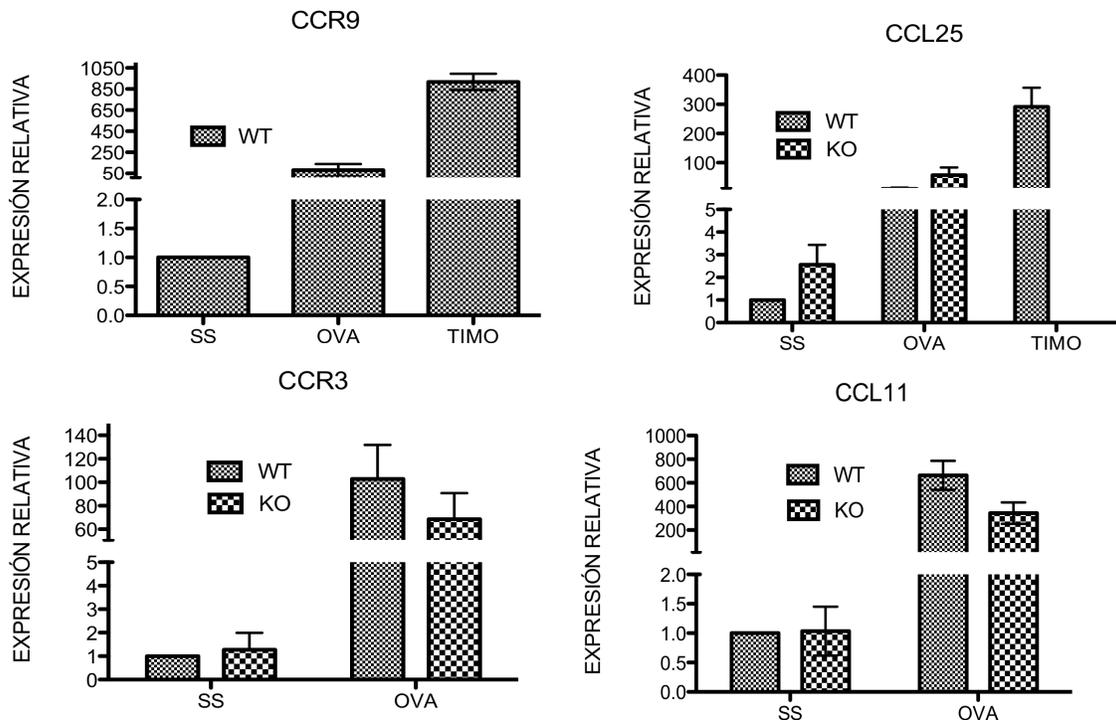


FIGURA 16. LA EXPRESIÓN DE CCL25 Y CCR9 SE INDUCE EN PULMÓN EN CONDICIONES INFLAMATORIAS. Se analizó por RT-PCR en tiempo real la expresión de los receptores CCR9 (panel superior) y CCR3 (panel inferior) con sus respectivos ligandos. Se utilizó cADN de timo como control positivo de expresión de CCR9 y CCL25. Gráfica representativa de 3 experimentos independientes n=2 * p < 0.05

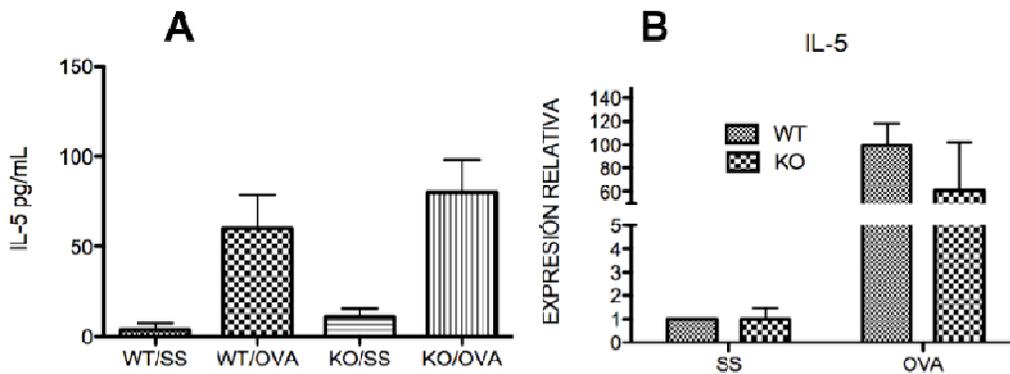


FIGURA 17. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN Y DE LA EXPRESIÓN DE IL-5. Se cuantificó la cantidad de IL-5 (pg/mL en LBA por ELISA (panel izquierdo). Gráfica representativa de tres experimentos independientes n=4 p > 0.05. Se analizó la expresión de mRNA de IL-5 en tejido pulmonar por RT-PCR en tiempo real. Gráfica representativa de 3 experimentos independientes n=2 p > 0.05

IX. DISCUSIÓN

El asma alérgica tiene 3 componentes importantes que la definen: la hiperreactividad bronquial, la sobreproducción de moco y la inflamación alérgica pulmonar tipo TH2.

La inflamación alérgica pulmonar es una característica muy importante durante el desarrollo y progresión en el asma alérgica. En ella, intervienen elementos celulares que modulan y controlan la progresión de la enfermedad. La patología asociada a la inflamación alérgica pulmonar se relaciona con la secreción de moléculas proinflamatorias incluyendo mediadores lipídicos, péptidos inflamatorios, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento. Además de los leucocitos infiltrados, las células estructurales como las epiteliales, endoteliales y los fibroblastos son fuente de mediadores proinflamatorios causando o favoreciendo la liberación de éstos (20)• . Debido a la naturaleza compleja de este microambiente, el estudio de la regulación de estos mediadores es un potencial atractivo terapéutico (58)• .

La regulación de las quimiocinas y sus receptores, así como su participación en los procesos inflamatorios, son de gran interés en la búsqueda de potenciales blancos terapéuticos (59)• . Es por esto que han sido objeto de estudio en modelos animales *in vivo* e *in vitro* y en algunos casos, se ha observado una correlación entre el incremento en el nivel de algunas quimiocinas en sueros de pacientes con el progreso de la enfermedad (60,61)• .

