



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIADA
POR EL RECEPTOR DE QUIMIOCINAS CCR9 EN LA RESPUESTA
INMUNE A *Entamoeba histolytica*.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANA ELBA ROJAS LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. CESAR GONZALEZ BONILLA
COORDINACIÓN DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. IMSS
DR. PEDRO OSTOA SALOMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, DF. SEPTIEMBRE DE 2013



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.

DOCTORADO en CIENCIAS BIOMÉDICAS

Jurado Asignado:

Presidente:	Dr. Abraham Landa Piedra
Vocal:	Dra. María Dolores Correa Beltrán
Vocal:	Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés
Vocal:	Dra. Cecilia Ximénez García
Secretario:	Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma

Dirección de Tesis

Dr. Eduardo García Zepeda

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

La presente Tesis se realizó en el Laboratorio de Investigación de Biología de las Quimiocinas, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Durante sus estudios de doctorado la sustentante recibió apoyo económico por parte del CONACyT, con número de becario/CVU: 221369/173022.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme la oportunidad, la preparación, el espacio, los medios, l@s maestr@s, la conciencia.

Al CONACyT por apoyarme económicamente para la realización de este trabajo.

A Gisela Dupont por su increíble ayuda con el tipaje de los ratones

A Cecilia Franco por la ayuda, la disposición y las ganas de trabajar y de aprender hasta altas horas de la noche.

A Ramses Chávez por su asesoría en el manejo del Citómetro de flujo y por su siempre buena disposición de ayudar.

A la Dra. Ma. Teresa Fortoul, Verónica Rodríguez y Judith Reyes del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su invaluable ayuda con la realización de cortes histológicos y tinciones.

Al Dr. Espiridión Ramos y Mario Nequiz y al laboratorio del Dr. Ruy Pérez Tamayo en la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM, por proporcionarme los cultivos axénicos de amiba y enseñarme a realizar la inoculación intracecal.

Al Dr. Javier Ventura Juárez de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, en primer lugar, por facilitarme los tejidos humanos analizados en este trabajo, y en segundo, pero no en último, por su disposición, amabilidad y hospitalidad.

A la Dra. Selene Meza Pérez por enseñarme sus trucos y técnicas para una buena inmunohistoquímica.

A la Dra. Gloria Soldevila por su asesoría, por las críticas a mi trabajo y por los recursos técnicos y materiales con los que me apoyó.

Al Dr. Cesar González Bonilla por tener disposición de escuchar, discutir y analizar mi trabajo como miembro de mi comité tutorial.

A mis sinodales: Dr. Abraham Landa Piedra, Dra. María Dolores Correa Beltrán, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, Dra. Cecilia Ximénez García y Dr. Pedro Ostoa Saloma, por la revisión de este manuscrito y por su interés en mi trabajo.

A todos mis compañeros y amigos, miembros pasados y presentes del CBRL y del laboratorio hermano De todos y cada uno de ustedes aprendí un millón de cosas, pero sobre todo aprendí que los científicos también somos seres humanos.

DEDICATORIA.

A mi papá,
A mi mamá,
A mi hermano y hermanas,
A mis primas y primos,
A mis tías y tíos,
A mis abuelos y abuelas,
A mis amigos y amigas,
A mis compañeras y compañeros de vida.

A quienes sin buscarlo sembraron la esperanza en mi corazón.

Por que gracias a todos ustedes soy la mujer que soy:

FELIZ

Índice de contenido

RESUMEN.....	1	MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
ANTECEDENTES.....	3	Ratones.....	38
El sistema inmune asociado a mucosas.....	3	Inoculación intracecal.....	38
La Barrera epitelial.....	3	Análisis histológico del ciego de los ratones	
Estructura y función de los tejidos linfoides		infectados.....	38
asociados a la inmunidad de mucosas.....	5	PCR en tiempo real.....	39
Placas de Peyer.....	5	ELISA.....	40
Criptoplasmas.....	7	Aislamiento de linfocitos intraepiteliales (LIE) y de	
Folículos linfoides aislados.....	8	lámina propia (LLP).....	41
Nódulos linfáticos mesentéricos.....	9	Citometría de Flujo.....	42
Estructuras linfoides intestinales no organizadas..	11	Inmunohistoquímica en cortes de colon humano..	42
Linfocitos intraepiteliales.....	11	Análisis estadístico.....	43
Poblaciones linfocitarias de la lámina propia.....	14	RESULTADOS.....	44
Linfocitos B.....	14	Los ratones CCR9 -/- desarrollaron una respuesta	
Linfocitos T.....	15	inflamatoria crónica ante la infección por E.	
Linfocitos T reguladores de la mucosa intestinal..	18	histolytica.....	44
Mecanismos reguladores de las Treg		La respuesta inflamatoria observada en los ratones	
intestinales.....	20	CCR9-/- está asociada con una deficiencia en la	
Células T reguladoras CD4+Foxp3-.....	22	expresión de IL-10.....	46
Linfocitos T CD8+ con fenotipo regulador.....	22	La respuesta inflamatoria observada en los ratones	
Migración de los linfocitos T al intestino.....	24	CCR9-/- está relacionada con el incremento en la	
Papel de las integrinas.....	24	expresión de quimiocinas proinflamatorias y sus	
Las quimiocinas en la regulación de la migración de		receptores.....	50
los linfocitos T al intestino.....	25	Los ratones CCR9-/- presentan un menor	
CCR9: Código postal de los linfocitos T de intestino.		reclutamiento de linfocitos T CD4+CD25+Foxp3+ al	
.....	27	epitelio de la mucosa del ciego durante el proceso	
Participación de los linfocitos T CCR9+ en procesos		infeccioso.....	53
inflamatorios intestinales.....	28	Células CCR9+ forman parte del infiltrado	
Colitis Amibiana. Importancia de la respuesta		inflamatorio en pacientes con colitis amibiana	
inflamatoria en la progresión de la infección.....	30	fulminante.....	60
JUSTIFICACIÓN.....	36	DISCUSIÓN.....	63
HIPÓTESIS.....	37	CONCLUSIONES.....	70
OBJETIVO GENERAL.....	37	REFERENCIAS.....	71
OBJETIVOS PARTICULARES.....	37	ANEXO: Artículo publicado.....	80

RESUMEN

La amibiasis intestinal, enfermedad causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* causa alrededor de 40,000 a 100,000 muertes anuales a nivel mundial.

Estudios en modelos murinos, como en biopsias de pacientes, han permitido observar que la patofisiología de la enfermedad, tanto en su manifestación intestinal como extraintestinal, no solo es resultado de los mecanismos invasivos del parásito, si no que también la respuesta inflamatoria de hospedero tiene un papel muy importante.

La regulación de la respuesta inflamatoria de manera homeostática y en condiciones de infección, se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos. Uno de los más importantes es la diferenciación y migración de las células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ hacia los tejidos inflamados. Estas células suprimen de manera directa (contacto célula-célula) e indirecta (secreción de citocinas) las funciones efectoras de los linfocitos T activados, resolviendo la inflamación aguda.

Recientemente se ha caracterizado al receptor de quimiocinas CCR9 como una molécula importante para la migración de los linfocito T reguladores a la mucosa intestinal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de esta población celular mediante un modelo de infección intestinal en ratones deficientes del receptor CCR9. La inoculación intracecal de trofozoitos de *E. histolytica* mostró diferencias significativas en el grado de inflamación y las características del infiltrado inflamatorio entre grupos experimentales. Mientras que los ratones CCR9^{+/-} resolvieron la infección después de 7 días, los ratones CCR9^{-/-} presentaron inflamación crónica, asociada a un incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias INF- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-17 así como del las quimiocinas CCL11, CCL20 y CCL28, y de sus receptores CCR3, CCR6 y CCR10. Este fenómeno inflamatorio se vio asociado a la presencia de trofozoitos en la luz del ciego en el día 7 post infección (p.i.) y destrucción

de la mucosa del ciego hacia el día 20 p.i. De manera interesante, se observó una reducción significativa en la expresión de IL-10 en los ratones CCR9^{-/-} respecto a los CCR9^{+/-}.

La caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T aislados de la mucosa del ciego de los ratones infectados, mostró un retraso en la migración de los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ hacia el epitelio y la lámina propia del ciego en los ratones CCR9^{-/-} respecto a los CCR9^{+/-}, lo cual sugiere que estas células son importantes en la regulación de la respuesta inflamatoria ante *E. histolytica*, mediante la producción de IL-10.

El análisis de cortes de colon de pacientes con colitis amebiana fulminante, permitió evidenciar la presencia de células CCR9⁺ en el tejido infectado, lo que demuestra que estas células migran activamente a la mucosa del colon durante la infección por *E. histolytica*.

En conjunto, los resultados muestran que las células T reguladoras CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tienen un papel importante en la resolución de la inflamación en respuesta a la infección por *E. histolytica*.

ANTECEDENTES

El sistema inmune asociado a mucosas.

El tracto gastrointestinal constituye la superficie epitelial más extensa de todo el cuerpo, abarcando una superficie de alrededor de 400m²[1], lo que permite que esté en contacto con un gran cantidad de antígenos, la mayoría inocuos provenientes de los alimentos y las bacterias comensales, pero también provenientes de una gran variedad de organismos patógenos[1, 2].

La distinción entre los antígenos inocuos y los patogénicos es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, por lo que los vertebrados han desarrollado estrategias inmunes que involucran el transporte controlado de sustancias a través de la barrera epitelial intestinal asociada a mecanismos inmunes innatos y adaptativos que le permitan mantener respuestas de tolerancia ante los antígenos provenientes de los alimentos y de las bacterias comensales, y por otro lado, responder de manera rápida y eficiente ante los organismos patógenos[1-3] .

La Barrera epitelial

La barrera física constituida por el epitelio intestinal puede ser subdividida en barreras extrínsecas y barreras intrínsecas[3].

Las barreras extrínsecas limitan la cantidad de antígeno que llega a la superficie del intestino e involucran la acidez, que permite la degradación directa o mediada por enzimas de los antígenos lumbinales, la peristalsis, que permite el tránsito de los antígenos a lo largo del intestino permitiendo la absorción diferencial de los nutrientes y expulsando a los organismos patógenos, y la formación de la

capa mucosa que limita el contacto entre los microorganismos y la superficie epitelial, y captura antígenos que pudiesen sobre estimular tanto al epitelio como a las células de la respuesta inmune asociadas a este[3].

Por otra parte, la membrana apical del enterocito así como las uniones intercelulares del epitelio, constituyen las barreras intrínsecas cuya función principal es regular el paso de antígenos, agua y nutrientes a través del epitelio hacia los vasos sanguíneos linfáticos en el tejido conectivo subyacente. La membrana celular asociada a las microvellosidades apicales de la célula epitelial presenta una carga negativa, lo que restringe el paso de cationes. La membrana del enterocito que no forma parte de las vellosidades, es un bicapa lipídica clásica que presenta receptores y canales específicos para diversas moléculas, que regulan el paso de las mismas al interior del enterocito. Los antígenos que atraviesan la membrana apical son procesados enzimáticamente y transportados en vesículas a la membrana paracelular del enterocito, facilitando su presentación a células del sistema inmune localizadas entre las células epiteliales[3]. Las uniones intercelulares entre las células epiteliales, también constituyen una barrera muy importante al paso selectivo de moléculas a través de la barrera epitelial restringiendo el paso de moléculas pequeñas de hasta 2kDa[4].

Además de constituir una barrera física, el epitelio intestinal secreta una gran cantidad de péptidos antimicrobianos de amplio espectro como las defensinas, las catelicidinas y las calprotectinas, los cuales inducen la formación de poros en las paredes bacterianas, limitando así el contacto de los microorganismos con las células del epitelio y manteniendo la integridad de la barrera epitelial[3, 4].

El epitelio intestinal cumple también un papel muy importante en el montaje de respuestas inmunes innatas ante los organismos patógenos.

Estructura y función de los tejidos linfoides asociados a la inmunidad de mucosas.

El tejido linfoide asociado a las mucosas es el compartimiento inmune más extenso del cuerpo, con más linfocitos presentes que los existentes en todos los órganos linfoides secundarios juntos . Tan solo el 60% de estos linfocitos se localizan en el intestino delgado[1, 5] .

El tejido linfoide asociado a mucosas (GALT; “gut associated lymphoid tissue”) se puede dividir en sitios efectores no organizados, que incluyen la lámina propia y los linfocitos intraepiteliales (IEL), y estructuras organizadas como los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN), las placas de Peyer (PP), folículos linfoides aislados (ILF) y las criptoplasmas (CP). Se ha propuesto que estas estructuras organizadas juegan un papel tanto de órganos linfoides primarios encargados de la diferenciación extratímica de los linfocitos (CP), como de órganos linfoides secundarios relacionados con la inducción de la respuesta inmune de mucosas (MLN y PP e ILF)[6].

Placas de Peyer.

Las estructuras asociadas al GALT más ampliamente estudiadas son las placas de Peyer (PP), localizadas en el intestino delgado [5, 6]. Originalmente descritas en 1677 por Joseph Hans Conrad Peyer[6], estas estructuras submucosas se pueden encontrar a lo largo del intestino delgado del ratón, mientras que en el humano se localizan principalmente en el íleo [5, 6].

Las PP se caracterizan por presentar una estructura de domo, carente de vasos linfáticos aferentes, que contiene células B comprometidas a la diferenciación de plasmablastos productores de IgA, linfocitos T, células dendríticas (CD) y macrófagos. Hacia la cara luminal, la PP está cubierta por un epitelio modificado llamado epitelio asociado al folículo (EAF). El EAF está constituido principalmente por células epiteliales de microvellosidades irregulares y acortadas denominadas células

M (“microfold”) las cuales se especializan en el transporte de antígenos completos hacia la PP. Los antígenos transportados por las células M son entregados a las CD, localizadas en el domo subepitelial, las cuales los procesan y los presentan a los linfocitos T[5, 6] .

Se han identificado al menos tres tipos de células dendríticas dentro de las PP: las células dendríticas mieloides CD11b+, las células dendríticas linfoides CD8 α +, y las células dendríticas dobles negativas[4]. Las CD mieloides, localizadas en el domo subepitelial, presentan un fenotipo inmaduro asociado a la carencia de marcadores como DEC-205. Para ubicarse en esta región de la PP, estas células requieren de la expresión del receptor de quimiocinas CCR6, el cual les permite responder a CCL20 producido en altas cantidades de manera homeostática por las células epiteliales del FAE[7] . Al captar antígenos, las CD mieloides maduran y migran hacia las zonas interfoliculares de las PP y de los MLN donde interaccionan con los linfocitos T. En respuesta a antígenos derivados de patógenos estas células polarizan la respuesta de los linfocitos T hacia Th2, mientras que al interaccionar con antígenos de los alimentos, estas CD producen citocinas como IL-10 y TGF- β las cuales están involucradas en la inducción de la tolerancia oral mediada por linfocitos Th3 y T reguladores[4].

Por otra parte, las CD linfoides y dobles negativas, inducen la diferenciación de los linfocitos T hacia Th1 [4].

Los linfocitos de las PP están organizados de manera similar a lo observado en los nódulos linfoides periféricos en zonas de B y T. Los centros germinales o zonas B contienen principalmente linfocitos B con IgA asociado a membrana, mientras que las zonas T contienen en su mayoría linfocitos T CD4⁺CD8⁻ $\alpha\beta$ TCR. Alrededor del 65% de estos linfocitos T presentan un fenotipo activado, mientras que el 35% son precursores de linfocitos citotóxicos [8, 9] .

En el ratón, la formación de las PP se da de los días 15 a 17 de desarrollo embrionario. La

migración de los linfocitos hacia las PP ocurre a los dos días después del nacimiento. A partir del día 4 después del nacimiento, es posible observar a las PP completamente formadas. En este proceso de maduración de las PP, la presencia de antígenos provenientes de los alimentos y de la flora comensal es muy importante, dado que en ratones mantenidos en condiciones libres de patógenos no desarrollan la estructura de domo observada en ratones no sometidos a condiciones de barrera. En el caso de los humanos, la formación completa de las PP ocurre en el periodo prenatal, siendo aparentes desde la semana 14 de gestación[5, 6] .

Criptoplasmas.

Las criptoplasmas (CP) son grupos poco organizados de alrededor de 1000 células localizadas en la base de las criptas del epitelio intestinal que se distribuyen de manera azarosa a lo largo del tracto intestinal del ratón siendo más abundantes en el intestino delgado que en el colon. Hasta el momento, estas estructuras no se han identificado en el humano[5, 6] .

Estas estructuras, desprovistas de linfocitos T y B maduros, están formadas principalmente por células que carecen de marcadores de linaje (lin^-), que expresan el receptor del factor de células troncales (SCF; stem cell factor) $c-kit^+$ y el receptor de IL-7, así como por subpoblaciones de células similares a linfocitos inmaduros $CD122^+$ ($IL-2R\beta$), $CD24^+$ (HSA) y $CD44^+$. A su vez, estas células se encuentran limitadas por células dendríticas (CD) $CD11c^+$ y células estromales $VCAM-1^+$ [5, 6] .

El desarrollo de las CP concluye varias semanas después del nacimiento. La presencia de estas estructuras en ratones RAG $^{-/-}$ que carecen de linfocitos T y B, así como en ratones silvestres mantenidos en condiciones libres de patógenos, hace pensar que la formación de la CP está determinada genéticamente y no es inducida por respuestas adaptativas a flora comensal intestinal[10].

Los marcadores de diferenciación expresados en la superficie de las células $lin^- c-kit^+$, llevaron

inicialmente a relacionar a estas células con los precursores comunes de linfocitos (CLP; common lymphocyte precursors) y a proponer a las CP como sitios de diferenciación extratímica de subpoblaciones de linfocitos T [11]. Las principales evidencias relacionadas con esta función, se han observado en experimentos de transferencia de células purificadas de las CP a ratones linfopénicos, teniendo como consecuencia la formación de CP y la posterior aparición de IEL[12].

Sin embargo, la identificación de ROR γ t como factor fundamental en la formación de la CP, así como la presencia de poblaciones IEL normales en los ratones ROR γ t^{-/-}[13], llevó a proponer a las células lin⁻ c-kit⁺ como análogas de las células fetales inductoras de tejido linfoide en el intestino adulto, lo que les confiere el potencial de generar estructuras linfoides más organizadas a lo largo de la vida del individuo[11].

Folículos linfoides aislados.

Los folículos linfoides aislados (ILF; “isolated lymphoid follicles”) están formados mayoritariamente por linfocitos B naïve foliculares CD23⁺ IgM^{low} IgD^{hi} CD5⁻ y por linfocitos B IgA⁺ los cuales constituyen un centro germinal rodeado por CD CD11c⁺. Los ILF contienen linfocitos T, sin embargo carecen de una zona T definida. Al igual que las PP, los ILF están asociados a FAE que contiene células M [6].

Dado a que además de las células descritas contienen porcentajes variables de células lin⁻ c-kit⁺ IL-7Ra⁺, se ha propuesto que estas estructuras son resultado de la maduración de las CP ante estímulos antigénicos inducidos por la flora comensal y los alimentos[11].

La inducción de la formación de los ILF por las bacterias comensales depende del reconocimiento

de moléculas de peptidoglicano a través de NOD-1, expresado por las células epiteliales, así como la activación de las células lin- c-kit+ y el reclutamiento de los linfocitos B mediados por el receptor de quimiocinas CCR6 [14, 15] .

Al presentar una estructura similar a la de las PP, se ha propuesto que los ILF cumplen una función como tejido linfoide secundario encargado, de manera particular, de la generación de respuestas de producción de anticuerpos IgA. Se ha reportado que en ratones carentes de PP, los ILF son suficientes para el desarrollo de respuestas IgA específicas ante *S. tiphymurium* [6].

Nódulos linfáticos mesentéricos.