Existen claros ejemplos en donde se han encontrado niveles elevados de la quimiocina CCL11 y su receptor CCR3 en biopsias de mucosa bronquial de asmáticos atópicos a comparación de los sujetos sanos (62)• . En otros reportes, se han encontrado altos niveles de las quimiocinas CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL24 en LBA de pacientes con asma alérgica y de receptores como CCR3 (60)• .

Los modelos animales de alergia pulmonar, han podido esclarecer la participación de algunas moléculas en la inflamación alérgica pulmonar. Como resultado de los estudios con modelos animales, actualmente sabemos que el asma alérgica involucra la interacción de entre la inmunidad innata y la adaptativa. La eosinofilia, como principal característica del proceso alérgico, ha sido demostrada en experimentos con ratones deficientes de este tipo celular (63)• . Los modelos experimentales en ratón, se inician sensibilizando a los ratones con alguna proteína inmunogénica (comunmente ovoalbúmina), lo cual es acompañado con algún adyuvante como hidróxido de aluminio. El tiempo que tiene el sistema inmune para inducir una respuesta es de varios días, posteriormente, el contacto directo con el antígeno en los pulmones se realiza en forma de aerosol o por instilación nasal, lo cual desencadena una reacción inflamatorio en los pulmones caracterizada por un reclutamiento de eosinófilos, engrosamiento del epitelio e hiperreactividad bronquial. El esquema de sensibilización varía de acuerdo a los modelos reportados; sin embargo, un esquema común, consiste en la sensibilización via intraperitoneal con dos administraciones espaciadas por una semana,

descanso de una semana y un reto por medio de exposición con un aerosol de ovoalbúmina al 1% durante 30 minutos por cada 2 o tres días (64)• . Las características de la inflamación alérgica se observan un día o dos posteriores a la última exposición, aunque la cinética de eventos en este proceso no se ha analizado detalladamente. En algunos trabajos se han utilizado algunas variación, por ejemplo, la exposición nasal a NO₂, la cual ha sido utilizada como inductora de la respuesta inmune en lugar de adyuvante y ha sido utilizada como un intento de mimetizar las condiciones ambientales de algunos contaminantes (65)• . También se han utilizado algunas variaciones en el tipo de antígeno administrado, debido a que se ha cuestionado el contacto real de los humanos con la ovoalbúmina, lo cual ha permitido el uso de extractos de desechos de ácaros y *Aspergillus*, que son los más representativos de lo que ocurre naturalmente en los humanos (65,66)• .

Otro variable que se ha utilizado en los modelos murinos de inflamación alérgica pulmonar, es la cronicidad en la exposición antigénica. La sensibilización y reto que se describe anteriormente, es aguda; sin embargo, el asma en los humanos es un padecimiento crónico en donde claramente se ha observado que la remodelación de la vía aérea ocurre en los últimos estadios. Algunas investigaciones en modelos animales, han sido dirigidas al estudio de los procesos generados por la inducción crónica al antígeno. Desafortunadamente en la mayoría de los casos, la administración crónica de ovoalbúmina en cepas como los BALB/c, da lugar a tolerancia (67)• .

Los modelos animales han sido de gran importancia para el estudio de los mecanismos de inflamación alérgica, se han icombinado con el uso de anticuerpos monoclonales, animales transgénicos y ratones knock out para describir el papel de moléculas y células; sin embargo se deben considerar como limitaciones algunas diferencias estructurales y funcionales entre humano y ratón, la más importante, que los ratones no desarrollan asma de manera espontánea (68)• .

En el modelo experimental utilizado en el presente trabajo de investigación, se induce inflamación pulmonar en ratones de la cepa C57BL6. A pesar de que se han reportado algunas diferencias en la respuesta inflamatoria que se induce entre la cepa C57BL6 y BALB/c, se ha reportado que la cepa C56BL6 es mejor para observar infiltrado inflamatorio (68), además de que fue necesario utilizar un ratón deficiente del receptor CCR9 que se encuentra en fondo genético C57BL6.

Como se mencionó anteriormente, los modelos murinos proporcionar información acerca de los procesos de regulación y participación de algunas moléculas. En el caso de este trabajo de investigación, se analiza el papel que tiene el receptor de quimiocinas CCR9 en la alergia pulmonar. La regulación de los receptores de quimiocinas de la familia CC, ha sido ampliamente analizada en los modelos murinos (69)• . En estos modelos, se ha descrito que el receptor de quimiocinas CCR3 es un modulador importante durante la alergia pulmonar

(70)• y en algunos casos también se ha sugerido que otros receptores de la familia CC no son importantes durante el desarrollo de este proceso inflamatorio (71)• , aunque la información aportada en este modelo murino no ha correlacionado con lo observado en la clínica (72)• .

La participación del receptor de quimiocinas CCR9 no ha sido analizada previamente. Como se mencionó en la introducción, existe una población de células iNKT que participan en la inflamación alérgica pulmonar (26)• . Se ha reportado que, en pacientes con asma alérgica existe una subpoblación de células que sobreexpresan al receptor CCR9, a comparación de los sujetos sanos, además que se demuestra por primera vez que existe una producción de CCL25 (ligando único de CCR9) en la mucosa bronquial de estos pacientes asmáticos (52)• . Los eosinófilos, son células características del infiltrado inflamatorio en la alergia pulmonar (27) y este tipo celular es el regulador más importante de el proceso inflamatorio. Se ha estudiado ampliamente el mecanismo de reclutamiento y activación que tienen estas células. El receptor de quimiocinas CCR3 participa de manera importante en este proceso y la citocina IL-5 es la principal responsable de la activación. Existen reportes en donde se demuestra que la expresión de este receptor es inducible en líneas celulares de eosinófilos humanos mediante estímulos inflamatorios de IL-3 e IFN- γ (55), sin embargo, estos hallazgos han sido determinados *in vitro*.

Es por lo anterior, que fue de interés para el presente trabajo de investigación, analizar la participación *in vivo* del receptor de quimiocinas CCR9 en la inflamación alérgica pulmonar, en un modelo murino utilizando ratones deficientes de CCR9 y comparando la respuesta inflamatoria con ratones silvestres.

Una de las características que se analiza en los modelos murinos de alergia, es el infiltrado inflamatorio mediante cortes histológicos de pulmón. Este análisis histológico permite describir el proceso inflamatorio *in situ*. Comenzaremos describiendo a la mucosa pulmonar. El epitelio pulmonar es una barrera muy importante de la defensa contra los alérgenos, contaminación, virus, bacterias, etc . La mucosa pulmonar está compuesta de distintos tipos de células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales. Los fibroblastos se encargan de la regeneración de elementos de matriz extracelular que son necesarios durante los procesos de reparación con el fin de recuperar la función normal del pulmón. Esta reparación es inducida mediante la secreción de factores de crecimiento como PDGF, TGF- β e IGFs (73)• . Estas moléculas participan activando los mecanismos de reparación inducidos por daño tisular agudo y crónico. Las células epiteliales sirven de barrera mecánica para impedir el ingreso de agentes nocivos al tejido y las células epiteliales alveolares se encargan de modular el intercambio gaseoso. Ambos tipos de células son capaces de secretar también citocinas como CCL2, CCL3 y GM-CSF (74)• . Las células endoteliales se encuentran estratégicamente localizadas entre el compartimiento vascular y el intersticio pulmonar,

funcionan como barrera estructural en ciertos procesos biológicos como la inflamación y regulan procesos de regeneración vascular como la angiogénesis ya que también son capaces de secretar factores de crecimiento (36)• . Debido a que estas células estructurales (epiteliales, fibroblastos, endoteliales) constituyen la mucosa pulmonar y junto con las glándulas mucossecretoras, funcionan como una barrera entre el organismo y las condiciones ambientales, son reguladoras importantes de procesos inflamatorios como la alergia pulmonar. En los modelos murinos, los cortes histológicos permiten analizar, por un lado, al infiltrado inflamatorio, su cantidad y composición, además de que permiten analizar los cambios estructurales inducidos en la mucosa pulmonar durante el reto alérgico (75)• . En el modelo murino utilizado en este trabajo experimental, se observó que en el espacio peribronquiolar, existe una gran cantidad de infiltrado inflamatorio en los ratones silvestres sensibilizados con ovoalbúmina, el cual es representado por una gran cantidad de células mononucleares y polimorfonucleares; sin embargo, al comparar con la respuesta inflamatoria en los ratones CCR9 KO, a pesar de que también se observa gran cantidad de infiltrado inflamatorio, cualitativamente es menor la cantidad que en los ratones silvestres. Aunque aun falta confirmar con un análisis morfométrico que indique cuantitativamente el área de infiltrado , las imágenes de histología sugieren que existe una dependencia de las células inflamatorias en cuanto a la expresión del receptor CCR9. Aún se podría distinguir a nivel histológico por técnicas como inmunohistoquímica si es una población celular específicamente la que se ve afectada en ausencia de CCR9 y también se describiría la localización espacial de los distintos tipos celulares involucrados. Además, no se observan diferencias en los procesos de remodelación inducidos en las células estructurales antes mencionadas en los ratones deficientes de CCR9, lo cual sugiere que este receptor es importante para los procesos de remodelación que se llevan a cabo en la mucosa pulmonar durante la alergia, sin embargo, es necesario analizar el efecto de la ausencia de CCR9 en modelos crónicos que permitan inducir cambios estructurales y procesos de remodelación más evidentes (76)• .

Otro parámetro que permite analizar la histología, es la producción de moco. Como se mencionó anteriormente en la introducción, la sobreproducción de moco por las células caliciformes es una consecuencia fundamental durante la alergia pulmonar y es una de las causas que favorecen a la broncoobstrucción (77)• . Esta sobreproducción es dependiente de estímulos proinflamatorios generados por el microambiente, como el caso de las citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-11 e IL-13 (78)• .

La tinción de los cortes histológicos con PAS, evidencia a las células productoras de moco porque aparecen teñidas de rojo. Cualitativamente no se observó alguna diferencia en la producción de moco en los ratones CCR9-KO a diferencia de los silvestres, aunque parece que la distribución de este moco es más uniforme en los ratones silvestres. Para confirmar el

análisis, se realizó una cuantificación de las células PAS+ y no se observó diferencia en la cantidad de células productoras de moco por campo. Aunque no se observaron diferencias en el número de células productoras de este tipo de moco, resta por analizar si existen diferencias en la producción de otros tipos de moco mediante otra tinción para glicoproteínas (como el azul alciano) comparando ambos grupos de ratones. Es importante analizar las diferencias en la producción de moco debido a que es una medida de la cantidad de inflamación. Los genes de mucinas que se expresan en pulmón son principalmente MUC2, MUC5AC y MUC5b. Se ha visto que estos genes pueden ser regulados por la presencia de citocinas proinflamatorias, principalmente IL-4 e IL-5 (19). El hecho de que existieran diferencias en la producción y localización de diferentes tipos de moco en los ratones deficientes de CCR9, sugiere una regulación en producción de citocinas e indica una regulación directa en la expresión de los genes de mucinas por un gen de quimiocinas. No se ha estudiado a detalle la relación entre receptores de quimiocinas y la expresión de genes de mucinas, aunque existen evidencias que existe comunicación directa o indirecta de regulación de genes MUC5AC por interacción quimiocina-receptor, como es el caso del receptor CCR6 en líneas de células epiteliales humanas (79).

Otro parámetro que fue necesario evaluar, fue cuantificar y distinguir a las poblaciones celulares en LBA debido a que se sabe que las células inflamatorias, migran a la mucosa pulmonar mediadas por la secreción de citocinas proinflamatorias en la mucosa pulmonar (68). Las quimiocinas y sus receptores funcionan como moduladores de la inflamación, ya que son las células inflamatorias las encargadas de continuar con la secreción de citocinas y favorecer el microambiente inflamatorio (80). Por lo anterior, se cuantificó en los LBA el número de células y se distinguió de acuerdo a sus características morfológicas el tipo celular al cuál pertenecen. En nuestros resultados, se observa una tendencia a la disminución de células totales en los ratones CCR9 KO en comparación con los ratones WT. Debido a que esta diferencia no es significativa; es necesario aumentar el número de experimentos, sin embargo si se establece un primer indicio de que existe un tipo de regulación del proceso inflamatorio que puede ser mediado por el receptor CCR9.