Los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) son los ganglios linfáticos más grandes del cuerpo y los primeros en desarrollarse durante la embriogénesis. En el ratón, la formación de los MLN ocurre entre los días 10.5 y 15.5 de gestación [6].

La estructura de los MLN es la misma que la de los ganglios linfáticos periféricos y de las PP, sin embargo, los factores que regulan su desarrollo no son los mismos. A diferencia de lo que ocurre con las PP, la formación de las MLN depende de TRANCE (citocina inducida por la activación relacionada al TNF), citocina miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Esto ha sido demostrado en ratones deficientes de TRANCE y de su receptor, los cuales desarrollan nódulos linfáticos cervicales, PP y bazo, pero no MLN. La función que ejerce TRANCE involucra la agrupación de células CD45+CD4+CD3- en los primordios del ganglio[16].

La función principal de los MLN es la generación de respuestas celulares en respuesta a los antígenos de la luz del intestino[6]. Se ha propuesto que la activación de linfocitos T y B dentro del

MLN ocurre mediante tres mecanismos principales: el primero es a través de la migración de células dendríticas maduras e inmaduras provenientes de la lámina propia (LP) o las PP, mediada por los receptores de quimiocinas CCR7 y CCR6 respectivamente [17], el segundo involucra la migración de linfocitos T activados también en la LP y en las PP a través de los vasos linfáticos aferentes hacia los MLN, mientras que el tercer mecanismo involucra la entrada de antígenos solubles al MLN donde son presentados por las CD locales [2]. Una vez que los linfocitos son activados, estos salen del MLN por el torrente sanguíneo, atraviesan el ducto torácico, y regresan a la LP del intestino para ejercer sus funciones efectoras [2, 6] .

Las condiciones inflamatorias en el intestino son determinantes en el fenotipo de los linfocitos activados en el MLN. Sin embargo, en condiciones no inflamatorias, la estimulación de células de los MLN con antígenos solubles lleva a la producción de citocinas reguladoras y de tipo Th2 como IL-10 e IL-4. Esto resalta la importancia de los MNL en la regulación de las respuesta inmune en el intestino y en el establecimiento de la tolerancia oral. Se ha reportado que ratones carentes de PP pero que tienen MLN, pueden desarrollar respuestas de tolerancia oral adecuadas, Mientras que en la ausencia de ambas estructuras, la tolerancia no se desarrolla[2, 6] .

Los MLN también son importantes en el mantenimiento de la barrera epitelial, dado a que se ha observado la presencia de bacterias comensales en el bazo de ratones que no tienen estas estructuras [5].

Estructuras linfoides intestinales no organizadas.

Linfocitos intraepiteliales.

Las células inmunes localizadas en el epitelio intestinal corresponden en un 90% a linfocitos T. Estos linfocitos intraepiteliales (LIE) está representados por dos tipos de linfocitos denominados Tipo a y Tipo b [18-20] .

Los linfocitos tipo a comprenden a linfocitos T $CD4+TCR\alpha\beta+$, $CD8\alpha\beta+ TCR\alpha\beta+$, comúnmente representados en la sangre y en los órganos linfoides periféricos, mientras que los linfocitos Tipo b están constituidos por poblaciones únicas de las superficies mucosas que se caracterizan por la expresión de homodímeros de la cadena α del CD8 ($CD8\alpha\alpha$). Estos linfocitos expresan tanto $TCR\alpha\beta$ como $TCR\gamma\delta+$ y pueden llegar a coexpresar la molécula CD4. La población $CD8\alpha\alpha+$ presenta además la característica particular de ser negativa para los marcadores CD2, CD28, CTLA-4 y Thy-1, comúnmente expresados en los linfocitos Tipo a [18-20] .

Aunque en menor porcentaje, en el epitelio también se encuentran representadas poblaciones $CD4-CD8-(DN) TCR\alpha\beta+$ [18-20], NKT [21] y NK [22] .

Las distintas subpoblaciones de LIE se distribuyen de manera diferente a lo largo del tracto intestinal tanto en el ratón como en el humano. Mientras que en el intestino delgado predominan las poblaciones Tipo b, en particular las $CD8\alpha\alpha+ TCR\gamma\delta+$, en el colon, prevalecen los linfocitos Tipo a, siendo las células $CD4+$ y DN, las más abundantes [23, 24].

La predominancia de fenotipos activados respecto a los no activados dentro de las subpoblaciones de LIE también varía según su localización en el intestino. El mayor porcentaje de LIE del intestino delgado presentan un fenotipo de células activadas de memoria $CD69+$, mientras que en el colon, la

mayor parte de LIE presentan un fenotipo no activado CD62L^{hi} y CD44^{int}[24].

Como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que los LIE del intestino se generan extratímicamente en las criptoplasmas[11]. Sin embargo, se ha demostrado que una proporción importante de los LIE CD8⁺ proviene del timo [25-27] . Estos linfocitos, denominados migrantes tímicos recientes, mantienen la expresión del receptor de quimiocinas CCR9, importante para la migración a las diferentes regiones del timo durante su diferenciación y maduración, y aumentan la expresión de las integrinas $\alpha 4\beta 7$ y αE , lo cual les permite entrar a la mucosa intestinal sin ser previamente activados en los MLN y las PP. Una vez en el intestino, los migrantes tímicos recientes comienzan a proliferar y a adquirir las características de los LIE residentes [25] . Se ha propuesto que estas células pudiesen constituir alrededor del 50% de los LIE CD8⁺ totales en el intestino delgado. En el colon no se ha analizado la presencia de estas células [20].

El análisis microscópico de los LIE ha permitido observar que estas células, a diferencia de las poblaciones de linfocitos T residentes en resto de las estructuras del GALT, presentan una gran cantidad de gránulos que contienen perforina y granzima A . Esta característica, junto con el fenotipo de células efectoras de memoria que presentan, han permitido proponer que una de las principales funciones de los LIE, en el intestino delgado, son las respuestas citotóxicas ante patógenos y ante células infectadas[1]. Se ha demostrado que los LIE CD8 $\alpha\beta$ ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ muestran una actividad citotóxica en infecciones causadas por *Toxoplasma gondii* [28-30], reovirus [31] y LCMV[32, 33]. Dicha actividad está mediada tanto por el contenido de sus gránulos, como por la ruta de inducción de muerte Fas/Fas-Ligando[34].

Ensayos in vitro, así como ensayos de inmunohistoquímica, han mostrado que las diferentes poblaciones de LIE expresan citocinas como IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-1 y TGF- β [1]. En particular la

secreción temprana de IFN- γ y TNF- α se ha vinculado con la resolución de la infección por *Cryptosporidium parvum* [35] y *Emeria vermiformis* [36]. El papel de las citocinas secretadas por los LIE también se ha vinculado con la polarización de respuestas tipo Th1 y Th2 en procesos infecciosos. Durante la infección por *Trichuris muris* [37] y *Giardia lamblia* [38], se ha observado que un mayor reclutamiento de linfocitos CD8+ intraepiteliales de fenotipo citotóxico y Th1, contribuyen al desarrollo de patofisiología asociada a la infección, mientras que un mayor porcentaje de CD4+ intraepiteliales se ha correlacionado con el desarrollo de respuestas protectoras de tipo Th2. En el caso de la infección por *Toxoplasma gondii*, la migración de LIE de fenotipo Th1, mediada por el receptor de quimiocinas CCR2, se ha vinculado a la progresión de la infección [29].

Los mecanismos por los cuales se inducen estas respuestas efectoras, son poco claros. Ensayos *in vitro* en cocultivos de LIE con líneas celulares epiteliales han demostrado que la presentación antigénica mediada por el epitelio es deficiente dado a que los LIE presentan respuestas proliferativas escasas e incluso anergia. Esto se ha asociado con la capacidad limitada de las células epiteliales en la presentación de antígenos mediada por moléculas de MHC así como la ausencia de señales coestimuladoras por CD80/CD86 carentes en los enterocitos [39]. Estas evidencias han llevado a proponer que otra función importante de los LIE es el mantenimiento de la tolerancia oral y la regulación de las respuestas inmunes en el intestino. Se ha reportado que la secreción de citocinas como TGF- β e IL-10 son importantes en la resolución de la inflamación asociada a la infección por *T. gondii* y *E. vermiformis*. En particular, TGF- β se ha visto directamente relacionado con la inducción de la expresión de proteínas de uniones estrechas en las células epiteliales intestinales en estos modelos de infección, permitiendo la reconstitución de la barrera epitelial[30, 40].

Por otra parte se ha demostrado que los LIE TCR $\gamma\delta$ + también son importantes en el mantenimiento de la barrera epitelial. Estas células secretan factores de crecimiento del epitelio[1] y

regulan la formación de uniones estrechas entre las células epiteliales[30, 40]. Sin embargo, sus funciones parecen no estar restringidas. Estas células han demostrado tener prepuestas citotóxicas eficientes in vitro [41], mientras que en modelos de sepsis se ha visto que son importantes en la inducción de las respuestas Th1, dado a que ratones carentes de estas células presentan menores niveles de TNF- α , IL-6 e IL-1 en el intestino[42].

En un panorama más general, las funciones de los LIE estarían limitadas por el microambiente y tendrían un papel dual. Por una parte los LIE CD8 $\alpha\beta$ + y los CD4+ estarían principalmente encargados de respuestas efectoras citotóxicas importantes en la eliminación de patógenos y de células infectadas, mientras que las poblaciones CD8 $\alpha\alpha$ + en particular las TCR $\gamma\delta$ +, tendrían un papel primordial en el mantenimiento de la barrera epitelial y en la regulación de las respuestas inflamatorias.

Poblaciones linfocitarias de la lámina propia.

En la lámina propia del intestino se encuentran dispersas poblaciones mononucleares, comprendidas por macrófagos y células dendríticas, poblaciones granulocíticas, que incluyen a eosinófilos y mastocitos principalmente, y poblaciones linfocitarias T y B. Cada una de estas poblaciones contribuye de manera complementaria en el montaje de respuestas inflamatorias y en la regulación de las mismas manteniendo la homeostasis del intestino.

Linfocitos B.

En la lámina propia del intestino delgado y el colon se encuentran células plasmáticas y linfocitos T efectores de memoria. Estas células migran hacia la lámina propia a través del ducto torácico una vez que han sido activadas en las estructuras organizadas del GALT[6].

Las células plasmáticas presentes en la lámina propia expresan en su mayoría (80-90%) IgA multimérica, la cual es fundamental para el control de la interacción de los microorganismos comensales y patógenos con el epitelio intestinal[43].

Las células plasmáticas IgA⁺ presentan un fenotipo diferenciado CD38⁺CD27⁺CD19^{+/-}CD20⁻. Dentro de esta población, es posible encontrar algunas células IgA⁺CD27⁺ de memoria con bajos niveles de expresión de CD40, cuya proliferación y secreción de IgA ha sido demostrada en cultivos celulares estimulados con anti-CD40[44].

La mayoría de las células plasmáticas de intestino provienen de los linfocitos convencionales B2, sin embargo, se ha demostrado que alrededor del 40 al 50% de estas células provienen de linfocitos B1 peritoneales. Se ha propuesto que la diferenciación de los linfocitos B1 hacia células plasmáticas IgA⁺ ocurre en la lámina propia y que es inducida por células dendríticas que se caracterizan por la expresión del receptor de quimiocinas CX3CR1[43].

También se ha observado la salida directa de las células plasmáticas de las PP y los folículos linfoides aislados hacia la lámina propia. Sin embargo, estas células plasmáticas expresan mayoritariamente IgG [43].

Linfocitos T

A diferencia de las poblaciones de LIE, los linfocitos T de la lámina propia (LLP) presentan un ratio CD4:CD8 similar al observado en órganos linfoides periféricos, con una predominancia de linfocitos T CD4⁺ cooperadores (Th) y una población reducida de linfocitos T CD8αβ⁺ citotóxicos. Los LLP se caracterizan por expresar un fenotipo de linfocitos efectores de memoria CD45RO⁺/CD45RB^{low}CD44^{hi}L-selectin^{low}a4b7^{hi}.

Algunas poblaciones de linfocitos T no convencionales, se encuentran también representadas en los LLP. Tal es el caso de las células NKT invariantes, y los linfocitos T invariantes asociados a mucosas, que interactúan con moléculas MHC no clásicas[20].

Dentro de las de las poblaciones CD4+ presentes se encuentran subpoblaciones de diferentes perfiles Th, junto con células de fenotipo regulador. Los fenotipos Th prevalentes en la lamina propia son Th1 y Th17, mientras que las Th2 son escasas en el intestino no inflamado[45].

Los procesos involucrados en la diferenciación de células Th1 en el intestino no inflamado aún no están muy claras. Las células presentadoras de antígeno (CPA) intestinales expresan homeostáticamente IL-23, a diferencia de las CPA en bazo o ganglios periféricos que expresan IL-12, citocina principalmente involucrada en la diferenciación hacia Th1 [46]. Esta observación ha llevado a proponer que los linfocitos T Th1 presentes en la lámina propia, en condiciones no inflamatorias, se desarrollan por un mecanismo alternativo mediado por IL-23, o bien que se activan en órganos linfoides periféricos, principalmente los NLM, antes de ingresar a la lámina propia[45].

Por otra parte, ratones deficientes del receptor de IL-27, presentan bajos porcentajes de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ , así como un incremento en el porcentaje de linfocitos Th17 en la lámina propia, por lo que esta citocina no solo es importante para la diferenciación hacia Th1, si no también para el control de la diferenciación hacia el fenotipo Th17[47].

Las células de fenotipo Th17, se caracterizan por la expresión de las citocinas IL-17, IL-21 e IL-22, las cuales intervienen en el reclutamiento de neutrófilos a las superficies mucosas, y al mantenimiento de la función de barrera del epitelio intestinal. La adquisición de este fenotipo, requiere la activación secuencial del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y el receptor nuclear huérfano relacionado con el receptor de ácido retinóico (ROR) γ t, por la actividad sinérgica de las

citocinas IL-6 y TGF- β [48]. Aunque el estímulo antigénico que da origen a este fenotipo efector es controversial, se sabe que las células dendríticas CD11c^{hi}CD11b⁺CD103^{lo}CX3CR1^{hi} de la lámina propia del intestino delgado [49], así como las células dendríticas CD11^{lo}CD70^{hi} de la lámina propia del colon[50] son importantes en la inducción del fenotipo Th17, dado que expresan la integrina $\alpha v\beta 8$, la cual une a pro-TGF- β y puede liberarlo en su forma activa [51].

Linfocitos T reguladores de la mucosa intestinal.

Diferentes modelos de inflamación aguda y crónica, y de infección, han demostrado que tanto respuestas de tipo Th1 como Th17, pueden ser dañinas en ausencia de mecanismos celulares y humorales que regulen dichas respuestas. Este proceso de “apagado” de las repuestas efectoras y regreso a la homeostasis, está mediado tanto por células de origen hematopoyético, como no hematopoyéticas a través de la secreción de citocinas tales como IL-10 y TGF- β . En particular, dentro de los linfocitos residentes en la lámina propia, se encuentran poblaciones denominadas reguladoras las cuales ejercen funciones individuales y redundantes para controlar las respuestas inmunes en el intestino[52].

Existen diferentes poblaciones de linfocitos T en el intestino que son capaces de secretar citocinas reguladoras como IL-10 bajo determinados microambientes inflamatorios, y por lo tanto contribuir a la resolución de las respuestas inmunes efectoras. Sin embargo, las células denominadas convencionalmente linfocitos T reguladores (Treg), están representados por una subpoblación CD4+ que se caracteriza por la expresión del factor de transcripción Foxp3[53]. La importancia de la expresión de este factor de transcripción se ve evidenciado por el desarrollo de poliendocrinopatía, enteropatía y síndrome ligado al cromosoma X (IPEX) en pacientes con mutaciones en el gen *FOXP3*. El IPEX es un síndrome autoinmune que afecta principalmente la piel y las glándulas endocrinas. Sin embargo en un alto porcentaje de estos pacientes, el intestino también se ve afectado, lo que resalta la importancia de las células Treg en el mantenimiento de la homeostasis en el intestino[54].

En el ratón, la población T reguladora Foxp3+ se encuentra enriquecida dentro de la población de linfocitos CD4+ activados CD45RB^{low}, en particular dentro de la población CD25+[55]. La

transferencia de estas células a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) ratones inmunodeficientes RAG^{-/-} previenen el desarrollo de colitis en el modelo de transferencia de linfocitos T CD4⁺CD45RB^{high}[52].

La diferenciación de las células Treg ocurre tanto en el timo, como en el tejido linfoide asociado al intestino. Se ha propuesto que la generación de células Treg en el timo depende del reconocimiento de antígenos propios de afinidad alta por el TCR de estas células. Esto conlleva a que estas células muestren un repertorio de moléculas de TCR restringido y diferente al observado en los linfocitos T convencionales[56]. Aún se desconocen los mecanismos que regulan la supervivencia versus la muerte de estos linfocitos durante este proceso, sin embargo recientemente se ha demostrado que algunos de los antígenos que inducen la diferenciación de las Treg son derivados de la autofagia de las células estromales tímicas. Después de la estimulación vía TCR, los precursores de Treg deben recibir señales coestimulatorias a través de CD28 y entrar en contacto con las citocinas IL-2 y IL-5, que le permite activar Stat5 e inducir la expresión de Foxp3.

Una vez que salen del timo, estas células, denominadas Treg naturales, pueden migrar hacia diferentes órganos, dependiendo del patrón de expresión de receptores de quimiocinas que presenten.

En la lámina propia del intestino, en los NLM y en las PP, las células dendríticas y los macrófagos intestinales son capaces de inducir la expresión de Foxp3 en linfocitos T CD4⁺ a través de la presentación de antígenos administrados por vía oral[57]. La generación de estas células Treg inducidas o adaptativas puede ocurrir de manera independiente a la ausencia de las células Treg naturales[58].

Las células CD4⁺ vírgenes se pueden diferenciar a linfocitos Treg adaptativos cuando son activados por estimulación transitoria del TCR, o por estimulación del TCR en presencia de TGF- β e IL-2 y la ausencia de citocinas proinflamatorias[59]. El ácido retinóico cumple también un papel muy

importante en este proceso ya que promueve la inducción de la expresión de Foxp3 mediada por TGF- β [52]. Este metabolito de la vitamina A es producido por las células dendríticas CD103+ de los NLM y por las células dendríticas CD11c+ de las placas de Peyer y la lámina propia del intestino delgado, no así por las células dendríticas de bazo o ganglios periféricos, siendo estas últimas ineficientes en la diferenciación de Treg intestinales [59].

Mecanismos reguladores de las Treg intestinales.

Los mecanismos de regulación ejercidos por las células CD4+CD25+Foxp3+ involucran tanto la participación de citocinas, principalmente IL-10 y TGF- β , como el contacto célula-célula. Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes y en muchos casos son redundantes[52].

Se ha observado que los ratones con delección específica del gen de IL-10 en la población Treg, desarrollan una colitis moderada[52, 59], mientras que los ratones ratones IL-10 $-/-$ desarrollan colitis espontáneamente a partir de los tres meses de edad, la cual progresa en severidad durante la vida del ratón [52, 59, 60]. Estas evidencias destacan la importancia de la producción de esta citocina, tanto por las células Treg, así como por el resto de células hematopoyéticas, las células epiteliales y los fibroblastos del intestino en el control de las respuestas inmunes locales. En este respecto, se ha demostrado que las células Treg provenientes de ratones deficientes de IL-10 son capaces de prevenir el desarrollo de colitis en el modelo de transferencia de linfocitos T, sin embargo, estas células son menos eficientes en la resolución de la colitis ya establecida en este mismo modelo, así como en la prevención de la inflamación intestinal inducida en respuesta a microorganismos, donde probablemente sea necesaria la regulación mediada por IL-10 producida por las células estromales del intestino[52, 55].