Al distinguir a cada población de acuerdo a sus características morfológicas por medio de un conteo diferencial, se observaron diferencias en el reclutamiento de linfocitos y eosinófilos. Aunque solamente en el caso de los eosinófilos las diferencias son significativas, es necesario aumentar el número de individuos para el análisis de los linfocitos. En este modelo y bajo las condiciones inflamatorias, no se observaron diferencias en el número de macrófagos y neutrófilos por la ausencia de CCR9.

Una hipótesis que explique menor cantidad de eosinófilos en los ratones deficientes de CCR9 puede ser que estos eosinófilos expresan CCR9 y este receptor les sea necesario para migrar hacia pulmón a través del único ligando que pudiera ser expresado en la

mucosa pulmonar, como ocurre en estas células a través de CCL11 y el receptor CCR3 (60). Sin embargo, solamente existe un reporte en donde se demuestra la expresión de CCL25 (ligando único de CCR9) en mucosa bronquial de pacientes asmáticos (52). Lo que se ha demostrado es la expresión de esta quimiocina únicamente se caracterizó en condiciones homeostáticas en tejido tímico (81) y epitelio intestinal (82). En condiciones inflamatorias, la interacción CCL25-CCR9 es importante regulando procesos crónicos inflamatorios como la enfermedad de Crohn o el intestino irritable (83).

Otra posible explicación puede ser que exista otra población que dependa de CCR9 para su migración y/o activación en pulmón y que a su vez regula al reclutamiento de eosinófilos, mediante la secreción de algún mediador y esta migración se vea impedida para una población particular de eosinófilos.

Cuando existe un estímulo antigénico, los linfocitos residentes de la mucosa pulmonar también pueden migrar a los ganglios mediastinales y ser activados, proliferan y se diferencian a fenotipo cooperador T_H2 y pueden migrar a la mucosa pulmonar e incluso proliferar en pulmón (84).

Otro tipo celular que se cuantificó durante el análisis de las poblaciones es el de neutrófilos. Estas células se consideran un marcador muy importante en algunos pacientes con asma severa. Son reclutados por acción de CXCL8 hacia la mucosa pulmonar (85). En algunos modelos de alergia se encuentran aumentados y en estos modelos experimentales se les ha atribuido una participación importante como reguladores del daño epitelial (86).

Para realizar un análisis más detallado de las subpoblaciones, los LBA se analizaron por citometría de flujo. Los linfocitos T que expresan al marcador CD4 se subclasifican de acuerdo al perfil de citocinas que secretan en linfocitos T_H1 , T_H2 , T_H17 y T reguladores (87). Los linfocitos que participan regulando el microambiente durante la inflamación alérgica principalmente son los linfocitos T_H2 . Estos linfocitos se encargan de secretar citocinas como IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15 (84). Como se mencionó anteriormente, estas citocinas, principalmente la IL-5 modulan el reclutamiento y activación de eosinófilos. La IL-13 tiene acción directa sobre el epitelio induciendo a la proliferación de las células caliciformes y de esta manera contribuyen a la secreción de moco. En el análisis de citometría de flujo, existe una disminución de linfocitos en los ratones CCR9 KO al compararlos con los ratones WT. Esto es importante también porque se puede analizar posteriormente a alguna subpoblación de células T reguladoras que pudiera verse modulada por la expresión de CCR9. Estudios preeliminares en nuestro grupo de investigación, han sugerido que existe una subpoblación de linfocitos T con capacidad reguladoras cuyo reclutamiento a intestino delgado en un modelo de amibiasis intestinal, depende de la expresión de CCR9, por lo que aún queda por analizar con mayor profundidad a esta

población en la mucosa pulmonar de acuerdo a los marcadores CD25 y FoxP3 para distinguir si se ve afectada esta subpoblación reguladora en ausencia de CCR9 (88)• .

Como se puede observar en las **FIGURAS 13 y 14** se utilizó una caracterización diferente para distinguir a los eosinófilos (CCR3+/Gr-1 y CD11b+/CD11c- respectivamente). La coexpresión de CCR3 y Gr-1 se puede utilizar para diferenciar a los eosinófilos de otras poblaciones de granulocitos o de linaje mieloide que pudieran expresar Gr-1 pero no CCR3 (89)• . Aunque logramos determinar células dobles positivas mediante este doble marcaje, esta tinción no evidenció algún incremento importante en la población que correlacionara con el conteo diferencial, por lo cuál, se utilizó a la expresión de CD11b y a la no-expresión de CD11c para evidenciar a los eosinófilos y que este doble marcaje además pueda generar otra información adicional acerca del estado de activación de esos eosinófilos. Mediante esta caracterización, se logró confirmar el resultado del conteo diferencial, existe una población de eosinófilos que de acuerdo a su expresión de CD11b y que son CD11c- que en ausencia de la expresión de CCR9, éstos no se encuentran en lavados broncoalveolares. Existen dos subpoblaciones que expresan en diferente intensidad a la molécula CD11b lo cual sugiere dos subpoblaciones de eosinófilos que pudieran estar en distinto estado de activación (89)• . Aún queda por analizar otro tipo de marcadores de activación que nos pudieran sugerir si la expresión de CCR9 en los eosinófilos pudiera modificar su perfil de activación y ésta pudiera ser una de las razones por las que hayan menos en los LBA.

Algo que resta por analizar es, si los eosinófilos presentes en los ratones deficientes de CCR9 potencian su función o se trata de que la población dependiente de CCR9 no es importante para la producción de anticuerpos OVA-específicos.

El cambio de isotipo generado por linfocitos B y su diferenciación a células plasmáticas depende de la producción de citocinas, principalmente IL-4. se cuantificó la producción de inmunoglobulinas específicas IgE e IgG1 por ser las más importantes que se inducen durante procesos inflamatorios relacionados con alergias; a pesar de que se induce la expresión de estas inmunoglobulinas en nuestro modelo de ovoalbúmina, al comparar la condición normal con la deficiencia de CCR9, no parece ser importante CCR9 para la secreción de IgE OVA-específica para este modelo y en suero, aún resta por analizar la producción local de estos isotipos e incluso otro que pudiera verse afectado por la ausencia de CCR9 como la IgA que es una inmunoglobulina asociada a la respuesta inmune de mucosas y puesto que se ha caracterizado a una población de células plasmáticas (productoras de IgA) que potencialmente pueden reclutarse a intestino a través de CCR9 (90)• .