A diferencia a lo observado para IL-10, ha sido difícil demostrar el papel específico de el TGF- β

producido por las Treg en el control de la respuesta inflamatoria, dado a que esta citocina se expresa de manera constitutiva en el intestino[52]. Sin embargo, se sabe que las Treg pueden promover la activación de TGF- β ya que expresan trombospondina y furina, que pueden cortar a pro-TGF- β a su forma funcional [59]. En el caso de la trombospondina, se ha demostrado que una población enriquecida en la expresión de ésta proteína se encuentra representada tanto en la población CD4+CD25+CD45RB^{low}, cómo en la población CD4+CD25-CD45RB^{low}, siendo ambas capaces de prevenir la colitis inducida por la transferencia de linfocitos T [61]. Por otra parte, aunque ratones que carecen de la expresión de furina en los linfocitos T, presentan un mayor porcentaje de Treg en el intestino, estos desarrollan colitis a partir de los seis meses de edad, como resultado de procesos reguladores deficientes dependientes de TGF- β [62].

Con respecto a los mecanismos de regulación por interacción célula-célula, el antígeno citotóxico del linfocito T (CTLA) 4, molécula inhibitoria, similar a CD28 expresada por los linfocitos T activados, se ha identificado como un importante participante de este proceso [63, 64]. El bloqueo de CTLA-4 con anticuerpos en los Treg, así como las Treg deficientes de esta molécula, reduce la capacidad protectora de estas células en modelos de colitis por transferencia de linfocitos T [64]. En los humanos, se ha observado el desarrollo de enterocolitis durante pruebas clínicas donde se bloquea CTLA-4, lo que sugiere que esta molécula también está involucrada en la regulación mediada por la Treg en el intestino humano [65]. Los eventos específicos relacionados con la regulación mediada por CTLA-4, no han sido propiamente descritos, sin embargo, se ha propuesto que la activación de esta molécula podría inducir la expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por la Treg tal como hace en las células dendríticas, o bien regular negativamente la expresión de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígeno, reduciendo así la capacidad de estas células de activar a los linfocitos T vírgenes [52].

Células T reguladoras CD4+Foxp3-

Identificados también como linfocitos Tr1, las células T reguladoras CD4+Foxp3- expresan IL-10 y TGF- β , CTLA-4 de manera similar a las células Treg CD4+CD25+Foxp3+. También se ha demostrado que producen IL-17 e IL-22, citocinas que, como se mencionó anteriormente, intervienen en el mantenimiento de la barrera epitelial [52, 59]. Sin embargo, se desconocen los marcadores superficiales que definen a esta población, por lo que se ha propuesto que pudiesen representar a linfocitos CD4+ de diferentes subpoblaciones efectoras, cuya diferenciación en cultivo es promovida por IL-10[66].

Se ha demostrado que estas células regulan diferentes procesos inflamatorios entre ellos la colitis inducida por transferencia de linfocitos T, a través de un mecanismo IL-10 dependiente[66, 67]

Los linfocitos Tr1 son particularmente abundantes en la lámina propia del intestino delgado, por lo que probablemente son la principal fuente linfoide de IL-10 en este tejido, contrario a lo que se observa en el colon, donde las Treg producen mayoritariamente estas citocina [59].

Linfocitos T CD8+ con fenotipo regulador.

Estudios recientes han evidenciado, que no solo las poblaciones de linfocitos T CD4+ tienen un papel importante en la regulación de las respuestas inflamatorias, si no que también las poblaciones CD8+ pueden ejercer esta función a través de la secreción de citocinas como TGF- β e IL-10, así como mecanismos de citotoxicidad dirigidos hacia la células presentadoras de antígeno y hacia los linfocitos activados[52].

Las poblaciones CD8+ descritas como reguladoras se caracterizan por un repertorio de TCR

restringido cuyo reconocimiento de antígenos está mediado por moléculas de MHC clase I no clásicas, como es el caso de Qa-1 en el ratón [52] y Cd1 [39].

El papel regulador de las poblaciones CD8⁺ también se ha demostrado en el modelo de colitis por transferencia de linfocitos T. En este modelo, la transferencia de linfocitos CD8⁺CD28⁻ aisladas de bazo y de lámina propia, son capaces de prevenir al colitis mediante la secreción de IL-10 [68]. Estas células pudiesen tener también un papel regulador importante en el humano, dado a que pueden aislarse en grandes números de la lámina propia del intestino sano, no así del intestino de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), donde estas células son muy escasas [69].

Los linfocitos intraepiteliales (LIE) CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ son también capaces de producir IL-10. Se ha demostrado que estas células son también capaces de prevenir el desarrollo de colitis por transferencia de linfocitos T [70].

Recientemente se ha descrito la existencia de linfocitos T CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ en la sangre y en tumores de pacientes con cáncer colorectal[71], así como en bazo y NLM de ratones que expresan autoantígenos en el intestino[72]. Estas células se caracterizan por la baja expresión de citocinas como IL-6, IFN- γ y TNF- α , y son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes en presencia de antígeno. Al igual que las Treg CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺, estas células expresan CD103, CTLA-4, y la expresión de Foxp3 es inducida por las células dendríticas intestinales y mediada por el TGF- β y el ácido retinóico[72].

Migración de los linfocitos T al intestino

Papel de las integrinas.

La población de las estructuras linfoides organizadas del GALT, y de la lámina propia, requiere de la firme adhesión de los linfocitos a las vénulas del endotelio alto de las PP y los NLM y a las vénulas postcapilares de la lámina propia mediada principalmente por integrinas de la familia $\beta 7$ [73, 74].

Los linfocitos T y B vírgenes, así como la mayoría de los linfocitos T $CD8\alpha^+$ emigrantes tímicos recientes expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$ constitutivamente. La activación de estas células en las PP y los NLM, aumenta la expresión en superficie de esta integrina permitiendo que los linfocitos interactúen con su ligando MAdCAM-1, altamente expresado en las vénulas postcapilares de la lámina propia [73, 74]. La neutralización de $\alpha 4$, $\beta 7$, del heterodímero o de MAdCAM-1, mediante el uso de anticuerpos, reduce la entrada de los linfocitos al intestino del ratón, pero no la migración de estas células hacia el hígado, la piel y los pulmones [75]. Por otra parte, los ratones deficientes tanto de la subunidad $\beta 7$, como del ligando MAdCAM-1, presentan menor celularidad en las PP, así como un número reducido de LLP y LIE[74].

Una vez que entran a la lámina propia del intestino, los linfocitos reducen la expresión superficial de $\alpha 4\beta 7$ y aumentan la expresión de la subunidad αE . El heterodímero formado, $\alpha E\beta 7$ (CD103) se ha vinculado con la retención de los linfocitos en el intestino, y en particular en la asociación de los LIE con las células epiteliales del intestino, las cuáles expresan el ligando de CD103, E-cadherina [74, 75]. La regulación de la expresión de CD103, en los linfocitos, es en parte inducida por TGF- β producido por las células epiteliales[74].

De manera similar a lo reportado en ratones deficientes de MAdCAM-1, los ratones deficientes de

CD103, presentan números reducidos de LIE y LLP[76]. Sin embargo, los linfocitos T $CD8\alpha\beta^+$ $CD103^-$ son capaces de migrar eficientemente al epitelio de ratones transferidos e infectados con el virus de estomatitis vesicular, lo cual indica que otras integrinas están involucradas en asociación de estas células con el epitelio intestinal[77].

Las quimiocinas en la regulación de la migración de los linfocitos T al intestino.

No solo la expresión de las integrinas $\alpha4\beta7$ y CD103 determinan la localización de los linfocitos T en la mucosa intestinal, si no también la interacción de las quimiocinas, producidas por el epitelio y las células estromales de la mucosa intestinal, con sus receptores en la superficie de los linfocitos T es fundamental para este proceso.

La expresión homeostática de las quimiocinas por el epitelio intestinal (Tabla 1), es diferencial entre el intestino delgado y el colon lo cual permite que distintas poblaciones y subpoblaciones leucocitarias se ubiquen en diferentes microambientes a lo largo del intestino.

Aun siendo muy diverso el perfil de quimiocinas expresado por el epitelio intestinal, los linfocitos T presentan perfiles diferentes de expresión de receptores de quimiocinas según la subpoblación a la que pertenecen. Shang et al [78], realizaron un análisis de la expresión de receptores de quimiocinas en las diferentes poblaciones de LIE aislados a partir del intestino delgado de ratones C57BL/6. Mientras que las poblaciones $CD4^+TCR\alpha\beta^+$ expresan los receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR3, CXCR4 y CXCR6, las poblaciones $CD8^+TCR\alpha\beta^+$ expresan CCR2, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR4 y CXCR6. De manera particular, las poblaciones LIE de intestino delgado $CD8\alpha\alpha^+TCR\alpha\beta^+$ presentan un perfil de receptores de

quimiocinas más reducido expresando CCR5, CCR9, CXCR3, CXCR4 y CXCR6.

En cuanto a los receptores de quimiocinas involucrados en la migración de los linfocitos hacia la lámina propia del intestino delgado no inflamado, tanto en el humano como en el ratón, se ha descrito la participación de CCR2, CCR5, CCR6, CCR9, y CXCR3 [79]

Tabla 1. Perfil de expresión de quimiocinas por el epitelio intestinal del intestino delgado y el colon en condiciones homeostáticas. +, expresión baja; ++, expresión media; +++, expresión alta.

CC	Intestino Delgado	Colon	Organismo	Ref.
CCL2	+	+	Humano	[73, 80, 81]
CCL5	+++	+	Humano, ratón	[73, 78]
CCL6	+++	+++	ratón	[78]
CCL7	+	+	Humano	[80, 82]
CCL11	++	++	ratón	[83]
CCL12	+++	+++	Humano	[80] [84]
CCL19	++	+++	ratón	[73]
CCL20	+++	+++	Humano, ratón	[73, 80]
CCL21	++	+++	Ratón	[73]
CCL25	+++	+/-	Ratón, oveja, cerdo	[80, 85, 86] [87, 88]
CCL28	+++	+++	Ratón, oveja, cerdo	[87, 89] [88]
CXC				
CXCL5	++	+++	ratón	[78]
CXCL10	++	+	humano	[73]
CXCL12	+	+	Humano, ratón	[73, 79]
CXCL13	+++	+++	ratón	[79]
CXCL16	++	++	ratón	[78]
CX3C				
CXC3CL1	+++	+++	Humano, ratón	[78, 80]

CCR9: Código postal de los linfocitos T de intestino.

De manera importante, el receptor de quimiocinas con una alta expresión en todas las subpoblaciones de linfocitos T en el intestino delgado es CCR9, cuyo ligando CCL25 es expresado de manera basal por las células epiteliales de las criptas del intestino delgado [85, 90].

La caracterización de las poblaciones hematopoyéticas aisladas de la mucosa intestinal del ratón CCR9 deficiente (-/-) ha permitido observar que este receptor es particularmente importante en la migración de los linfocitos intraepiteliales del intestino delgado, en particular los CD8 α ⁺ TCR γ δ ⁺[91] , así como de las células dendríticas plasmacitoides [92] los cuales se encuentran particularmente disminuidos en el intestino de este ratón. De manera particular, se ha observado que la señalización de CCL25 por CCR9 induce un aumento en la expresión de CD103 en los linfocitos T intraepiteliales [93], así como un aumento en la afinidad de esta integrina por su ligando E-selectina, expresado por los enterocitos [94]. También un alto porcentaje de células plasmáticas intestinales expresan el receptor CCR9, sin embargo los ratones CCR9^{-/-} no muestran una disminución de estas células en la mucosa intestinal, siendo el CCR10 el principal receptor de quimiocinas el responsable de su reclutamiento al intestino [91, 95] .

En el caso del colon, los receptores involucrados en la migración de los linfocitos T no ha sido apropiadamente caracterizados. Sin embargo los estudios realizados hasta el momento respecto a la expresión de CCL25 en el colon tanto de humano como de ratón, han llevado a la convención de que esta quimiocina y por lo tanto su receptor CCR9, no están involucrados en el reclutamiento de los linfocitos T hacia este tejido, siendo probablemente receptores como CCR5, CXCR3, CXCR4 [73] y CCR6 [96-98] responsables de este proceso. Sin embargo se ha reportado que en individuos sanos, al rededor de un 15% de linfocitos T en la mucosa del intestino grueso expresan el receptor CCR9 [95]

La inducción de la expresión de CCR9 en los linfocitos que migraran a la mucosa intestinal ocurre tanto en las PP como en los NLM. El estímulo que se ha relacionado con la regulación positiva de la expresión de CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ es el ácido retinóico [99], metabolito derivado de la vitamina A, procesado de manera particular por las células dendríticas procedentes de la mucosa intestinal [100, 101]. Se ha observado, que la estimulación de las células dendríticas por IL-4 producida por las células epiteliales intestinales, favorece que estas induzcan la expresión de CCR9 en los linfocitos T [102]

Participación de los linfocitos T CCR9+ en procesos inflamatorios intestinales.

Los primeros estudios respecto al papel de los linfocitos T CCR9+ en la respuesta inmune de mucosas en el intestino, mostraron que estas células tenían un papel importante en el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos en el intestino delgado.

En pacientes con enfermedad de Crohn a nivel del intestino delgado, así como en pacientes con enfermedad celiaca, se observó un incremento significativo en la expresión de CCL25 por las células epiteliales de las zonas inflamadas del intestino[103]. En particular, los linfocitos T CCR9+ aislados de la mucosa intestinal de pacientes con la enfermedad de Crohn, muestran un perfil de expresión de citocinas proinflamatorias, secretando principalmente IFN- γ e IL-17, por lo que se propuso que estas pudiesen estar relacionadas con el desarrollo de las ulceraciones en el tejido intestinal, y la progresión de la enfermedad [104].

De manera similar, en ratones SAMP1/YitFc, que desarrollan ileitis de manera espontánea, se observó un incremento tanto en la expresión de CCL25 por el epitelio intestinal, así como una mayor migración de linfocitos T CCR9+ al intestino durante la fase temprana de la enfermedad. Estas células,

predominantemente CD8+, presentaron un perfil de expresión de citocinas de tipo Th1, al ser estimuladas in vitro con anti-CD3ε. El bloqueo del receptor o el ligando, en este modelo experimental, tuvo como consecuencia una disminución en la inflamación aguda observada en estos ratones, no así en en la fase crónica de la enfermedad [105].

Estas observaciones han llevado al desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en el uso de antagonistas de CCR9 para prevenir la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal.

En particular, el antagonista de CCR9, CCX282-B (Traficet-EN) generado por la empresa farmacéutica Chemocentrix, ha mostrado tener eficacia en la reducción de la histopatología de la inflamación intestinal observada en ratones TNF^{ΔARE}[106]. Este compuesto se encuentra en estudios de fase clínica III [107].

Sin embargo existe evidencia que señala que los linfocitos T CCR9+ pudiesen también estar involucrados en el desarrollo de tolerancia oral y en la resolución de la inflamación intestinal.

La activación de los linfocitos T en los NLM por las células dendríticas CD103+, en presencia de ácido retinóico, junto con otros coestímulos importantes como la señalización mediada por CD28 y la presencia de TGFβ, permite la diferenciación de un alto porcentaje de linfocitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ tanto en el ratón como en el humano [99-101, 108, 109]. Estas células promueven la resolución de la ileitis espontánea observada en los ratones SAMP1/YP, así como la inflamación intestinal inducida a ratones SCID por transferencia de linfocitos T vírgenes provenientes de ratones SAMP1/YP[110]. De manera similar, las Treg CCR9+Foxp3+ permitieron la resolución de la inflamación aguda en intestino delgado en ratones VILLIN-HA al ser cotransferidas con con linfocitos CD8+ TCR transgénicos para la proteína HA [111].

Por otra parte, en el modelo de ileitis en el ratón TNF^{ΔAE}, la ausencia de CCR9 ha mostrado un

incremento en el índice de inflamación del íleon comparado con ratones heterocigotos para el receptor, siendo las poblaciones de linfocitos T CD4+CD25+Foxp3+ y CD8+CD103+ las significativamente disminuidas en la LP y NLM de estos ratones[112].

Recientemente también se ha demostrado que los ratones CCR9-/- no pueden desarrollar tolerancia oral, debido a una deficiencia en la migración y en la generación de linfocito T reguladores productores de IL-10 a la lámina propia del intestino[113]

A pesar de que se ha evidenciado la presencia de pequeñas poblaciones de linfocitos T CCR9+ en el colon humano en condiciones no inflamatorias [95], como en modelos experimentales de colitis en ratón[100, 111] , el posible papel de estas células en el desarrollo del proceso inflamatorio no se ha abordado apropiadamente, ya que se asume que no hay expresión de CCL25 en este tejido en condiciones basales y que el desarrollo de inflamación no incrementa la expresión de esta quimiocina.

Colitis Amibiana. Importancia de la respuesta inflamatoria en la progresión de la infección.

La colitis amibiana causa alrededor del 50% de las muertes asociadas a la amibiasis a nivel mundial, sin embargo esta manifestación clínica solo se desarrolla en un bajo porcentaje de individuos infectados sintomáticos [114]. En México, datos epidemiológicos recientes señalan que la colitis amibiana es una de las 20 causas más frecuentes de enfermedad en la población, con una incidencia de 498 casos por cada 100 mil individuos [115].

El trofozoito, forma infectiva del parásito, coloniza la luz del colon, donde se multiplica y diferencia en quiste, la forma resistente responsable de la transmisión de la infección. Los quistes son excretados en la heces, y pueden ser ingeridos por un nuevo hospedero a través de alimentos o agua

contaminada. Los trofozoitos son liberados del quiste en el íleo terminal, para después invadir la mucosa colónica, que en caso de progresar a una infección sintomática, pueden causar diarrea y disentería. Si en este punto la respuesta inmune es ineficiente en el control de la infección, se pueden desarrollar ulceraciones en la mucosa del colon que pueden propiciar la entrada de los trofozoitos a la circulación portal dando lugar a la formación de lesiones extraintestinales, principalmente en el hígado [116, 117].

Para poder completar su ciclo vital, *E. histolytica* debe mantenerse en la luz del colon sin inducir el desarrollo de una respuesta inmune que lo elimine, es decir establecer una relación comensal con el hospedero.

Se ha demostrado que factores secretados por los trofozoitos son capaces de estimular a macrófagos, los cuales regulan negativamente la activación de NfκB en los enterocitos y aumentan la resistencia del epitelio a la apoptosis [118]. Por otra parte, modelos experimentales muestran que el desarrollo de respuestas tolerogénicas en el hospedero en presencia de los trofozoitos son muy importantes para limitar la infección, al promover el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial. En este contexto, se ha observado, que la producción de IL-10 de origen hematopoyético, es fundamental para la resistencia a la infección [119] probablemente mediante la regulación de la activación de NFκB en los enterocitos, la inducción de producción de mucinas y la diferenciación de células Treg [117].

La producción de anticuerpos de tipo IgA de secreción, también es un elemento importante en la resistencia y la protección contra la reinfección. La relación entre la presencia de anticuerpos anti-Gal-lectina, principal molécula de adherencia del parásito a los carbohidratos del moco intestinal, y la ausencia de enfermedad sintomática, ha sido observada en estudios epidemiológicos de individuos residentes de zonas endémicas de infección [120]. De manera similar, en modelos animales, la

vacunación con Gal-lectina, indujo la producción de IgA específica que llevó a la protección total de los ratones a la infección por *E. histolytica* [121].

Hasta el momento se desconocen los factores que están involucrados en la transición de el comensalismo al desarrollo de patogenicidad durante la infección con *E. histolytica*, sin embargo múltiples investigaciones señalan que tanto factores medioambientales, como la malnutrición y la composición del microbioma intestinal en individuos susceptibles, como diferencias genéticas tanto en el parásito como en el hospedero pudiesen estar involucrados [122]. A pesar de esto, se sabe que el desarrollo de la respuesta inflamatoria es muy importante para el proceso invasivo.

Se ha observado, tanto en biopsias humanas, como en modelos experimentales, el desarrollo de inflamación desde etapas tempranas de la enfermedad, posteriormente asociadas a las lesiones en la mucosa del colon [116]. Se han identificado diversas moléculas del parásito involucradas en el cambio en la permeabilidad del epitelio y el inicio de la respuesta inflamatoria [117, 123-128] .

Ensayos *in vitro* utilizando diferentes líneas celulares incluyendo células epiteliales, neutrófilos, linfocitos T y macrófagos, muestran que el simple contacto entre el trofozoito y la célula a través de la lectina Gal-GalNAc induce la apoptosis de las células del hospedero [123]. Por otra parte, los amebaporos, proteínas estructural y funcionalmente similares a la granulicina y a la NK-lisina, inducen de muerte por necrosis de células epiteliales y leucocitos *in vitro* [124]. En el caso de las proteasas de cisteína, se ha reportado que EhCP2, a través de la degradación de moléculas de matriz extracelular, contribuye a la disrupción de monocapas celulares *in vitro* [125]. Por otra parte, se ha reportado que la prostaglandina E2 (PGE₂) secretada por el parásito induce la disrupción de las uniones estrechas de los enterocitos, aumentando la permeabilidad del sodio a través de la barrera epitelial [126].

La lisis de las células epiteliales permite la liberación de pre IL-1 β , citocina que es proteolizada por las enzimas parasitarias, y transformada IL-1 β [129]. La secreción de esta citocina, induce a su vez

la producción de CXCL8, IL-6 y GM-CSF, moléculas involucradas en la migración y activación de neutrófilos hacia el tejido[130]. De manera paralela, la ruptura y alteración de la barrera epitelial, exponen a los receptores de reconocimiento de patrones moleculares en las membranas basolaterales de los enterocitos, los cuales interaccionan con moléculas superficiales del parásito como la Gal-lectina y el lipofosfopéptidoglicano (*EhLPPG*)[117, 127, 128], e inducen en los enterocitos, la secreción de CXCL8, CXCL1, CCL5, CCL3, CCL2, IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), TNF- α , ciclooxigenasa (COX) 2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B, así como un aumento en la expresión de INF- γ [131, 132] .

Ensayos in vitro también han demostrado que la exposición de monocitos y macrófagos a *EhLPPG* induce la secreción de TNF- α , CXCL8, IL2, IL-6 e IL-10 [127], mientras que al ser expuestas a Gal-lectina aumentan la secreción de TNF- α e IL-1 α / β [128].

La mayoría de las infecciones sintomáticas son resueltas eficazmente después de la fase inflamatoria aguda. Sin embargo, en algunos individuos la infección persiste y se desarrollan lesiones en la mucosa del colon [117].

La formación de las lesiones clásicas descritas para la enfermedad, en forma de botella, se lleva a cabo en las regiones de epitelio interglandular. Las células infiltrantes que rodean a los trofozoitos, son rápidamente lisados llevando a la necrosis del tejido. La úlcera mucosa se extiende hacia la submucosa. Este tipo de lesiones se pueden observar un gran número de células plasmáticas, aunque también se pueden identificar algunos linfocitos T y macrófagos. los neutrófilos se agrupan hacia las orillas de la úlcera, mientras que se pueden encontrar eosinófilos en el límite entre la submucosa ulcerada y el tejido viable. La destrucción de la mucosa y submucosa lleva, en algunos casos, a la

formación de granulomas [116]

En este punto el desarrollo de una respuesta adaptativa adecuada es fundamental para la resolución de la colitis. Convencionalmente, se reconoce que durante la colitis amebiana experimental, las respuesta Th1 son protectoras, mientras que las Th2 favorecen la progresión de la infección[117].

Estudios en niños de Bangladesh han mostrado que una alta producción de INF- γ por células mononucleares de sangre periférica, se relaciona con un menor riesgo de desarrollar disentería amebiana en infecciones futuras [133]. In vitro, el IFN- γ activa a los macrófagos y neutrófilos para ser amebicida, además de aumentar la respuesta de óxido nítrico en estas células y reducir la actividad enzimática de las proteasas de cisteína del parásito [117].

El papel de la respuesta Th2 en el desarrollo de la colitis amebiana se ha abordado en modelos experimentales.

En el ratón susceptible C3H/HeJ, la depleción de linfocitos CD4+, tubo como consecuencia una disminución en la infiltración de mastocitos y en la producción de citocinas como IL-4 e IL-13, reflejándose en una menor inflamación y una reducción en la carga parasitaria [134]. De manera similar, en ratones CBA infectados, se observó el desarrollo de lesiones acompañadas por una alta producción de IL-4, IL-5, IL-13 y Arginasa-1. Al inhibir la expresión de IL-4, se observó la resolución de la infección mediada por IFN- γ [135]. Estos ratones mostraron también un incremento en la expresión de IL-17A e IL-23, por lo que la respuesta tipo Th17 pudiese también estar involucrada en la progresión de la infección[135].

A pesar de que las investigaciones hasta el momento realizadas respecto a la progresión de la infección por *E. histolytica*, han arrojado elementos importantes en la comprensión de la amibiasis, poco se sabe cómo es que participan en este proceso las de células hematopoyéticas residentes de la

mucosa intestinal, y, en particular, cómo intervienen las diferentes poblaciones de linfocitos T en los procesos de tolerancia, resistencia y resolución del proceso inflamatorio frente a este parásito.

JUSTIFICACIÓN

El sistema inmune de mucosas está constituido por estructuras organizadas y por poblaciones celulares específicas cuyo desarrollo y función es diferente al de las células del sistema inmune periférico[2-5]. El papel que desempeña este complejo sistema en el desarrollo de la tolerancia hacia los alimentos y microbiota endógena en oposición al desarrollo de repuestas inmunes en presencia de organismos patógenos, o inclusive como consecuencia de cambios en el microambiente intestinal y a factores genéticos específicos, ha sido parte de una intensa investigación.

Parte de estas investigaciones, han llevado a la caracterización del perfil de quimiocinas expresado en por la mucosa intestinal, permitiendo identificar a la quimiocina CCL25 y a su receptor CCR9, como los responsables de la migración específica de poblaciones varias hematopoyéticas, en particular de linfocitos T durante la formación del GALT y el desarrollo respuestas efectoras del sistema inmune de mucosas[85, 91, 136-139].

Los estudios realizados en tanto en condiciones homeostáticas como en procesos inflamatorios en el intestino delgado, han mostrado resultados contrastantes respecto al papel de las poblaciones de linfocitos T CCR9+ en dichos procesos. Mientras que algunos estudios demuestran que las poblaciones T CCR9+ contribuyen al desarrollo de inflamación intestinal[103-105], creciente evidencia apunta hacia que estas células pudiesen tener un papel fundamental en el establecimiento de la tolerancia oral y en la resolución de respuestas inflamatorias locales mediante mecanismos reguladores [83, 99, 110-113] .

En particular se ha observado una expresión diferencial del receptor CCR9 en las poblaciones de linfocitos T presentes en el intestino delgado y en el colon [86, 95, 103], lo que pudiese indicar que estas poblaciones presentan funciones diferenciales en ambos tejidos.

Para discernir la participación de los linfocitos T CCR9+ en las respuestas inflamatoria en el

colon, el presente trabajo se enfoca a la caracterización funcional de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8 $\alpha\alpha$ + CCR9+ en el proceso de la colitis amibiana. De esta manera, se busca contribuir tanto al conocimiento del papel de las poblaciones de linfocitos T CCR9+ durante la colitis, así como a la comprensión de la participación de poblaciones específicas del tejido inmune de mucosas en la resolución de la infección por *E. histolytica*.

HIPÓTESIS.

Las células T reguladoras que expresan el receptor CCR9 contribuyen a la resolución de la colitis amibiana.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la participación de los linfocitos T reguladores que expresan el receptor CCR9 en el proceso inflamatorio inducido en un modelo murino de infección por *E. histolytica*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Establecer un modelo de infección por inoculación intracecal de trofozoitos en ratones de la cepa C57BL/6 deficientes del receptor CCR9.
2. Demostrar la migración de células CCR9+ a la mucosa del ciego como consecuencia de la infección.
3. Analizar y comparar el perfil de expresión de quimiocinas y citocinas en el tejido infectado de ratones CCR9 deficientes respecto a los silvestres por RT-PCR en tiempo real.

4. Identificar el perfil inflamatorio de los ratones CCR9 deficientes mediante la cuantificación de citocinas en suero y en extractos de ciego por el método de ELISA.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Ratones.

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 heterocigotos(+/-) y homocigos recesivos (-/-) para el gen del receptor de quimiocinas CCR9. Dichos ratones fueron generados y donados por el Dr. Wurbel. [91]. Estos ratones fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos en las instalaciones del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Inoculación intracecal.

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1:IMSS, fueron mantenidos en condiciones axénicas en medio TYI-S-33[140] en la unidad de medicina experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones fueron inoculados con 5×10^6 trofozoitos en 100 μ l de TYI-S-33 por vía intracecal, siguiendo procedimientos previamente publicados [141]. Los ratones control fueron inoculados de manera simultanea con 100 μ l de solución salina esteril (PBS).

Análisis histológico del ciego de los ratones infectados.

Los ratones CCR9+/- y CCR9-/- infectados y controles fueron sacrificados en los días 1 a 7, y al día 20 post infección (pi). Se obtuvo el ciego, el cual fue seccionado en dos partes, una de las cuales se preservó en medio para corte a temperatura óptima (OCT; Tissue Teck, Sakura Finetek), mientras que

la otra parte fue lavada con PBS estéril frío para desechar las heces, y preservada en Trizol (Invitrogen).

A partir de las muestras preservadas en OCT, se obtuvieron cortes histológicos de 6-8µm de grosor en un criostato. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE) y con ácido periódico de Schiff (PAS) para observar los cambios en el infiltrado inflamatorio y en la producción de mucinas, respectivamente, a lo largo de la infección. El grado de inflamación fue reportado modificando la escala cualitativa propuesta por Hamano et al. 2006 [119]: 0) normal, 1) hiperplasia de la mucosa, 2) incremento en el infiltrado inflamatorio de la mucosa y la submucosa, 3) incremento marcado en el infiltrado inflamatorio de la mucosa y la submucosa, y 4) destrucción de la mucosa asociada a la inflamación.

PCR en tiempo real.

El fragmento del ciego preservado en Trizol, fue homogeneizado en esta solución, y procesado para la obtención de RNA total, siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente le RNA fue tratado con RQ-DNAse (Promega), para eliminar DNA contaminante, y retrotranscrito a cDNA con la enzima M-MLV (Promega), utilizando Oligo-dT (Invitrogen) como cebador.

Para realizar la reacción encadena de la polimeraza (PCR), se utilizó el 10% de la reacción total de cDNA por muestra. La PCR se llevó a cabo utilizando el SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) en placas de 96 pozos. El ciclaje de temperatura y la detección de la fluorescencia del reactivo SYBR Green al acoplarse a la doble cadena de DNA, fue realizado en el equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A partir de las curvas de amplificación graficadas por el equipo, se determinó la expresión relativa de los genes de las citocinas y las

quimiocinas y sus receptores evaluados mediante el método $\Delta\Delta\text{CT}$ [142].

Como gen de expresión constitutiva se utilizó la secuencia de β -actina murina.

La secuencia de los cebadores utilizados para evaluar la expresión relativa de los genes por PCR en tiempo real fueron:

β -actina: F: 5'-GG GTCAGAAGGATTCCTATG-3', R: 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3';
CCR9: F: 5'-TCCGAAGGGATCTGGTGAAG-3', R: 5'-GAATGAAACCCACTG GGCC-3';
CCR10: F: 5'-TCAATCCGGTGCTTTATGCC-3', R: 5'-AGCAGCCT CCGCAGGTC-3';
CCR3: F: 5'-TTCTACCAGGAAGAAACGGA-3', R: 5'-GGA GGTGACTGAGGTGATTGC-3';
CCR6: F: 5'-GATGCTGCTCCTGGCCTG-3', R: 5'-AAGATTTGGTTGCCTGGACG-3';
CCL25: F: 5'-GCCTGGTTGCCTGTTTT GTT-3'; R: 5'-CAGCAGTCTTCAAAGGCACT-3';
CCL28: F: 5'-CAGGGCTCACA CTCATGGCT-3'; R: 5'-GCCATGGGAAGTATGGCCTTC-3';
CCL11: F: 5'-TCCA CAGCGCTTCTATTCC TG-3'; R: 5'-GGAGCCTGGGTGAGCCA-3';
CCL20: F: 5'-TTTTGGGATGGAATTGGACAC-3'; R:5'-TGCAGGTGAAGCCTTCAACC-3';
IFN- γ : F:5'-AACGCTACACACTGCATCTTGG-3', R: 5'-GCCGTGGAGTAACA GCC-3';
TNF- α : F:5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGG-3',R:5'ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3';
IL-4: F: 5'-TCATCGGCATTTTGA ACGAG-3', R: 5'-CGTTTGGCACATCCATCTCC-3';
IL-6: F:5'-GGAGTCACAGAAGGAGTGGC-3', R:5'-AACGCACTAGGTTTGCCGAG-3';
IL-17: F:5'-GCTCCAGAAGGCC TCAGA-3'; R:5'-AGCTTCCCTCCGCATTGA-3';
IL-10: F:5'-TTTGAATCCCT GGGTGAGAA-3', R:5'-GGAGAAATCGATGAC AGCGC-3'.

ELISA

En el momento del sacrificio, se tomó sangre por punción cardíaca de los ratones control e infectados. A partir de estas muestras se separó el suero, el cual fue preservado a -70°C hasta su uso.

Por otra parte, el ciego fue extraído y lavado con PBS frío para eliminar las heces y remover el tejido conectivo. Posteriormente, el ciego fue colocado en una solución de lisis (0.5% Triton X-100,

150mM NaCl, 15mM Tris, 1mM CaCl₂ y 1mM MgCl₂, pH 7.4) y procesado utilizando un homogenizador Politron. El homogenado fue centrifugado a 2500rpm por 10 minutos [143]. El sobrenadante fue transferido a tubos eppendoff y conservado a -70°C hasta su uso.

La detección de las concentraciones séricas y en homogeneizado de tejido de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-10, fue realizado utilizando kits comerciales de ELISA (Opt EIA, BD Pharmingen, San Diego, CA), de acuerdo al protocolo del fabricante.

Aislamiento de linfocitos intraepiteliales (LIE) y de lámina propia (LLP)

El procedimiento realizado para la obtención de linfocitos intraepiteliales y de lámina propia fue modificado a partir del método previamente publicado [144]. Después de extraer el ciego, se quitaron los restos de tejido conectivo y grasa adheridos a éste. Posteriormente, el ciego fue abierto longitudinalmente, y lavado con en HBSS frío (libre de calcio y magnesio), suplementado con 2% de SBF. El tejido fue cortado en pequeños trozos (10mm) y transferido a un tubo plástico de 50ml, donde fue lavado tres veces por inversión, con la solución descrita, descartando el sobrenadante, entre cada lavado. Posteriormente, el tejido fue transferido a otro tubo de 50 ml, e incubado a 37°C, con agitación vigorosa, en una solución de HBSS con 10% de SBF, 0.2 mmol/l EDTA, y 1 mmol/l DTT. El sobrenadante fue colectado en otro tubo de 50ml y colocado inmediatamente en hielo. El proceso fue repetido 2 veces más. El sobrenadante, que contenía a los LIE fue reunido en un mismo tubo, centrifugado a 1500 rpm, lavado con HBSS frío, y finalmente los LIE fueron resuspendidos en medio RPMI 1640 completo y mantenidos a 4°C.

Para el aislamiento de los LLP, los trozos de tejido de ciego restantes en los tubos, fueron lavados con medio RPMI con 2% de SBF, durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación, para eliminar los restos de EDTA presentes en la muestra. Los trozos de tejido fueron nuevamente

transferidos a un tubo limpio y digeridos a 37°C, con agitación vigorosa, en medio RPMI 1640 completo con 100u/ml de colagenasa IV. Este paso se repitió hasta que ya no quedaran fragmentos de tejido visibles, colectando el sobrenadante entre cada paso de digestión. Los LLP obtenidos fueron lavados con HBSS frío y resuspendidos en medio RPMI 1640 completo y mantenidos a 4°C.

Citometría de Flujo.

La expresión de los marcadores de superficie de los LIE, LLP y linfocitos aislados de bazo y nódulos mesentéricos, de ratones infectados y control, fue analizada mediante la tinción superficial con anticuerpos acoplados a fluorocromos o a biotina. Los datos fueron adquiridos en el citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, San Diego, CA), con parámetros de tamaño y granularidad apropiados para excluir los restos celulares y los eritocitos. Los datos obtenidos fueron graficados y analizados en el programa FlowJo (Tree Star, Inc Ashland, OR). La tinción intracelular para la detección de FoxP3, fue realizada utilizando las soluciones de fijación/permeabilización distribuidas por el fabricante, y de acuerdo al protocolo sugerido. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: anti-CD4 (Biolegend, San Diego, CA), anti-CD8a (Biolegend, San Diego, CA), anti-CD25 (Biolegend, San Diego, CA), anti-CD103 (BD Pharmingen, San Diego, CA), anti-CCR9 (eBioscience, San Diego, CA) y anti-Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA).

Inmunohistoquímica en cortes de colon humano.

Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en cortes de colon de un individuo sano y siete pacientes con colitis fulmiente para la detección del receptor CCR9. Los cortes de seis micras fueron

desparafinados y rehidratados en un tren de alcoholes. Posteriormente, el antígeno fue expuesto utilizando amortiguador de citrato de sodio pH.6.0, durante un minuto a 1.02 Atm de presión. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida durante 30 minutos con una solución de H₂O₂ al 1% en metanol, durante 30 minutos. En seguida se realizó un bloqueo de sitios Fc con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y Tween-20 al 0.05% en PBS durante 3 minutos a temperatura ambiente. Los cortes fueron posteriormente incubados a temperatura ambiente durante toda la noche, con anticuerpo monoclonal anti-CCR9 humano (R&D). Después del periodo de incubación, las laminillas fueron lavadas con PBS/Tween-20 0.05% e incubadas con anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP (Zymed) durante una hora a temperatura ambiente. Para revelar la reacción se utilizó diaminobencidina (Invitrogen) como sustrato.

Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados usando ANOVA de dos colas, utilizando el programa Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Los ratones CCR9 -/- desarrollaron una respuesta inflamatoria crónica ante la infección por E. histolytica.

Para evaluar el papel del receptor CCR9 en el desarrollo y la regulación de las respuestas inflamatorias en el colon, en particular durante un proceso infeccioso, ratones homocigos recesivos (-/-) y heterocigotos (+/-) para CCR9 fueron inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica*, y posteriormente sacrificados a los días 1, 7 y 20 post-infección (pi).

El análisis histológico de los cortes de ciego de ratones infectados, permitió observar un incremento en el infiltrado inflamatorio en la mucosa en ambos grupos experimentales al día 1 pi. Sin embargo, mientras que los ratones CCR9+/- resolvieron eficientemente la infección, hacia el día 7 pi, los ratones CCR9-/- desarrollaron una respuesta inflamatoria crónica con un incremento en el infiltrado celular tanto en la mucosa como en la submucosa del ciego, caracterizada por un aumento significativo en el número de eosinófilos y asociada a la presencia de trofozoitos en la luz del ciego (Figura 1A, B, C y D), así como una menor cantidad de células productoras de moco al día 7 pi. (Fig.2). Hacia el día 20 pi, los ratones CCR9-/- mostraron una progresión de la respuesta inflamatoria que causó la destrucción de la mucosa del ciego (Fig 1A).