Otro mediador importante que es secretado principalmente por las células epiteliales es la quimiocina CCL11 (eotaxina-1). Esta quimiocina es un potente quimioatrayente de

eosinófilos a la mucosa pulmonar. Estos eosinófilos migran y en mucosa pulmonar regulan la inflamación mediada por la liberación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento preformados contenidos en sus gránulos y también sintetizados de novo. Debido a la disminución en el número de eosinófilos en lavados broncoalveolares, es importante analizar los principales mediadores que pudieran estar involucrados en el reclutamiento y activación de estas células. Se analizó también la expresión relativa de genes asociados con el reclutamiento y activación de eosinófilos como lo son la quimiocina CCL11 el receptor al que se une y que es el más importante modulador del reclutamiento de estas células hacia los sitios de inflamación, CCR3. Asimismo, se evaluó la expresión de IL-5 y la secreción de esta citocina en lavados broncoalveolares. Aunque para el caso de los mediadores CCL11 e IL-5 hay una disminución significativa, ni en la expresión de CCR3 en los ratones deficientes de CCR9, si existe una tendencia de menor expresión de estos mediadores. Para CCL11 y CCR3 falta cuantificar aún la proteína en estos lavados broncoalveolares y en tejido pulmonar.

En mucosa pulmonar en condiciones normales no residen, pero estos eosinófilos son reclutados provenientes de médula ósea donde su producción y diferenciación es mediada por la IL-5 así como también su reclutamiento hacia la mucosa pulmonar. Esta citocina es producida por los linfocitos tipo T_H2 principalmente, aunque los mismos eosinófilos, las células cebadas y el mismo epitelio son fuente de IL-5 (91) .

Aún queda por analizar lo que ocurre en distintas etapas del proceso inflamatorio. Existen algunos estudios en donde se ha seguido un cinética de la expresión de quimiocinas y se ha intentado relacionar con el reclutamiento de ciertos tipos celulares de manera diferencial. Queda por estudiar en este modelo, si la expresión de CCL25 correlaciona con una mayor cantidad de eosinófilos en algún momento.

En este trabajo se demuestra que el ligando CCL25 es inducible en condiciones de alergia en pulmón y que el receptor también se puede inducir en condiciones inflamatorias, tal vez no de manera importante como ocurre en tino, sin embargo, en este trabajo se sugiere que esta expresión es importante para reclutar a cierta población de eosinófilos. Aunque esta no es la primera vez que se demuestra que la mucosa bronquial durante el asma puede secretar CCL25, cabe mencionar que si es el primer estudio en donde se demuestra mediante un modelo murino y esto nos permitiría estudiar más a detalle si existiera algún tipo de regulación de la expresión de esta quimiocina. Esta población no parece ser importante para la sobreproducción de cierto tipo de moco ni la secreción de inmunoglobulinas; sin embargo aún queda por esclarecer el papel de esta población que puede ser modulada directa o indirectamente por la expresión del receptor CCR9 y determinar la expresión de ciertos tipos de mucinas que pudieran ser inducidos por CCR9.

X. RESUMEN DE RESULTADOS

1. En ratones sensibilizados con OVA y que son deficientes de CCR9, existe una menor cantidad de eosinófilos en lavados broncoalveolares a comparación de los ratones WT
2. El análisis histológico indica que existe menor numero de células inflamatorias en ausencia de CCR9 en el modelo de alergia pulmonar.
3. No hay diferencias en la hipersecreción de moco por las células caliciformes en ausencia de CCR9 en el modelo de inflamación alérgica pulmonar.
4. No hay diferencias en la producción de IgE e IgG1 específica para OVA en los ratones deficientes de CCR9.
5. Existe una disminución en la expresión (mARN) de CCR3 y CCL11 en tejido pulmonar en ausencia de CCR9.
6. La expresión del ligando de CCR9 (CCL25) se induce en tejido pulmonar en condiciones inflamatorias.

XI. CONCLUSIÓN

En este trabajo de investigación se analizó la participación del receptor de quimiocinas CCR9 en la inflamación alérgica pulmonar mediante un modelo murino. Se logró establecer el modelo y esto nos permitió demostrar que en los ratones sensibilizados, existe una población de eosinófilos que se ve disminuida en los lavados broncoalveolares y en tejido pulmonar de ratones deficientes de CCR9 a comparación de los ratones silvestres. Por lo tanto, se comprobó en este modelo que una población celular depende de CCR9 para migrar a pulmón en condiciones inflamatorias.

XI. REFERENCIAS

1. Janeway C. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Fifth edition. New York; 2005:673.
2. Janeway C a, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20(2):197-216.
3. Fehervari Z, Kiyono H. The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends in Immunology*. 2008;29(11):503-4.
4. Rajan TV. The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends in Immunology*. 2003;24(7):376-379.
5. Shakib F, Ghaemmaghami AM, Sewell HF. The molecular basis of allergenicity. *Trends in Immunology*. 2008;29(12):633-42.
6. Metz M, Maurer M. Mast cells–key effector cells in immune responses. *Trends in Immunology*. 2007;28(5):234-41.
7. Saenz S a, Siracusa MC, Perrigoue JG, Spencer SP, Urban JF, Tocker JE, Budelsky AL, Kleinschek M a, Kastelein R a, Kambayashi T, Bhandoola A, Artis D. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature*. 2010;464(7293):1362-6.
8. Bateman E. Global Initiative for asthma Report. 2009:1-91.
9. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. *Developed for the Global Initiative for Asthma*. 2004:469-478.
10. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. The immunopathology of extrinsic differences. 1999;(11):528-533.
11. Miller M, Levin L, Bernstein J. Characterization of a Population of Monozygotic Twins with Asthma. *Journal of Asthma*. 2005;42(5):325-330.
12. Los H, Postmus PE, Boomsma DI. Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin research : The Official Journal of the International Society for Twin Studies*. 2001;4(2):81-93.
13. Adra CN, Mao XQ, Kawada H, Gao PS, Korzycka B, Donate JL, Shaldon SR, Coull P, Dubowitz M, Enomoto T, Ozawa a, Syed S a, Horiuchi T, Khaeraja R, Khan R, Lin SR, Flinter F, Beales P, Hagihara a, Inoko H, Shirakawa T, Hopkin JM. Chromosome 11q13 and atopic asthma. *Clinical genetics*. 1999;55(6):431-7.

14. Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. *Clinical and Molecular Allergy*:2009 (7): 7-17
15. Holloway JW, Yang I a, Holgate ST. Genetics of allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S81-94.
16. Burton OT, Zacccone P. The potential role of chitin in allergic reactions. *Trends in Immunology*. 2007;28(10):419-22.
17. Peden D, Reed CE. Environmental and occupational allergies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S150-60.
18. Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Current Opinion in Pharmacology*. 2010;10(3):236-45.
19. Thornton DJ, Sheehan JK. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2004;1(1):54-61.
20. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):445-54.
21. Agrawal DK, Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2010;10(1):39-48.
22. Barrett N a, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*. 2009;31(3):425-37.
23. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature reviews. Immunology*. 2010;10(12):838-848.
24. Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*. 2006;24(4):366-8.
25. Minai-Fleminger Y, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflammation research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. 2009;58(10):631-8.
26. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annual Review of Medicine*. 2008;59:281-92.
27. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay a B, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(5):709-50.

28. Enokihara H, Nagashima S, Noma T, Kajitani H, Hamaguchi H, Saito K, Furusawa S, Shishido H, Honjo T. Effect of human recombinant interleukin 5 and G-CSF on eosinophil colony formation. *Immunology Letters*. 1988;18(1):73-76.
29. Takatsu K, Takaki S, Hitoshid Y. Interleukin-5 and Its Receptor System: Implications in the Immune System and Inflammation. In: Immunology FJDBT-A in, ed.Vol Volume 57. Academic Press; 1994:145-190.
30. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annual Review of Immunology*. 2006;24:147-74.
31. Spencer L a, Weller PF. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunology and cell biology*. 2010;88(3):250-6.
32. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;119(6):1303-10; quiz 1311-2.
33. Vandebulcke L, Bachert C, Cauwenberge P Van, Claeys S. The innate immune system and its role in allergic disorders. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2006;139(2):159-65.
34. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*. 2009;31(5):711-21.
35. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nature immunology*. 2001;2(2):108-15.
36. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Critical Care*. 2007.
37. Teran LM. CCL chemokines and asthma. *Immunology Today*. 2000;21(5):235-42.
38. Bordon Y. Chemokines: A class apart — uncovering a role for the C-chemokine. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(1):5-5.
39. Oliveira SHP, Lukacs NW. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*. 2003;36(11):1455-63.
40. Lloyd C. Chemokines in allergic airway disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 2003;3(4):443-448.
41. Murray L a, Syed F, Li L, Griswold DE, Das a M. Role of chemokines in severe asthma. *Current Drug Targets*. 2006;7(5):579-88.
42. Gonzalo J a, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot a, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle a J, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the

lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(1):157-67.

43. Lukacs NW, Oliveira SH, Hogaboam CM. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *The Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(8):995-9.

44. Zaballos Á, Gutiérrez J, Varona R, Márquez G, Ardavi C. Cutting Edge: Identification of the Orphan Chemokine Receptor GPR-9-6 as CCR9, the Receptor for the Chemokine TECK. *Receptor*. 2010.

45. Youn BS, Kim CH, Smith FO, Broxmeyer HE. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood*. 1999;94(7):2533.

46. Yu CR, Peden KWC, Zaitseva MB, Golding H, Farber JM. CCR9A and CCR9B: two receptors for the chemokine CCL25/TECK/Ck β -15 that differ in their sensitivities to ligand. *The Journal of Immunology*. 2000;164(3):1293.

47. Wurbel M-a. 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 gamma delta + gut intraepithelial lymphocytes. *Blood*. 2001;98(9):2626-2632.

48. Zlotoff D a, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz B a, Bhandoola A. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood*. 2010;115(10):1897-905.

49. Philippe J-marc, Nguyen C, Freeman T, Wooding P, Miazek A, Jordan BR, Malissen B, Carrier A, Naquet P. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9 Marc-Andr e. *Gene Expression*. 2000:262-271.

50. Svensson M, Marsal J, Ericsson A, Carramolino L, Brodén T, Márquez G, Agace WW. CCL25 mediates the localization to the small-intestinal mucosa Rapid Publication. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(8):1113-1121.

51. Letsch A, Keilholz ÄU, Schadendorf ÄD, Assfalg G, Asemissen ÄAM, Thiel E, Ä CS. Functional CCR9 Expression Is Associated with Small Intestinal Metastasis. *American Journal of Gastroenterology*. 2004:685-690.

52. Zhang X, Youxin J, Feili G. V (alpha)24-Invariant NKT cells from patients with allergic asthma express CCR9 at high frequency and induce Th2 Bias of CD3+ T cells upon CD226 engagement. *Journal of immunology*. 2005;175(49):4924-4926.

53. Elgueta R, Sepulveda FE, Vilches F, Vargas L, Mora JR, Bono MR, Roseblatt M. Imprinting of CCR9 on CD4 T cells requires IL-4 signaling in mesenteric lymph node dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2010.