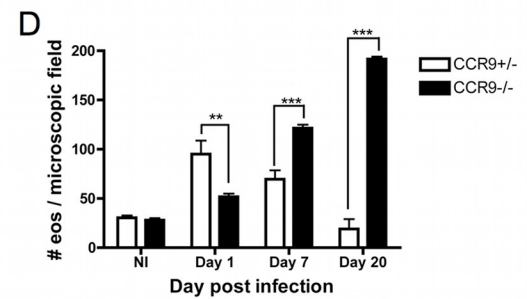
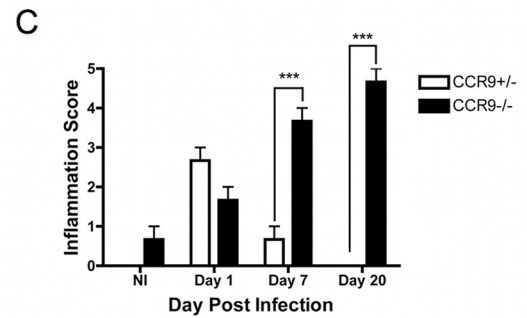
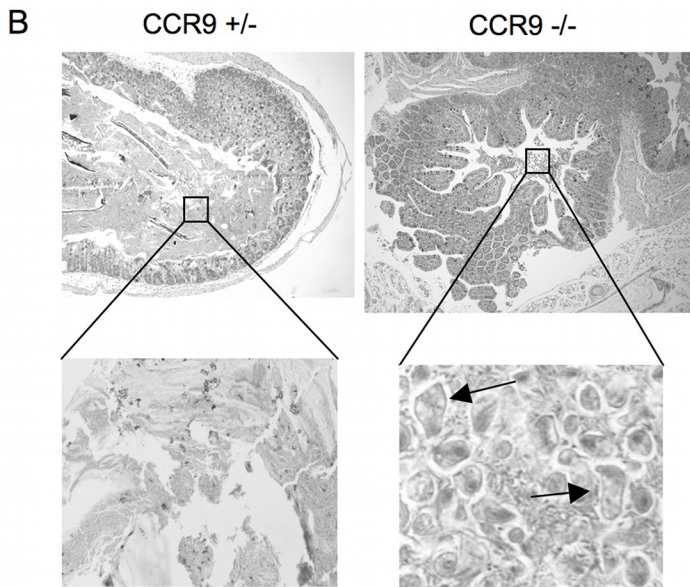
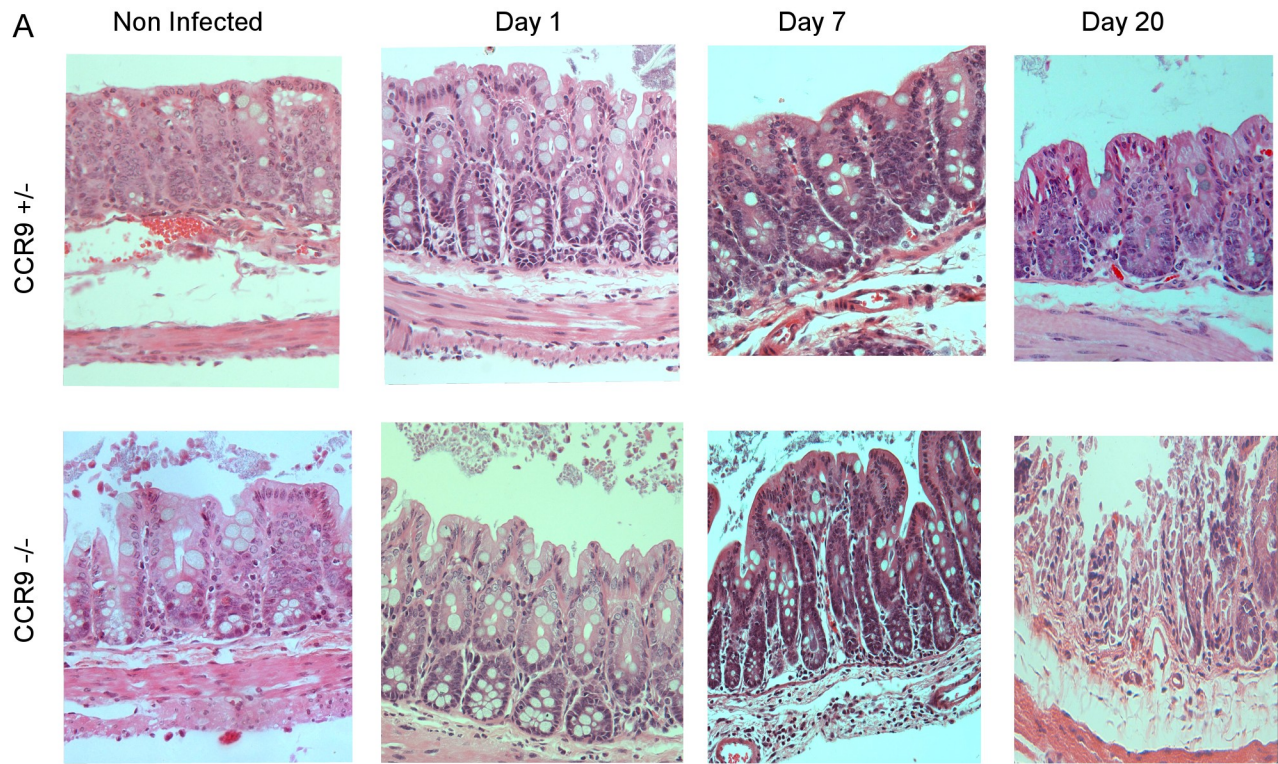


Figura 1. Los ratones CCR9^{-/-} desarrollan inflamación crónica en la mucosa del ciego en respuesta a *E. histolytica*. A. Análisis histológico del tejido cecal de ratones CCR9^{+/-} y CCR9^{-/-} no infectado e infectados y sacrificados a los días 1, 7 y 20 post-infección (pi). Aumento 40X. B. Presencia de trofozoitos (flechas) en la luz del ciego de los ratones CCR9^{-/-} al día 7 pi. Aumento 20X. C. Escala de inflamación de la mucosa del ciego durante la cinética de infección. La escala se detalla en materiales y métodos. D. Número promedio de eosinófilos por campo de tejido observado. El conteo se realizó en 4 campos por corte a una magnificación de 100X. CCR9^{+/-} (barras blancas), CCR9^{-/-} (barras negras). N=3, tres experimentos independientes. **p<0.01, ***p<0.001.

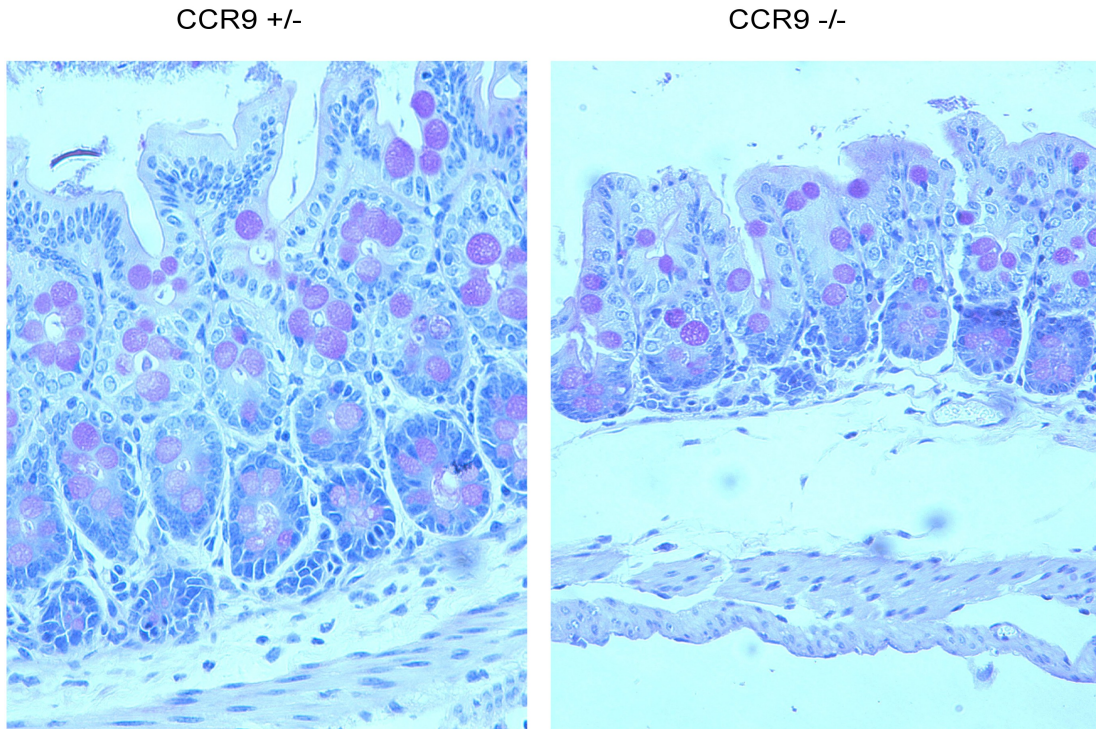


Figura 2. Los ratones CCR9^{-/-} presentan un menor número de células productoras de moco (PAS positivas) que los ratones CCR9^{+/-} al día 7 pi. Se muestra una fotografía representativa. 20X.

La respuesta inflamatoria observada en los ratones CCR9^{-/-} está asociada con una deficiencia en la expresión de IL-10

Los resultados observados por histología muestran que en ausencia de la expresión del receptor CCR9, los ratones infectados desarrollan una respuesta inflamatoria crónica que conduce a la destrucción de la mucosa del colon. Para identificar las diferencias en el perfil de expresión de citocinas entre los ratones CCR9^{+/-} y CCR9^{-/-} infectados, se realizaron ensayos de PCR cuantitativo a partir de tejido total de ciego. El análisis de la expresión relativa de los genes de citocinas, mediante el método $\Delta\Delta CT$, mostró un incremento significativo en la expresión de IFN- γ e IL-4 al día 7 pi, y de IL-6 a los

días 1 y 20 pi en el ciego de los ratones CCR9^{-/-} respecto a los CCR9^{+/-} y a los ratones control no infectados (NI) (Fig.2 A, C y E; $p < 0.05$). Los ratones CCR9^{-/-} infectados, también mostraron un incremento promedio en la expresión relativa de los genes de TNF- α e IL-17 a los largo de la infección comparados con los ratones CCR9^{+/-}, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo (Fig. 3B y F). Contrario a lo observado para la expresión de las citocinas proinflamatorias, los ratones CCR9^{+/-} mostraron un incremento en la expresión promedio del gen de IL-10 a los días 1 y 7 pi, mientras que en los ratones CCR9^{-/-}, no se observó incremento alguno en la expresión de esta citocina a lo largo de la infección respecto a a lo observado en el ciego de los ratones NI y CCR9^{+/-} (Fig. 3 D).

Los datos presentados por PCR cuantitativo, fueron corroborados a nivel de proteína mediante ensayos de ELISA a partir de lisados totales de ciego de los ratones infectados. De manera similar a lo observado en los ensayos de PCR, se observó un incremento significativo en la concentración de IL-4 e IL-6 (Fig 4B y C; $p < 0.001$) mientras que la concentración de IL-10 se mantuvo reducida (Fig 4D; $p < 0.001$) en en el ciego de los ratones CCR9^{-/-} respecto al de los ratones silvestres. También se observó un incremento promedio en la concentración de TNF- α en la mucosa de los ratones CCR9^{-/-} respecto a los ratones silvestres (Fig. 4 A) a lo largo de la infección.

En conjunto, estos resultados indican que la respuesta inflamatoria observada en los ratones CCR9^{-/-} infectados con *E. histolytica*, está relacionada con una deficiencia en la secreción de IL-10 que se relaciona con un aumento de citocinas proinflamatorias, teniendo como consecuencia el desarrollo de una inflamación crónica en el colon.

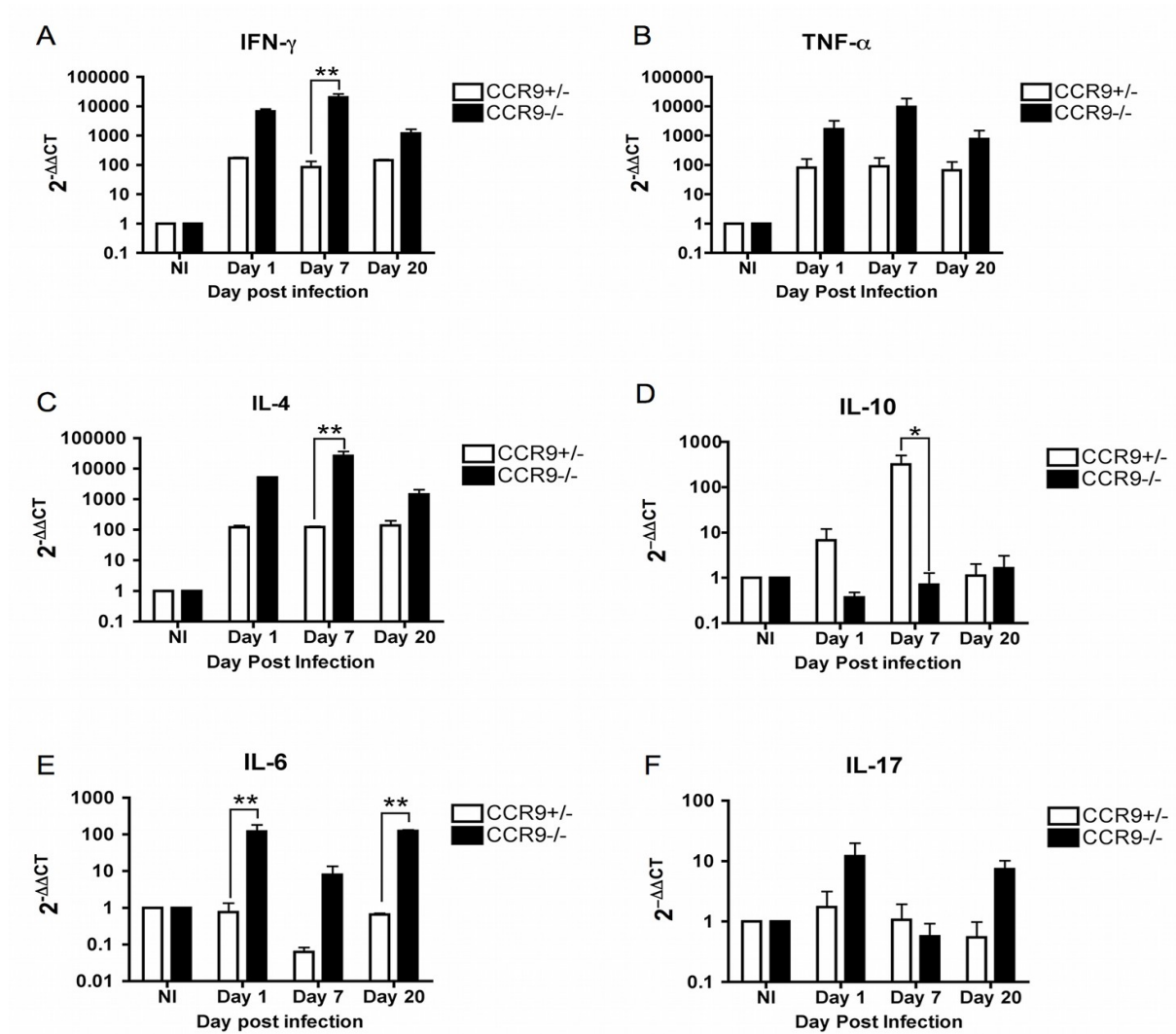


Figura 3. Los ratones CCR9^{-/-} muestran un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias y una deficiencia en la expresión de IL-10 durante la infección por *E. histolytica*. Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de la expresión de A. IFN- γ , B. TNF- α , C. IL-4, D. IL-10, E. IL-6, F. IL-17 en lisados totales de ciego de ratones CCR9^{+/-} y CCR9^{-/-} no infectados (NI) e infectados y sacrificados a los días 1, 7 y 20 pi. Se utilizó b-actina como gen control de expresión constitutiva. La expresión relativa de cada uno de los genes fue calculada mediante el método $\Delta\Delta CT$. n=3 por experimento, dos experimentos independientes por duplicado.

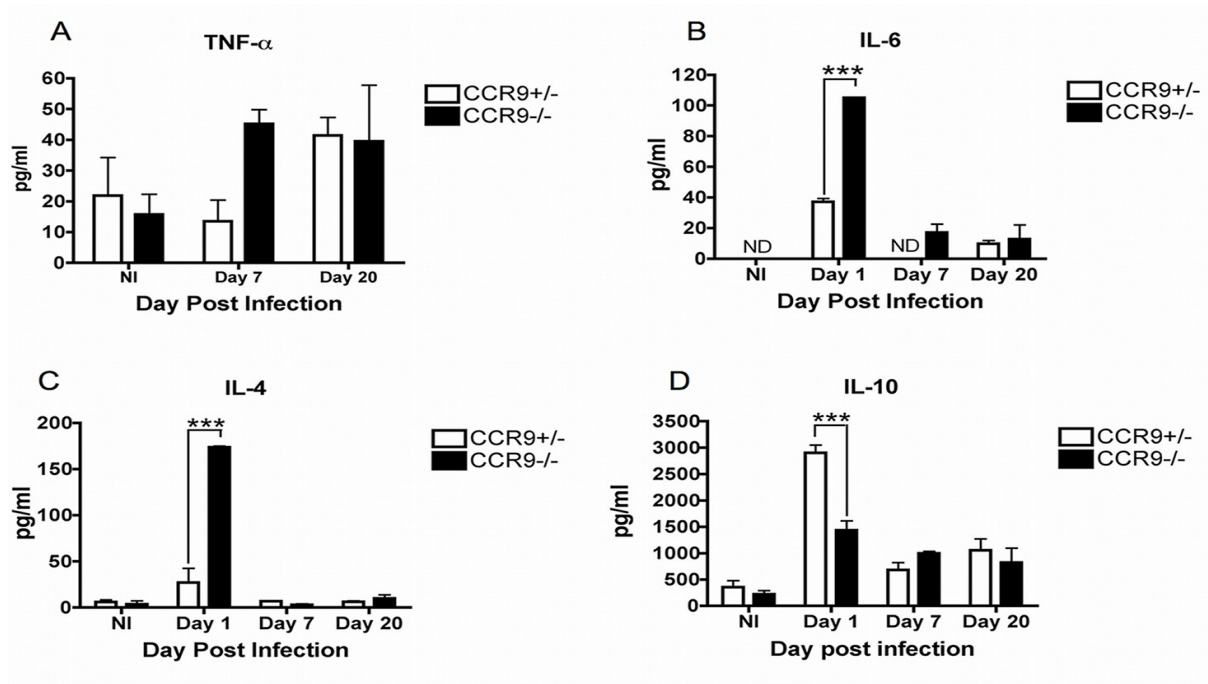


Figura 4. Análisis de la concentración de proteína de A. TNF- α , B. IL-6, C. IL-4 y D. IL-10 en lisados totales de ciego de ratones CCR9+/- (barras blancas) y CCR9-/- (barras negras) NI e infectados y sacrificados en los días 1, 7 y 20 pi, mediante ensayos de ELISA. n=3 por tiempo analizado. Datos representativos de tres experimentos independientes.

La respuesta inflamatoria observada en los ratones CCR9^{-/-} está relacionada con el incremento en la expresión de quimiocinas proinflamatorias y sus receptores.

Para caracterizar el eje de expresión de quimiocinas y sus receptores, involucrados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria observada durante el proceso infeccioso, se analizó la expresión de los receptores CCR9, CCR10, CCR3 y CCR6 junto con sus ligandos CCL25, CCL28, CCL11 y CCL20, en la mucosa del ciego de ratones CCR9^{-/-} y CCR9^{+/-} infectados.