54. Liu LY, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EAB. Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;112(3):556–562.
55. Jung Y-J, Woo S-Y, Jang M-H, Miyasaka M, Ryu K-H, Park H-K, Seoh J-Y. Human eosinophils show chemotaxis to lymphoid chemokines and exhibit antigen-presenting-cell-like properties upon stimulation with IFN-gamma, IL-3 and GM-CSF. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2008;146(3):227-34.
56. López-Pacheco C. *Tesis de Licenciatura*. 2009:97.
57. Rio B Del. Conferencias y jornadas. In: *Día Mundial del asma en México*. Instituto Nacional de Pediatría, Mexico, D.F; 2009.
58. Harrison J, Lukacs N. *The chemokines receptors*. (Harrison J, Luckacs N, eds.). New Jersey: Humana Press; 2007:412.
59. Palmqvist C, Wardlaw a J, Bradding P. Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *British Journal of Pharmacology*. 2007;151(6):725-36.
60. Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R RD, Mackay CR, Daugherty BL, Springer MS, Durham SR, Williams TJ K, AB. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *European Journal of Immunology*. 1997;27(12):3507-3516.
61. Rozyk KJ, Plusa T, Kuna P PE. Monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma and chronic bronchitis. Relationship to lung function tests, bronchial hyper-responsiveness and cytology of bronch. *Immunology Letters*. 1997;58(1):47-52.
62. Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respiratory Research*. 2000;1(1):54-61.
63. Bates JHT, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2009;297(3):L401-10.
64. Bates JHT, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2009;297(3):L401-10.
65. Maes T, Provoost S, Lanckacker E a, Cataldo DD, Vanoirbeek J a J, Nemery B, Tournoy KG, Joos GF. Mouse models to unravel the role of inhaled pollutants on allergic sensitization and airway inflammation. *Respiratory Research*. 2010;11:7.
66. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current Drug Targets*. 2008;9(6):485-94.

67. Shin YS, Takeda K, Gelfand EW. Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2009;1(1):10-8.
68. Shum BOV, Rolph MS, Sewell W a. Mechanisms in allergic airway inflammation - lessons from studies in the mouse. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2008;10(May 2008):e15.
69. Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005;141(2):223-9.
70. Williams TJ, Hartnell A, Conroy DM, Pease JE, Jose PJ. Eotaxin and CCR3 as therapeutic targets in asthma and allergy. *Journal of Clinical Investigation*. (18):22-25.
71. Conroy DM, Jopling LA, Lloyd CM, Hodge MR, Andrew DP, Williams TJ, Pease JE, Sabroe I. CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation. *October*. 2003.
72. Mikhak Z, Fukui M, Farsidjani A, Medoff BD, Tager AM. Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T H 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 123(1):67-73.e3.
73. Howell JE, McAnulty RJ. TGF-beta: its role in asthma and therapeutic potential. *Current drug targets*. 2006;7(5):547-65.
74. Kroegel C, Costabel U. Immune functions of constitutive pulmonary cells: the salt in the soup. *European Respiratory Journal*. 1994;7(12):2106-2107.
75. Wachtel MS, Shome G, Sutherland M, McGlone JJ. Derivation and validation of murine histologic alterations resembling asthma, with two proposed histologic grade parameters. *BMC immunology*. 2009;10:58.
76. Allen JE, Bischof RJ, Sucie Chang H-Y, Hirota J a, Hirst SJ, Inman MD, Mitzner W, Sutherland TE. Animal models of airway inflammation and airway smooth muscle remodelling in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2009;22(5):455-65.
77. Evans CM, Koo JS. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009;121(3):332-48.
78. Perez-Vilar J. Making More MUCS. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2003;28(3):267-270.
79. Kim S, Lewis C, Nadel J a. CCL20/CCR6 feedback exaggerates epidermal growth factor receptor-dependent MUC5AC mucin production in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Journal of Immunology* : 2011;186(6):3392-400.

80. Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *Journal of Immunology* :1997;158(9):4398-404.
81. Uehara S, Song K, Farber JM, Love PE. Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *Journal of immunology* .2002;168(1):134-42.
82. Kunkel BEJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW. Lymphocyte CC Chemokine Receptor 9 and Epithelial Thymus-expressed Chemokine (TECK) Expression Distinguish the Small Intestinal Immune Compartment: Epithelial Expression of Tissue-specific Chemokines as an Organizing Principle in Regional Immunity. *Memory*. 2000;192(5).
83. Hosoe N. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004;286(3):458G-466.
84. Gonzalo J a, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez-A C, Siegelman MH, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *The Journal of Clinical investigation*. 1996;98(10):2332-45.
85. Dworski R, Simon H-U, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011:1-7.
86. Watt a P, Schock BC, Ennis M. Neutrophils and eosinophils: clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Current Drug targets. Inflammation and allergy*. 2005;4(4):415-23.
87. Oosterhout a JM van, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2005;26(5):918-32.
88. Saruta M, Yu QT, Avanesyan A, R P, Targan SR, A K, Fleshner PR, Papadakis KA. Phenotype and Effector Function of CC Chemokine Receptor 9-Expressing Lymphocytes in Small Intestinal Crohn's Disease. *The Journal of Immunology*. 2010.
89. Dyer KD, Garcia-Crespo KE, Killoran KE, Rosenberg HF. Antigen profiles for the quantitative assessment of eosinophils in mouse tissues by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2011;369(1-2):91-7.

90. Meurens F, Berri M, Whale J, Dybvig T, Strom S, Thompson D, Brownlie R, Townsend HGG, Salmon H, Gerdt V. Expression of TECK/CCL25 and MEC/CCL28 chemokines and their respective receptors CCR9 and CCR10 in porcine mucosal tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006;113(3-4):313-27.

91. Robinson DS, North J, Zeibecoglou K, Ying S, Meng Q, Rankin S, Hamid Q, Tavernier J, Kay a B. Eosinophil development and bone marrow and tissue eosinophils in atopic asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1999;118(2-4):98-100.

ANEXO 1. ANÁLISIS DEL GENOTIPO Y FENOTIPO DE LOS RATONES DEFICIENTES DE CCR9

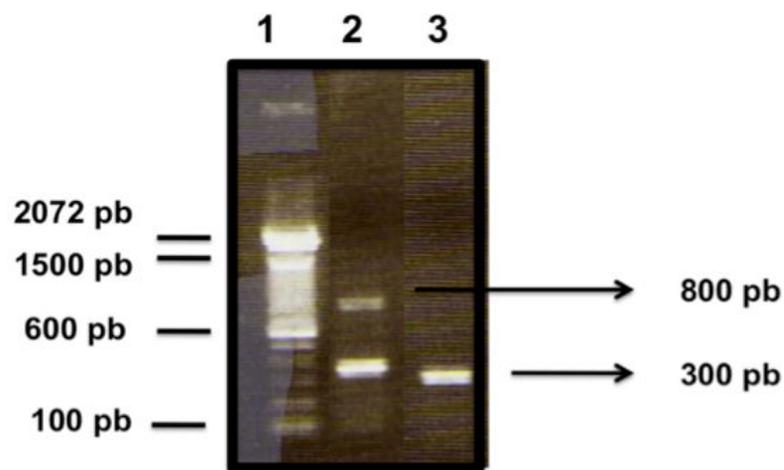


FIGURA 18. ANÁLISIS DEL GENOTIPO DE LOS RATONES UTILIZADOS. SE EXTRAJO DNA GENÓMICO A PARTIR DE LA COLA (ver metodología parte 7.1 y 7.2). El producto de CCR9 se amplificó mediante PCR. Producto CCR9 silvestre 800 pb. 1) Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). 2) Ratón CCR9 +/- .Contiene ambos productos 3) Ratón CCR9 -/-.