En primer lugar, el análisis de la expresión relativa del gen de CCR9 en la mucosa de los ratones CCR9^{+/-} inoculados, mostró un incremento significativo en cada uno de los puntos evaluados durante la cinética de infección, respecto a lo observado en los ratones NI (Fig 5 A; $p < 0.05$). De manera importante, la expresión de CCL25 se vio significativamente aumentada en los ratones CCR9^{+/-} respecto a los CCR9^{-/-} al día 1 pi (Fig 5B; $p < 0.001$). Estos resultados muestran que es necesario el reclutamiento de células CCR9⁺ hacia la mucosa del ciego en la fase temprana de la infección, y que dichas células pudiesen estar directamente relacionadas con la resolución eficiente tanto del proceso infeccioso como de la inflamación asociada.

La respuesta inflamatoria observada en los ratones CCR9^{-/-} se caracterizó por un incremento significativo en la expresión de los receptores CCR6 y CCR3, así como sus ligandos respectivos CCL20 y CCL11 (Fig 6 C, D, E y F; $p < 0.01-0.001$).

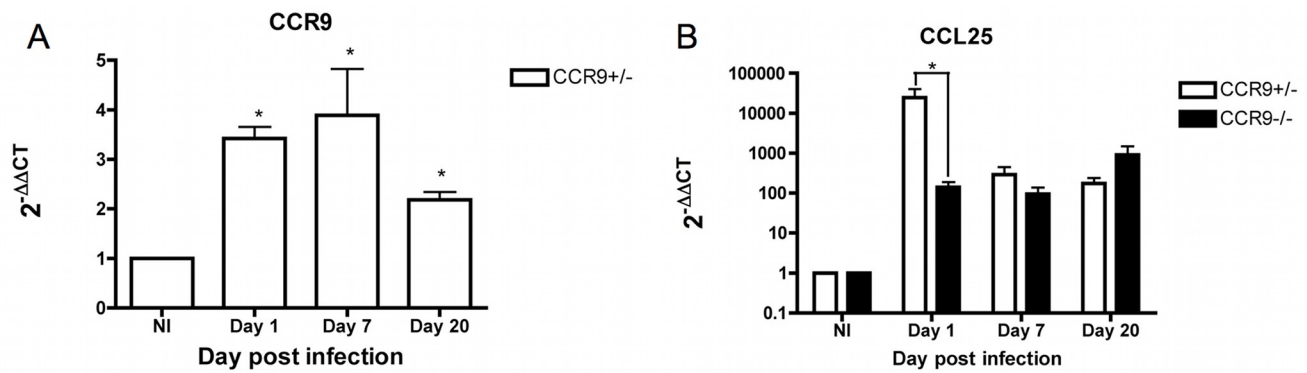


Figura 5. La infección por *E. histolytica* incrementa significativamente la expresión de CCR9 y CCL25 en el ciego de los ratones CCR9+/- . Análisis de la expresión relativa de los genes de A. CCR9 y B. CCL25, en el ciego de ratones NI e infectados y sacrificados en los días 1, 7 y 20 pi mediante PCR en tiempo real. β -actina fue utilizado con gen control de expresión constitutiva. La expresión relativa de cada uno de los genes fue calculada mediante el método $\Delta\Delta CT$. n=3 por tiempo analizado. Datos representativos de tres experimentos independientes. *p<0.05

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la expresión media del gen de CCL28 entre grupos experimentales (Fig. 6B). Sin embargo, la expresión del receptor de esta quimiocina, CCR10, se vio significativamente incrementada en la mucosa del colon de los ratones CCR9-/- respecto a los ratones CCR9+/- en el día 20 pi (Fig 6A; p<0.001).

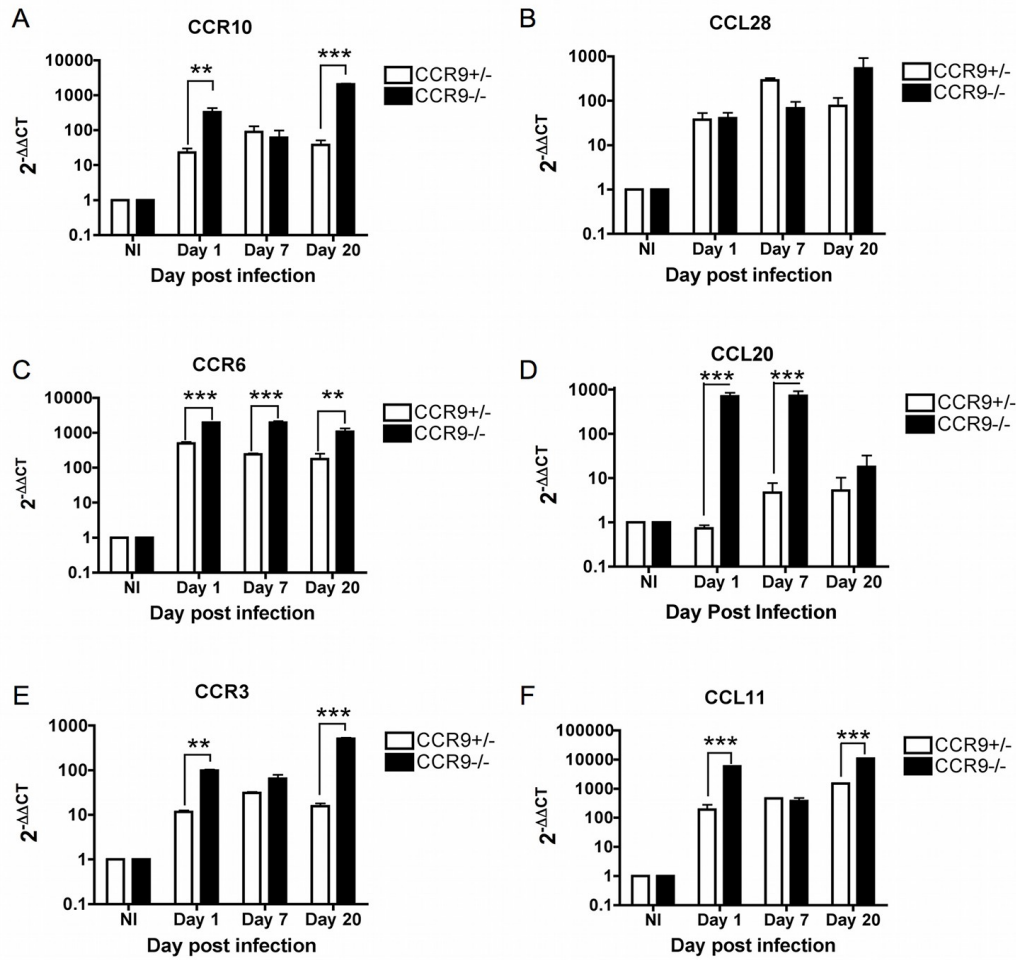


Figura 6. Los ratones CCR9^{-/-} muestran un incremento significativo en la expresión de quimiocinas y sus receptores en comparación a los ratones CCR9^{+/-} a lo largo de la infección. Análisis de la expresión relativa de los genes A. CCR10, B. CCL28, C. CCR6, D. CCL20, E. CCR3, F. CCL11 en lisados totales de ciego de ratones CCR9^{+/-} (barras blancas) y CCR9^{-/-} (barras negras) NI e infectados y sacrificados en los días 1, 7 y 20 pi. La expresión relativa de cada uno de los genes fue calculada mediante el método $\Delta\Delta CT$. b-actina fue utilizado como gen control de expresión constitutiva. n=3, por duplicado, por tiempo evaluado. Tres experimentos independientes. **p<0.01, ***p<0.001.

Los ratones CCR9^{-/-} presentan un menor reclutamiento de linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ al epitelio de la mucosa del ciego durante el proceso infeccioso.

Los resultados obtenidos, muestran que los ratones CCR9^{-/-} presentan una deficiencia severa en los mecanismos reguladores, mediados por IL-10, que promueven el desarrollo de colitis amibiana. Se sabe que diferentes poblaciones CCR9⁺ son capaces de promover y mediar dichas respuestas reguladoras durante la homeostasis y durante procesos inflamatorios en el intestino, sin embargo, las principales células efectoras responsables de mediar dichas respuestas anti-inflamatorias son las células T reguladoras. Con el fin de caracterizar a las poblaciones infiltrantes de linfocitos T en la mucosa del ciego durante el proceso de infección, estos linfocitos fueron aislados de los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), y del epitelio y lámina propia del ciego de los ratones CCR9^{-/-} y CCR9^{+/-} no infectados (NI) e infectados con *E. histolytica*,. Estas células, fueron posteriormente marcadas superficialmente con anticuerpos para las moléculas CD4, CD8, CD25, y CCR9. Para analizar los porcentajes presentes de linfocitos T reguladores, las células con tinción superficial fueron permeabilizadas y marcadas con una anticuerpo anti-Foxp3.

A excepción de un incremento significativo en el número de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en los NLM de los ratones CCR9^{-/-} comparado a los ratones silvestres al día 7 pi (Fig. 7F, p<0.05), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes y números de linfocitos T CD8 α ⁺, CD4⁺, y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ entre grupos experimentales (Fig. 7). Sin embargo, al analizar el porcentaje y número de las subpoblaciones de linfocitos T CCR9⁺ se observó un incremento promedio en el número de linfocitos CD8 α ⁺CCR9⁺(Fig. 8B) así como un incremento significativo del porcentaje de linfocitos CD4⁺CCR9⁺ (Fig. 8C) y en el número de CD4⁺CD25⁺CCR9⁺ (Fig. 8F) y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CCR9⁺ (Fig. 8H) en los NLM de los ratones silvestres al día 1 pi.

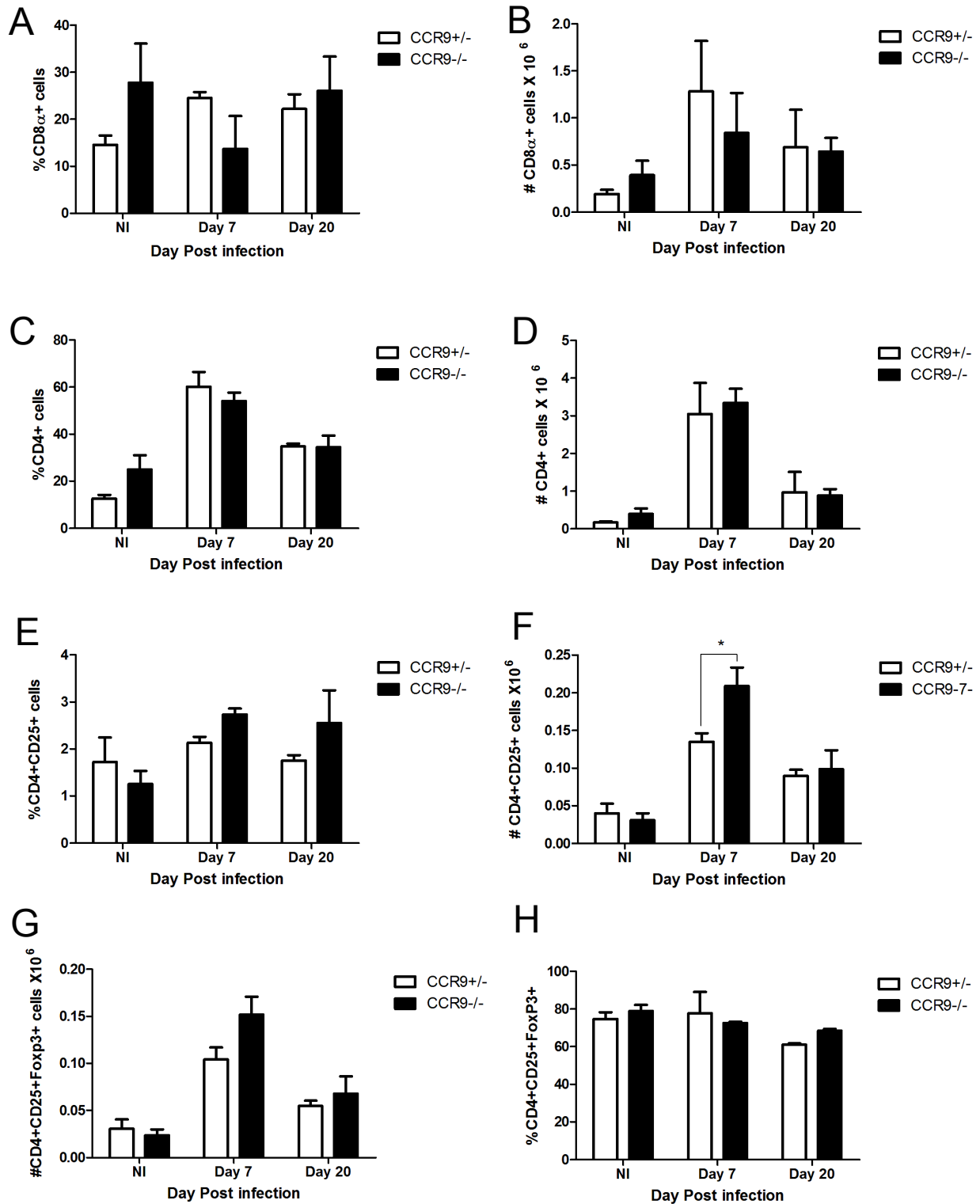


Figura 1. Análisis del porcentaje (A, C, E, G) y número (B, D, F, H) de linfocitos T CD8 α + (A y B), CD4+ (C y D), CD4+CD25+ (E y F) y CD4+CD25+Foxp3+ (G y H) aislados de los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de ratones CCR9+/- (barras blancas) y CCR9-/- (barras negras) NI e infectados y sacrificados en los días 1, 7 y 20 pi. n=3, tres experimentos independientes. *p<0.05.

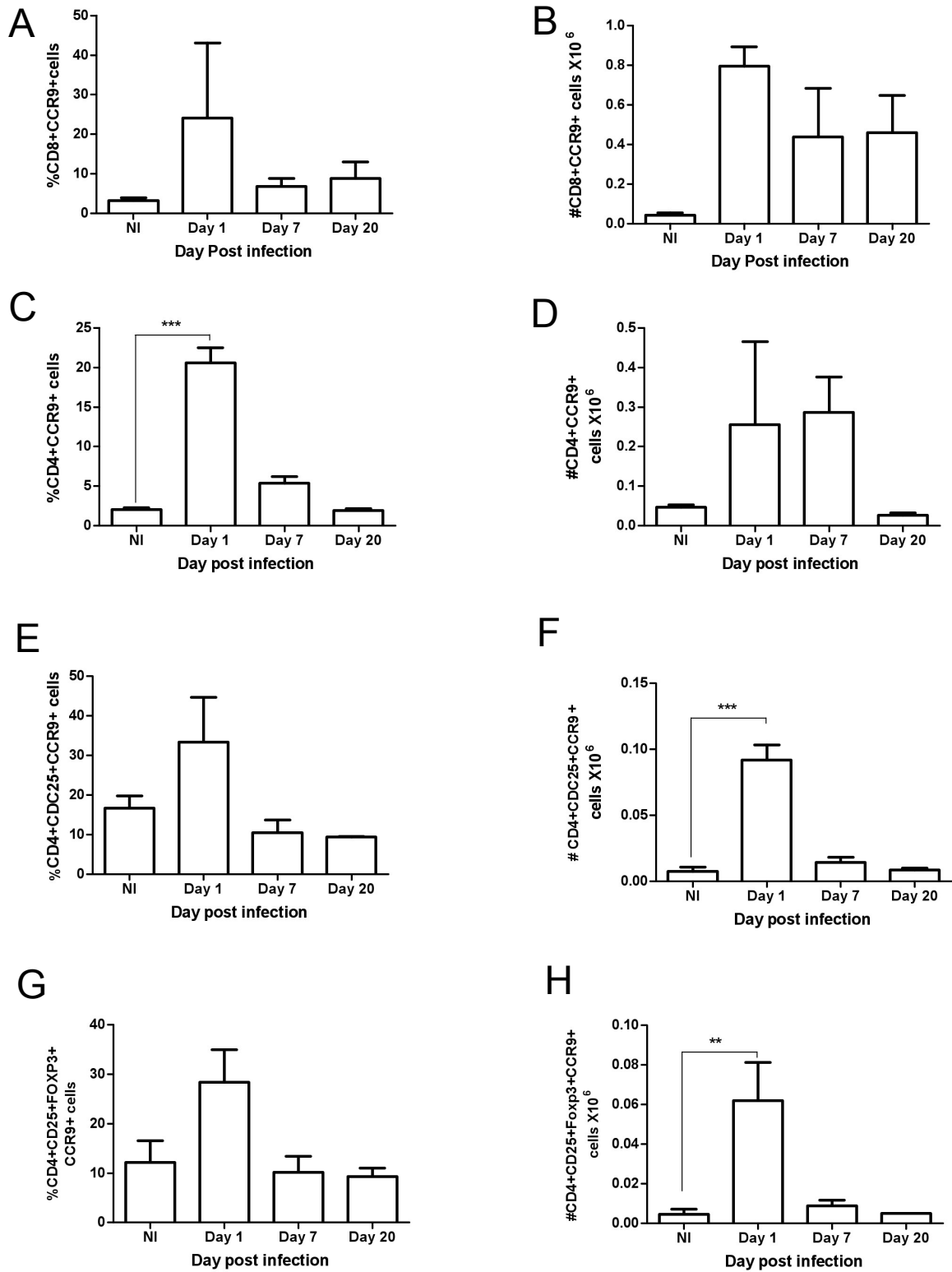


Figura 8. Los ratones CCR9^{+/-} muestran un incremento significativo en la proporción de linfocitos T CD4⁺CCR9⁺, CD4⁺CD25⁺CCR9⁺ y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CCR9⁺ en los NLN al día 1 pi. Análisis del porcentaje (A, C, E, G) y número (B, D, F, H) de linfocitos T CD8 α ⁺CCR9⁺ (A y B), CD4⁺CCR9⁺ (C y D), CD4⁺CD25⁺CCR9⁺ (E y F) y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CCR9⁺ (G y H) aislados de los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de ratones CCR9^{+/-} NI e infectados y sacrificados en los días 1, 7 y 20 pi. n=3, tres experimentos independientes. **p<0.01, ***p<0.001.

Por otra parte, el análisis de las proporciones de las subpoblaciones de células CD4⁺ en los linfocitos intraepiteliales (LIE) y linfocitos de la lámina propia (LLP) aislados de la mucosa del ciego, permitió observar diferencias significativas en el reclutamiento de estas células en los ratones CCR9^{-/-} respecto a los ratones CCR9^{+/-} durante el proceso infeccioso.

De manera particular, aunque los porcentajes de LIE CD4⁺ y CD4⁺CD25⁺ no variaron entre grupos experimentales en los tiempos analizados (Fig. 9A y C), el número de LIE CD4⁺ y CD4⁺CD25⁺ se vieron reducidos a los 7 días pi y al día 1 pi, respectivamente, en los ratones CCR9^{-/-} respecto a los ratones CCR9^{+/-} (Fig 9B y D; p<0.05). Hacia el día 20 pi, se observó un incremento significativo en el número de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en el epitelio de los ratones CCR9^{-/-}, comparado con el número de estas células aisladas a partir de los ratones CCR9^{+/-} (Fig 9D; p<0.001).

Aunque no se observaron diferencias entre los porcentajes y números totales de linfocitos CD4⁺ presentes en la lámina propia de ambos grupos experimentales, la ausencia de CCR9 afectó la migración de las células CD4⁺CD25⁺ hacia la mucosa del ciego. Estas células fueron detectadas en menor porcentaje (Fig. 9I; p<0.001) y número (Fig. 9J; p<0.05) en la lámina propia del ciego de los ratones CCR9^{-/-} al día 1 pi. De manera importante, se observó una acumulación de estas células en la lámina propia de los ratones CCR9^{-/-} a los días 7 y 20 pi (Fig 9I y J; p<0.001-0.05).