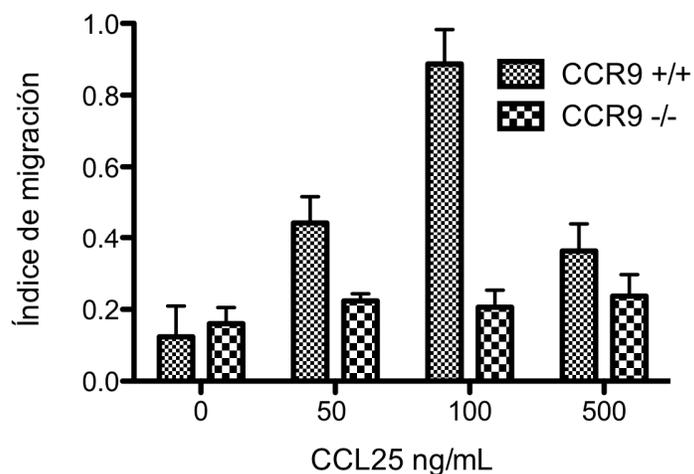


FIGURA 19. ENSAYO DE QUIMIOTAXIS. Se analizó el índice de migración inducido por CCL25 a diferentes concentraciones en los ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- .

ANEXO 2. LISTA DE OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA LA PCR EN TIEMPO REAL Y SUS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.

Condiciones de reacción:

- **Paso 1 (1 ciclo):** 50°C 2min
- **Paso 2 (1ciclos):** 95°C 10 min
- **Paso 3 (40 ciclos):** 95°C 15 seg - 55°C 45 seg - 72° 45 seg
- **Paso 4. Disociación. (1 ciclo).** 95°C 15 seg – 60°C 20 seg – 95°C 15 seg

<p>B-Actina</p> <p>Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG Antisentido: GGTCTCAAACATGATGTGGG</p> <p>Tamaño del producto: 218pb Temperatura de disociación: 83.8°C</p>	<p>CCR3</p> <p>Sentido: TTCTCACCAGGAAGAAACGGA Antisentido: GGAGGTGACTGAGGTGATTGC</p> <p>Tamaño del producto: 135 pb Temperatura de disociación: 77°C</p>
<p>CCL11</p> <p>Sentido: CTGAAGAGCTACAAAAGAATCACCAACA Antisentido: GACCCCAAGAAGAAGTGGGTCCAGGATG</p> <p>Tamaño del producto: 135 pb Temperatura de disociación: 78.3°C</p>	<p>IL-5</p> <p>Sentido ACCTTGGCACTGCTTTCTACTCAT Antisentido: AGAAACTCTTGCAGGTAGTCTAGG</p> <p>Temperatura de disociación: 82.3°C</p>

CCR9 Sentido: TCCGAAGGGATCTGGTGAAG Antisentido: GAATGAAACCCACTGGGCC Temperatura de disociación: 78 °C	CCL25 Sentido: GCCTGGTTGCCTGTTTTGTT Antisentido: CAGCAGTCTTCAAAGGCACCT Temperatura de disociación: 77°C
--	--

ANEXO 3 SOLUCIONES Y REACTIVOS

SOLUCIONES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

- Amortiguador para FACS
 - PBS 1X esteril cbp 100 mL
 - SFB 2 mL
 - Azida de sodio 0.5 mL

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE DNA

- Buffer de lisis
 - 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

- Proteinasa K
 - Proteinasa K 20 mg
 - H₂O 10 mL

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ADN y ARN

- PBS 10x
 - KCl 200mg/L
 - KH₂PO₄ 200mg/L
 - NaCl 8000mg/L
 - Na₂HPO₄ 1150mg/L
 - Agua desionizada
- Agua tratada con DEPC

0.05% de DEPC en H₂O tridestilada se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se esteriliza por autoclave.

REACTIVOS

- Proteinasa K
- Ovoalbúmina (USB)
- Ovoalbúmina (Sigma)
- Suero fetal bovino (Hyclone)
- Albúmina Sérica Bovina (Sigma-Aldrich)
- Etanol absoluto
- Inject Alum (Pierce)
- Agarosa (BIO-RAD)
- Bromuro de Etidio.
- Heparina (Sigma)
- Azul de tripano
- Anestésico Fenobarbital sódico,
- Colorante de Wright-Giemsa
(Sigma-Aldrich)
- Poli L-lisina (Sigma)
- Peroxido de Hidrógeno 1X (Pierce)
- TMB microwell (BD Optics)
- Oligo dT. (Promega)
- MMLV-reverse transcriptase
(Promega)
- dGTP, dATP, dCTP, dTTP
(100 mM) (Promega).
- SYBR green Master Mix 2X
(Applied Biosystems).

ANTICUERPOS

- Anticuerpos murinos para FACS: Anti- mCD4-Cy, Anti-mCD8-Pe, Anti- mCCR3Cy, Anti-mCCR9-FitC (R&D), Anti-mCD11b-biotinilado, Anti-mGr-1-PercP. (Biolegend)
- Anticuerpo conejo anti ratón IgE biotinilado (BioLegend, anti mouse I) (Dilución 1:150).
- Kit para ELISA IL-5 murina (Biolegend)
- Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG2a (ZyMed) (Dilución 1:1000)
- Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG1 (ZyMed) (Dilución 1:1000)