Al analizar el porcentaje y número de linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, se observaron diferencias importantes en el reclutamiento de estas células hacia las diferentes partes de la mucosa del ciego entre grupos experimentales. Mientras que los ratones CCR9^{+/-} mostraron un incremento significativo en el número de células intraepiteliales al día 1 pi (Fig 9F; p<0.05), los ratones CCR9^{-/-} no mostraron un incremento significativo en el número de células de esta población T reguladora intraepitelial a lo largo

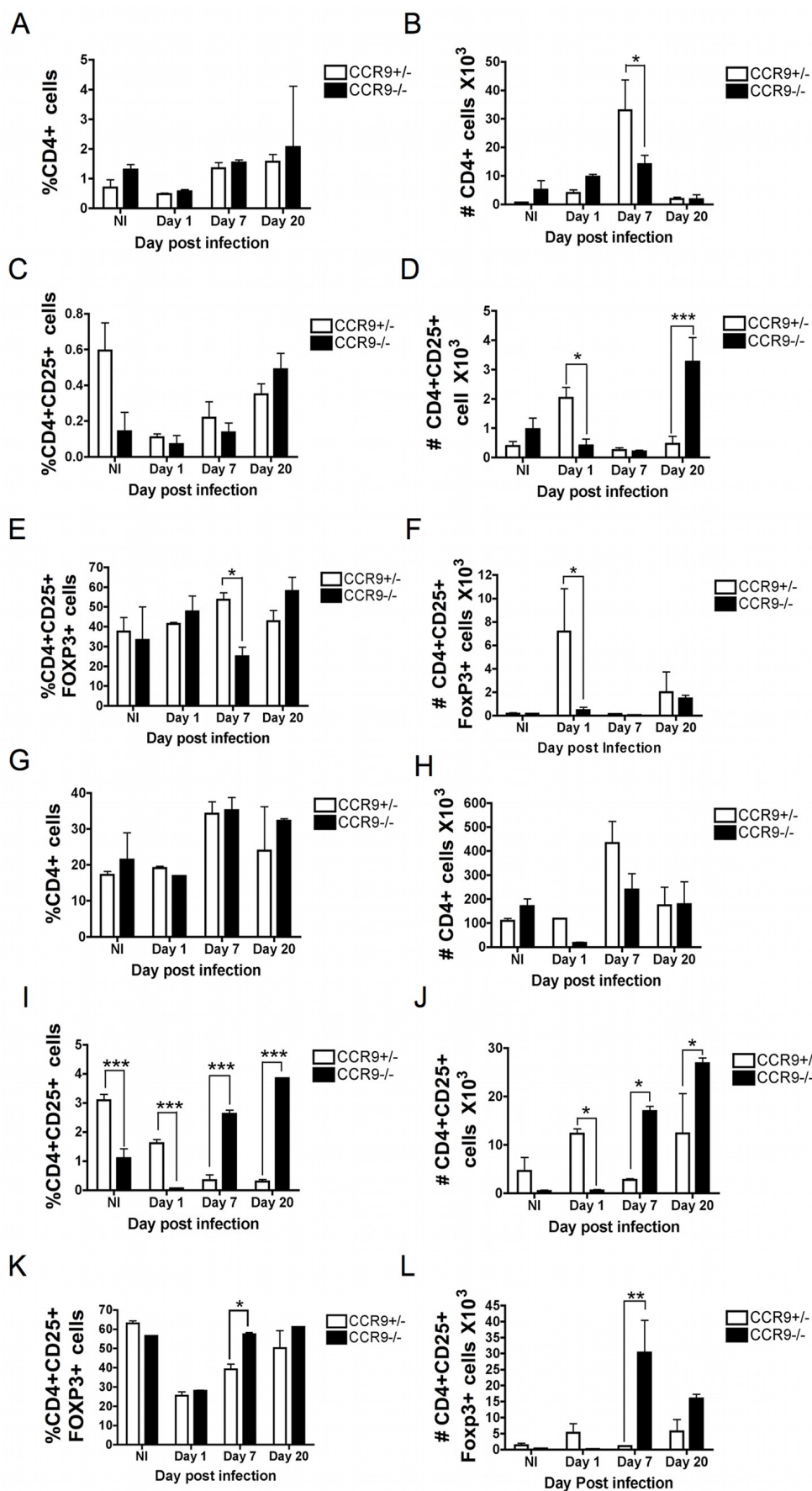


Figura 9. Los ratones CCR9^{-/-} muestran una reducción significativa en la proporción de LIE CD4+CD25+Foxp3+ en el día 1 pi comparados a los ratones silvestres. Análisis por FACS de los porcentajes (A, C, E, G, I, K) y números de linfocitos (B, D, F, H, J, L) CD4+, CD4+CD25+ y CD4+CD25+Foxp3+ aislados del epitelio (A-F) y la lámina propia (G-L) del ciego de ratones CCR9^{+/-} y CCR9^{-/-} NI e infectados con *E. histolytica*. Los datos fueron obtenidos mediante mezclas de células de tres ratones por experimento, por fenotipo, por tiempo de infección. Se muestra el promedio de tres experimentos. N=9 por tiempo de infección. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

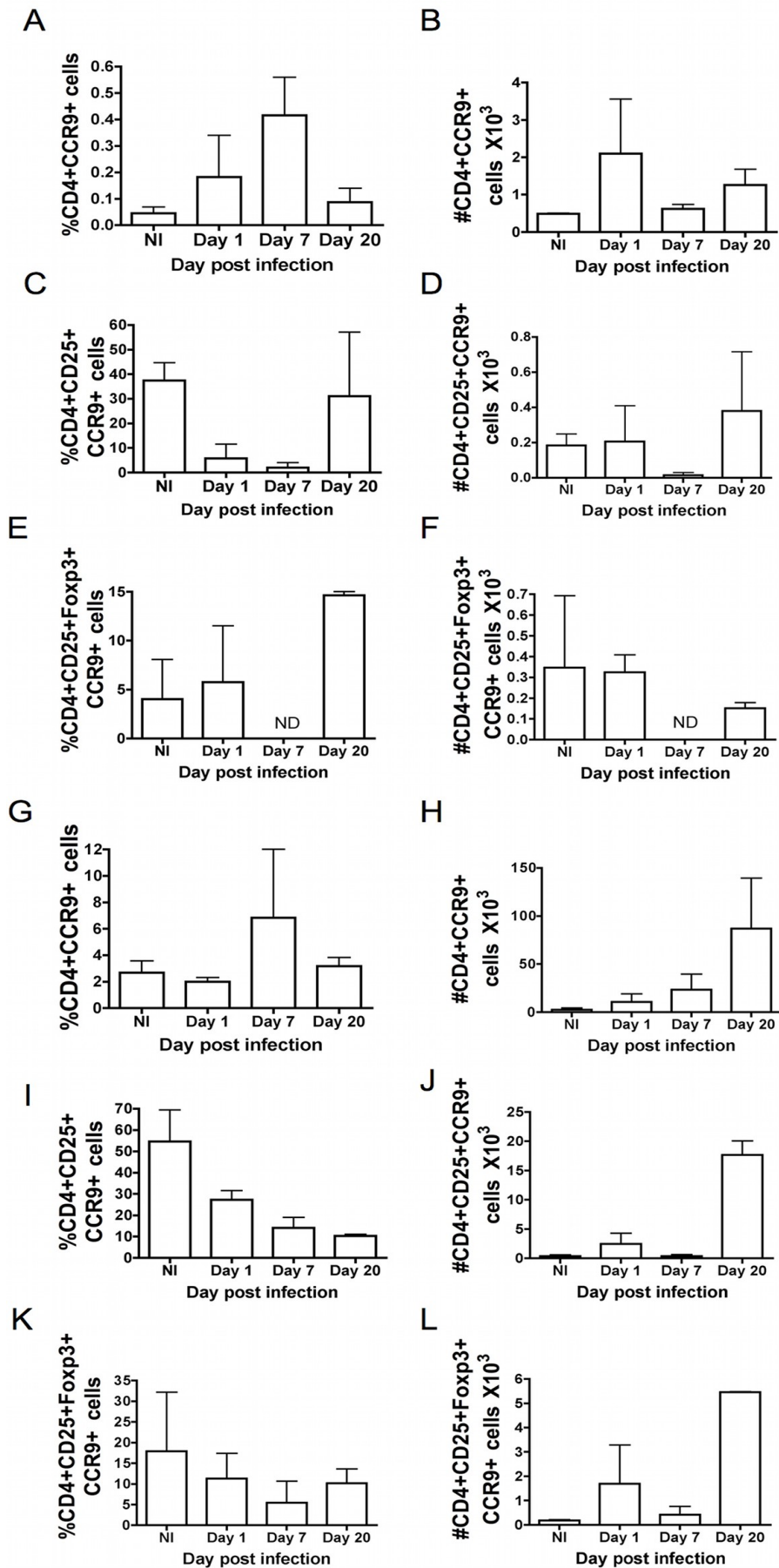


Figura 10. Análisis por FACS de la expresión superficial de CCR9 en las poblaciones CD4+ aisladas del epitelio (A-F) y lámina propia (G-L) del ciego de ratones CCR9^{+/-} y CCR9^{-/-} NI e infectados con *E. histolytica*. Se muestran los porcentajes (A, C, E, G, I, K) y números de linfocitos (B, D, F, H, J, L) CD4+CCR9+, CD4+CD25+CCR9+ y CD4+CD25+Foxp3+CCR9+. Los datos fueron obtenidos mediante mezclas de células de tres ratones por experimento, por fenotipo, por tiempo de infección. Se muestra el promedio de tres experimentos. N=9 por tiempo de infección.

de la cinética de infección, e incluso, presentaron una reducción significativa en el porcentaje de estas células en día 7 pi (Fig 9E; $p < 0.05$).

De manera contraria a lo observado para las poblaciones T reguladoras intraepiteliales, se observó un incremento significativo tanto en el porcentaje como en el número de células CD4+CD25+Foxp3+ en la lámina propia de los ratones CCR9^{-/-}, respecto a los CCR9^{+/-} al día 7 pi (Fig 9K y L; $p < 0.01-0.05$).

Por otra parte, el análisis de las poblaciones CD4+CCR9+, CD4+CD25+CCR9+, CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ aisladas a partir de la mucosa del ciego de los ratones silvestres infectados, no mostraron diferencias significativas en su porcentaje y número tanto en la lámina propia, como en el epitelio (Fig. 10). De manera particular los linfocitos no se detectaron linfocitos CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ en el epitelio al día 7 pi (Fig. 10 E y F). Estos resultados indican, que si bien la expresión de CCR9 no es determinante para la migración de linfocitos T reguladores naturales hacia los órganos linfáticos secundarios, o hacia la lámina propia, la expresión de este receptor es muy importante para el reclutamiento de estas células al epitelio del ciego, en particular al día 1 pi. Así mismo, los resultados también llevan a proponer que la presencia de una pequeña población CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ es muy importante para el mantenimiento de un microambiente tolerogénico que propicia la protección ante la colitis asociada a parásitos, y la resolución de la respuesta inflamatoria en el colon.

El análisis de los porcentajes y números totales de linfocitos CD8 α + en la mucosa del ciego entre grupos experimentales mostró un menor porcentaje de estas células en el epitelio de los ratones CCR9^{-/-} respecto a los silvestres tanto en los ratones no infectados como al día 7 pi (Fig 11A, $p < 0.01$).

Sin embargo el número de linfocitos CD8 α ⁺ se vieron incrementados en promedio en el epitelio de los ratones CCR9^{-/-} en comparación a los silvestres, también en los ratones no infectados y los ratones infectados al día 7 pi (Fig. 11B) No se observó diferencia en el porcentaje y número de estas células en la lámina propia a lo largo de la infección en ambos grupos experimentales (Fig, 11C y D). De igual manera, aunque se detectó la presencia de linfocitos T CD8 α ⁺CCR9⁺ en la mucosa del ciego de los ratones silvestre, no se observaron cambios significativos en la proporción de estas células a lo largo de la cinética de infección (Fig. 11E-H).

Células CCR9⁺ forman parte del infiltrado inflamatorio en pacientes con colitis amibiana fulminante.

Con el fin de correlacionar los datos obtenidos en el modelo de infección en los ratones CCR9^{-/-} con la colitis amibiana humana, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para detectar al receptor CCR9 en cortes histológicos de colon de pacientes con colitis amibiana fulminante. Estos ensayos permitieron detectar la presencia de células positivas para CCR9 tanto de lámina propia como en el epitelio (Fig 12). Sin embargo, es necesaria la realización de otros ensayos para determinar el tipo celular exacto al que corresponden las células CCR9⁺ en el tejido de los pacientes. Esto nos permitirá inferir la participación de estas poblaciones CCR9⁺ durante la progresión de la colitis amibiana y determinar la importancia de las poblaciones T reguladoras CCR9⁺ durante la colitis humana.

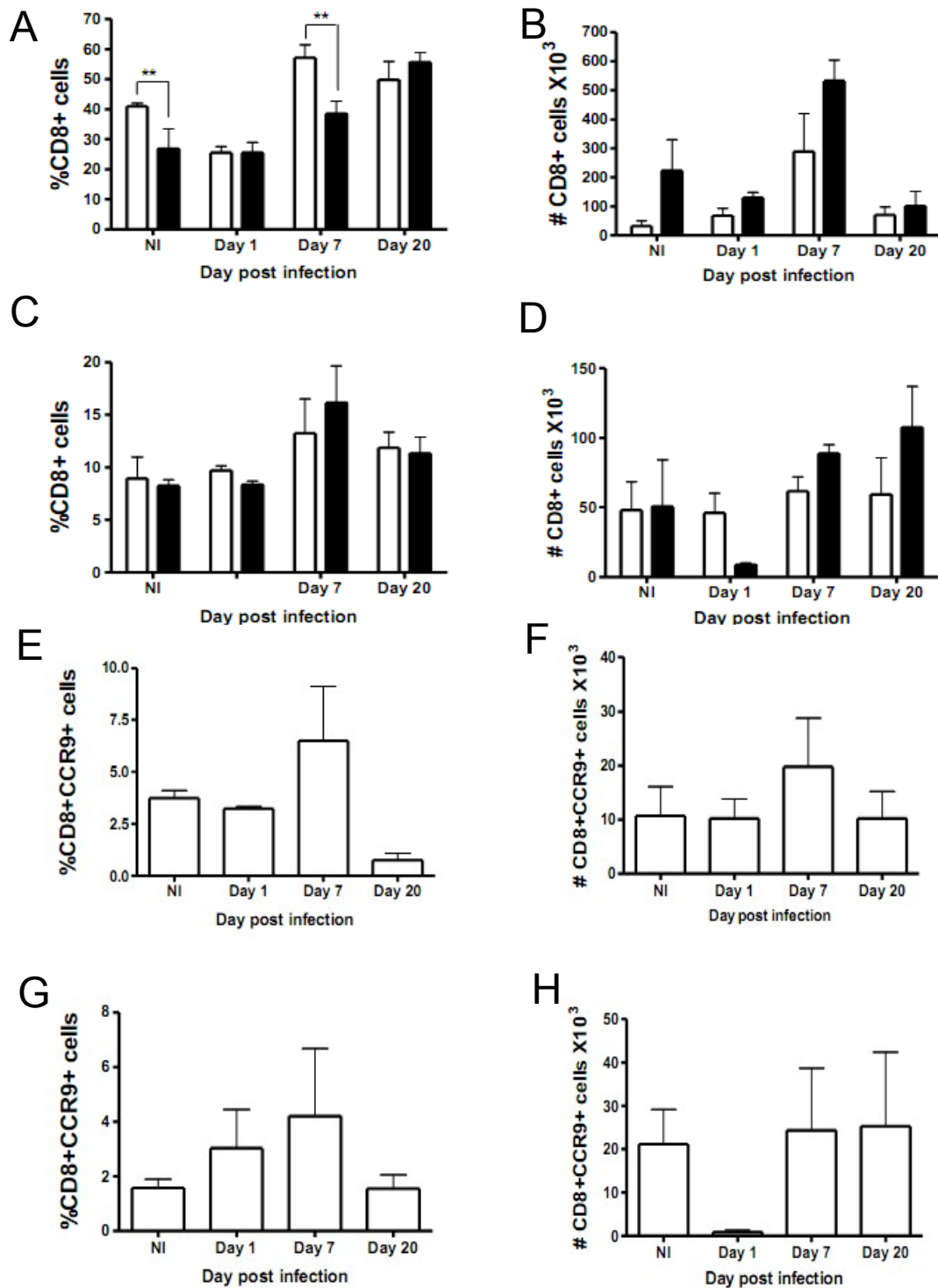


Fig. 11. Análisis por FACS de los porcentajes (A, C) y número (B, D) de linfocitos CD8 α + aislados del epitelio (A, B) y lámina propia (C, D) de ratones CCR9^{+/-} y CCR9^{-/-} NI e infectados con *E. histolytica*. En las gráficas E-H se muestra la expresión de CCR9 en la población CD8 α + en el epitelio (E, F) y lámina propia (G, H) de ratones CCR9^{+/-} NI e infectados. Los datos fueron obtenidos mediante mezclas de células de tres ratones por experimento, por fenotipo, por tiempo de infección. Se muestra el promedio de tres experimentos. N=9 por tiempo de infección. **p<0,01.

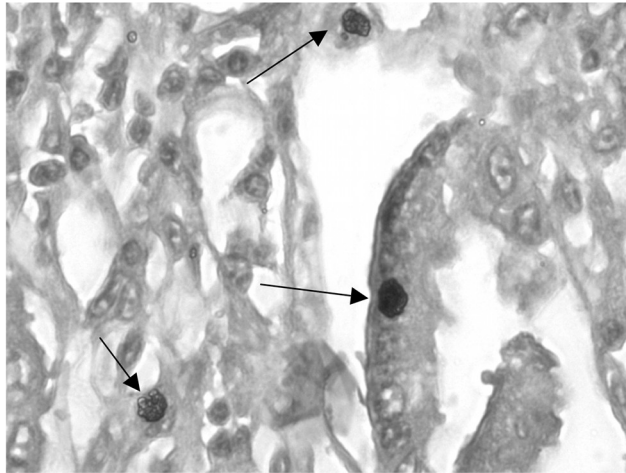


Figura 12. Pacientes con colitis amibiana fulminante presentan células CCR9+ en el epitelio y la lámina propia del colon. Análisis por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-CCR9 humano. Las células positivas para CCR9 se indican con flechas negras. Imagen representativa de uno de cinco pacientes con colitis amibiana fulminante.

DISCUSIÓN

La regulación de la migración de los leucocitos al intestino está mediado, tanto en homeostasis cómo durante procesos inflamatorios, por las quimiocinas. Se han identificado diversos receptores de quimiocinas expresados en la superficie de los leucocitos migrantes hacia el intestino (Vease tabla 1) [145], sin embargo, se ha definido al receptor CCR9 y a su ligando CCL25, como los principales mediadores de la migración de los linfocitos T y B [91], células dendríticas plasmacitoides[92] y macrófagos[139] hacia este tejido.

La investigación respecto a la participación del receptor CCR9 en la inflamación intestinal había estado restringida primordialmente al intestino delgado[112, 146, 147]. Una publicación reciente muestra que CCR9 regula la migración de células dendríticas y macrófagos a la lámina propia del colon, donde pueden intervenir en la prevención del desarrollo de colitis inducida por dextran sulfato de sodio (DSS) en un modelo murino [139]. Sin embargo se desconoce el papel que pudiese tener el receptor CCR9 durante el establecimiento de colitis asociada a patógenos.

Los resultados de la presente tesis muestran que en la ausencia de las poblaciones CCR9+, se desarrolla colitis en respuesta a la infección por *Entamoeba histolytica*. Esta respuesta inflamatoria se caracterizó por un aumento significativo en el infiltrado celular de la lámina propia y la submucosa del ciego, principalmente eosinófilos, así como un incremento en la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en este tejido, asociadas a la presencia de trofozoitos en la luz del ciego. De manera importante, se observó una deficiencia en la expresión de la citocina reguladora IL-10 en la mucosa del ciego. Contrario a lo observado en los ratones CCR9-/-, los ratones silvestres resolvieron la infección dentro de las primeras 24 horas. Estos ratones mostraron un incremento significativo en la expresión de CCL25 al día 1 pi, y un incremento en la expresión relativa del gen de CCR9 en los diferentes tiempos analizados después de la infección. Estos datos muestran que tanto la migración de células CCR9+

como las poblaciones CCR9+ residentes, son importantes para la resistencia a la infección y para la resolución de la inflamación asociada.

Actualmente se desconocen los procesos involucrados en la resistencia a la amibiasis intestinal, así como los factores que determinan la resolución *versus* la progresión de la infección hacia la colitis amibiana. Se sabe que tanto la inmunidad innata [148, 149], como la secreción de IL-10 por las epiteliales intestinales y los fibroblastos [119], son esenciales para la resistencia a la infección en modelos murinos. Por otra parte, durante la fase crónica de la infección, cuando la colitis se ha establecido, se ha demostrado que las respuestas tipo Th1 mediadas principalmente por IFN- γ , son protectoras contra el parásito, mientras que las respuestas de tipo Th2 permiten la progresión de la infección y la destrucción del tejido[134, 135, 150]. También se ha reportado un incremento en la expresión de citocinas tipo Th17 en la mucosa del ciego de los ratones infectados[150]. Esta respuesta se ha propuesto como protectora ante la infección por *E. histolytica* dado a que se observa un incremento significativo en la expresión de IL-17 por los linfocitos CD8+ de la lámina propia de los ratones vacunados[151].

Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en la expresión de INF-g, IL-4 e IL-6 tanto a nivel de RNA mensajero, como a nivel de proteína, así como un incremento promedio en la expresión relativa de los genes de TNF- α e IL-17 en los ratones CCR9-/- respecto a los silvestres. Estos datos, junto con el incremento de la expresión del receptor CCR3 y su ligando CCL11 que permitió un mayor reclutamiento de eosinófilos a la lámina propia de los ratones infectados, sugieren que en ausencia de CCR9 la infección por *E. histolytica* induce primordialmente una respuesta tipo Th2 que permite la permanencia de los trofozoitos durante la primera semana de infección y promueve el establecimiento de una colitis crónica asociada a la destrucción del tejido.

A partir del estudio de diferentes modelos de colitis no asociada a patógenos en ratones, se ha

propuesto que tanto las respuestas tipo Th1, Th2, como Th17 pueden inducir el desarrollo de inflamación en el colon en ausencia de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ productoras de IL-10[52]. Así mismo, la transferencia de células T reguladoras ha demostrado ser muy efectiva tanto en la prevención, como en la resolución de la colitis inducida por transferencia de linfocitos T CD4+CD45+RBhigh [55].

Hasta el momento no se ha demostrado la participación de las células T reguladoras durante la infección por *E. histolytica*, sin embargo, se sabe que ratones deficientes de IL-10 muestran alta susceptibilidad a la infección por este parásito[119]. Los autores de este artículo refieren que no observaron diferencias en la escala de inflamación de la mucosa del ciego y en la capacidad de resolución de la infección entre ratones depletados de linfocitos T CD4+CD25+ y no depletados. Sin embargo, la depleción de células T reguladoras fue realizada utilizando anticuerpos contra la molécula CD25+ por lo que pudiese no ser específico para poblaciones T reguladoras, dado a que es expresado tanto por poblaciones CD4+ vírgenes como activadas, por lo que la participación de las células T reguladoras en los mecanismos anti-inflamatorios mediados por IL-10 durante la colitis amibiana no puede ser descartada.

Dado a que en el modelo experimental trabajado en esta tesis se observó una menor expresión de IL-10 en la mucosa del ciego de los ratones CCR9-/- durante la infección, la respuesta inflamatoria observada en estos ratones pudiese entonces estar relacionada con una deficiencia en la migración de células T reguladoras productoras de IL-10 hacia la mucosa del colon.

Previamente se ha reportado la expresión de CCR9 en las células T reguladoras dentro de los NLM inducido por células dendríticas CD103+ en presencia de ácido retinóico[110]. Se sabe que estas células CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ intervienen en la regulación de respuestas inflamatorias en el intestino delgado[110].

El análisis de las poblaciones CD4+, CD4+CD25+ y CD4+CD25+Foxp3+ en ratones CCR9-/- y

CCR9^{+/-} infectados arrojó resultados interesantes. En primer lugar no se observaron diferencias en los porcentajes de estas subpoblaciones en lo NLM entre grupos experimentales. Esto quiere decir que la deficiencia de CCR9 no altera la migración de las poblaciones CD4⁺ vírgenes y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ naturales hacia los tejidos linfoides secundarios. Sin embargo, la migración de estas células, en particular las poblaciones reguladoras si mostró diferencias en los números y porcentajes de estas células en la lámina propia y en el epitelio de los ratones CCR9^{-/-} respecto a los silvestres durante la infección. De manera importante, aunque las poblaciones CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ fueron capaces de ingresar a la lámina propia del ciego en ambos grupos experimentales, en los ratones CCR9^{-/-} se observó una acumulación en la lámina propia y una disminución en el porcentaje y número de estas células en el epitelio. Esto lleva a proponer que CCR9 interviene en la migración de las poblaciones T reguladoras intraepiteliales tanto en condiciones homeostáticas como inflamatorias en el colon.

En los modelos murinos de inducción de colitis por transferencia de linfocitos T CD4⁺CD45^{RBhigh}, se ha propuesto, que la migración de las células T reguladoras a la lámina propia del colon es suficiente para la resolución de la inflamación [55], sin embargo, los resultados del presente trabajo, muestran que a pesar de que las células T reguladoras están presentes en la lámina propia de los ratones CCR9^{-/-}, no se observa un incremento significativo en la expresión de IL-10. Esto implica que la inducción de la expresión de IL-10 por las T reguladoras del intestino pudiese ser estimulada por su interacción con el epitelio intestinal, y al estar ausente el receptor, estas células no pueden ubicarse entre las células epiteliales, lo que las priva de dicho estímulo.

Los LIE interaccionan con el epitelio a través de la molécula CD103. Se ha observado que esta molécula puede inducir señales de adentro hacia afuera y de afuera hacia dentro de los linfocitos T. A su vez, su ligando, E-selectina, es una molécula de señalización, por lo que esta interacción linfocito-célula epitelial pudiese inducir la transcripción génica en ambos tipos celulares [80]. Por otra parte, se ha demostrado que la señalización de CCL25 a través de CCR9 incrementa la expresión de

CD103 en los LIE [93, 94]. De esta manera, el reclutamiento de los LIE CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ por CCL25, pudiese a su vez incrementar su interacción con las células epiteliales y promover la expresión de IL-10 por ambas poblaciones.

Por otra parte, se ha reportado que los ratones IL-10^{-/-} presentan una reducción en la producción de MUC-2, lo que los hace más susceptibles al desarrollo de colitis inducida por microorganismos comensales [152]. En este contexto, la producción de IL-10 por los LIE CD4+CD25+Foxp3+CCR9+, pudiese no solo reducir las señales proinflamatorias durante procesos infecciosos en el colon, si no también favorecer la expresión de MUC-2, manteniendo la integridad de la barrera epitelial y promoviendo la expulsión de los trofozoitos.

La participación de varias quimiocinas de las familia CC y CXC ha sido reportada en modelos murinos de colitis amibiana [127, 153, 154]. En el caso de la colitis amibiana humana, existen reportes donde se observa un incremento en la expresión de CCL2, CCL3, CCL22 y CXCL8 [155, 156]. Sin embargo, estos estudios fueron realizados en individuos expuestos no solo a *E. histolytica*, si no también a otros parásitos intestinales.

A pesar de que, tanto en modelos experimentales, como en biopsias de pacientes con colitis amibiana se observa un incremento significativo en la migración de linfocitos a la lámina propia del colon, hasta el momento no se había analizado el perfil de expresión de quimiocinas y sus receptores, tales como CCR6 y CCR10, involucrados específicamente en la inducción de la migración de linfocitos al intestino.

CCR10 y su ligando CCL28 inducen la migración tanto de linfocitos T y B, como células plasmáticas productoras de IgA al intestino tanto en homeostasis [157] como durante infecciones virales [158].

Durante la amibiasis intestinal, la secreción de IgA por las células plasmáticas no parece ser importante durante las infecciones recientemente adquiridas, sin embargo, se ha demostrado que esta

inmunoglobulina tiene un papel importante en la protección contra la reinfección en zonas de alta prevalencia de la enfermedad [159]. En el modelo experimental presentado en esta tesis, se observó un incremento significativo en la expresión del receptor CCR10 en la mucosa del ciego de los ratones CCR9^{-/-} respecto a los silvestres, lo cual puede indicar un mayor reclutamiento de células plasmáticas IgA⁺ a la mucosa del ciego durante el proceso infeccioso.

Por otra parte, el receptor de quimiocinas CCR6 se ha involucrado principalmente en la migración de las células dendríticas al domo subepitelial de las placas de Peyer [7]. Reportes recientes muestran que este receptor también es importante para la migración de linfocitos Th17 [97] y T reguladores productores de IL-10 [98] hacia la mucosa intestinal. Estos reportes muestran que estas células CCR6⁺ participan en la protección de la colitis.

Contrario a estos trabajos, los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en la expresión de CCR6 y CCL20 en la mucosa de los ratones CCR9^{-/-} infectados respecto a los silvestres. Sin embargo, al no observarse un incremento en la expresión de IL-10, puede proponerse que las células T reguladoras no son la principal población reclutada a través de CCR6 al colon de los ratones CCR9^{-/-} infectados. Por otra parte, el incremento promedio de la expresión del gen de IL-17 en el ciego de los ratones CCR9^{-/-} pudiese indicar que la principal población CCR6⁺ reclutada corresponda a una población Th17.

Es necesario, sin embargo, determinar cuál es el papel de los linfocitos CCR10⁺ y CCR6⁺ en el proceso inflamatorio observado en este modelo de infección.

El estudio de las poblaciones CCR9⁺ en infecciones parasitarias en humanos se limita a un reporte, en el cual se observó un incremento en de las células CCR9⁺ periféricas en individuos con filariasis [160]. En el presente estudio se realizaron inmunohistoquímicas en tejidos de pacientes con colitis fulminante para la detección de células CCR9⁺. Los resultados muestran que estas células están presentes mayoritariamente en el epitelio, por lo que es probable que esta población intraepitelial

participe activamente en el desarrollo de la respuesta inflamatoria ante *E. histolytica*. Sin embargo se requieren de estudios de caracterización más amplios para determinar su fenotipo y función específica en la colitis amibiana.

En resumen, este trabajo permitió identificar a una población LIE CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ que interviene en la regulación de la inflamación inducida por un parásito protozoario en el colon, a través de la citocina IL-10. Se sabe que la inducción de la expresión de CCR9 en esta población T reguladora depende de la presencia de ácido retinóico, derivado de la vitamina D, por lo que probablemente una dieta suficiente en esta vitamina conferiría protección contra la colitis inducida por parásitos protozoarios.

CONCLUSIONES.

1. En ausencia de CCR9, los ratones C57BL/6 son susceptibles a la infección por *E. histolytica*
2. La respuesta inflamatoria observada presenta un perfil inflamatorio tipo Th2, que permite la permanencia del parásito y la progresión de la inflamación hacia la destrucción del tejido.
3. La resistencia a la infección y la adecuada resolución de la respuesta inflamatoria inducida por la infección por *E. histolytica* depende de la secreción de IL-10 por los LIE CD4+CD25+Foxp3+CCR9+ y de sus interacciones con las células epiteliales intestinales.
4. Células intraepiteliales CCR9+ están presentes en el colon de individuos con colitis amibiana fulminante.

REFERENCIAS

1. Mowat, A.M. and J.L. Viney, *The anatomical basis of intestinal immunity*. Immunological Reviews, 1997. **156**(1): p. 145-166.
2. Mowat, A., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*, in *Nat Rev Immunol*2003. p. 331-341.
3. Mayer, L. and W.A. Walker, *Development and Physiology of Mucosal Defense: An Introduction*, in *Mucosal Immunology (Third Edition)*, M. Jiri, et al., Editors. 2005, Academic Press: Burlington. p. 5-18.
4. Nagler-Anderson, C., *Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa*, in *Nat Rev Immunol*2001. p. 59-67.
5. Ishikawa, H., et al., *Development and Function of Organized Gut-Associated Lymphoid Tissues*, in *Mucosal Immunology (Third Edition)*, M. Jiri, et al., Editors. 2005, Academic Press: Burlington. p. 385-405.
6. Newberry, R.D. and R.G. Lorenz, *Organizing a mucosal defense*. Immunological Reviews, 2005. **206**(1): p. 6-21.
7. Cook, D.N., et al., *CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue*, in *Immunity*2000. p. 495-503.
8. Adachi, S., et al., *Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo*. International Immunology, 1997. **9**(4): p. 507-514.
9. Yoshida, H., et al., *IL-7 receptor α + CD3⁻ cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches*. International Immunology, 1999. **11**(5): p. 643-655.
10. Kanamori, Y., et al., *Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(4): p. 1449-1459.
11. Eberl, G. and S. Sawa, *Opening the crypt: current facts and hypotheses on the function of cryptopatches*, in *Trends in Immunology*2010. p. 50-5.
12. Lambolez, F., et al., *Characterization of T Cell Differentiation in the Murine Gut*. The Journal of Experimental Medicine, 2002. **195**(4): p. 437-449.
13. Eberl, G., et al., *An essential function for the nuclear receptor ROR[γ]t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 64-73.
14. Bouskra, D., et al., *Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 507-510.
15. Keely, G.M., et al., *CC Chemokine Receptor 6 Expression by B Lymphocytes Is Essential for the Development of Isolated Lymphoid Follicles*. The American journal of pathology, 2007. **170**(4): p. 1229-1240.
16. Kim, D., et al., *Regulation of Peripheral Lymph Node Genesis by the Tumor Necrosis Factor Family Member Trance*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(10): p. 1467-1478.
17. Kobayashi, H., et al., *In situ demonstration of dendritic cell migration from rat intestine to mesenteric lymph nodes: relationships to maturation and role of chemokines*. Journal of Leukocyte Biology, 2004. **75**(3): p. 434-442.
18. Hayday, A., et al., *Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology*, in *Nat Immunol*2001. p. 997-1003.
19. Cheroutre, H., *IELs: enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium*, in *Immunol Rev*2005. p. 114-31.

20. van Wijk, F. and H. Cheroutre, *Intestinal T cells: Facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity*. Seminars in Immunology, 2009. **21**(3): p. 130-138.
21. Zeissig, S., et al., *Role of NKT Cells in the Digestive System. III. Role of NKT cells in intestinal immunity*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2007. **293**(6): p. G1101-G1105.
22. Leon, F., *Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes*, in *Gastroenterology*2003. p. 345-356.
23. Beagley, K.W., et al., *Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine*, in *J Immunol*1995. p. 5611-9.
24. Kunisawa, J., I. Takahashi, and H. Kiyono, *Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine*, in *Immunol Rev*2007. p. 136-53.
25. Staton, T.L., et al., *CD8+ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 482-8.
26. Lambolez, F., M. Kronenberg, and H. Cheroutre, *Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs*, in *Immunol Rev*2007. p. 178-88.
27. Cheroutre, H. and F. Lambolez, *The thymus chapter in the life of gut-specific intra epithelial lymphocytes*, in *Current Opinion in Immunology*2008. p. 185-191.
28. Charde, T., et al., *Toxoplasma gondii oral infection induces specific cytotoxic CD8 alpha/beta+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite- infected enterocytes*. The Journal of Immunology, 1994. **153**(10): p. 4596-4603.
29. Egan, C.E., et al., *CCR2-dependent intraepithelial lymphocytes mediate inflammatory gut pathology during Toxoplasma gondii infection*. Mucosal Immunol, 2009. **2**(6): p. 527-535.
30. Dalton, J.E., et al., *Intraepithelial [gamma][delta]+ Lymphocytes Maintain the Integrity of Intestinal Epithelial Tight Junctions in Response to Infection*. Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 818-829.
31. Cuff, C.F., et al., *Developmental relationship between cytotoxic α/β T cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes and Peyer's patch lymphocytes*. European Journal of Immunology, 1993. **23**(6): p. 1333-1339.
32. Müller, S., M. Bühler-Jungo, and C. Mueller, *Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Exert Potent Protective Cytotoxic Activity During an Acute Virus Infection*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(4): p. 1986-1994.
33. Sydora, B.C., et al., *Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Respond to Systemic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection*. Cellular Immunology, 1996. **167**(2): p. 161-169.
34. Corazza, N., et al., *Differential Contribution of Fas- and Perforin-Mediated Mechanisms to the Cell-Mediated Cytotoxic Activity of Naive and In Vivo-Primed Intestinal Intraepithelial Lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(1): p. 398-403.
35. Leav, B.A., et al., *An Early Intestinal Mucosal Source of Gamma Interferon Is Associated with Resistance to and Control of Cryptosporidium parvum Infection in Mice*. Infect. Immun., 2005. **73**(12): p. 8425-8428.
36. Inagaki-Ohara, K., et al., *Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Sustain the Epithelial Barrier Function against Eimeria vermiformis Infection*. Infect. Immun., 2006. **74**(9): p. 5292-5301.
37. Little, M.C., et al., *The Characterization of Intraepithelial Lymphocytes, Lamina Propria Leukocytes, and Isolated Lymphoid Follicles in the Large Intestine of Mice Infected with the Intestinal Nematode Parasite Trichuris muris*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(10): p. 6713-6722.
38. Scott, K.G.-E., L.C.H. Yu, and A.G. Buret, *Role of CD8+ and CD4+ T Lymphocytes in Jejunal*

- Mucosal Injury during Murine Giardiasis*. *Infect. Immun.*, 2004. **72**(6): p. 3536-3542.
39. Mayer, L., *I. Antigen presentation in the intestine: new rules and regulations*. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1998. **274**(1): p. G7-G9.
 40. Inagaki-Ohara, K., et al., *Intestinal intraepithelial lymphocytes sustain the epithelial barrier function against Eimeria vermiformis infection*, in *Infect Immun*2006. p. 5292-301.
 41. Emoto, Y., et al., *Functionally active CD8 α β + TCR γ δ intestinal intraepithelial lymphocytes in athymic nu/nu mice*. *International Immunology*, 2004. **16**(1): p. 111-117.
 42. Chung, C.-S., et al., *Deficiency of γ δ T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006. **291**(5): p. R1338-R1343.
 43. Brandtzaeg, P. and F.E. Johansen, *Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties*, in *Immunol Rev*2005. p. 32-63.
 44. Farstad, I.N., et al., *Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics*. *Immunology*, 2000. **101**(3): p. 354-363.
 45. Maynard, C.L. and C.T. Weaver, *Intestinal Effector T Cells in Health and Disease*. *Immunity*, 2009. **31**(3): p. 389-400.
 46. Hue, S., et al., *Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006. **203**(11): p. 2473-2483.
 47. Troy, A.E., et al., *IL-27 Regulates Homeostasis of the Intestinal CD4+ Effector T Cell Pool and Limits Intestinal Inflammation in a Murine Model of Colitis*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(3): p. 2037-2044.
 48. Peck, A. and E.D. Mellins, *Precarious balance: Th17 cells in host defense*, in *Infect Immun*2010. p. 32-8.
 49. Travis, M., et al., *Loss of integrin α β 8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice*, in *Nature*2007. p. 361-365.
 50. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation*. *Nature*, 2008. **455**(7214): p. 808-812.
 51. Mu, D., et al., *The integrin α β 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1*. *The Journal of Cell Biology*, 2002. **157**(3): p. 493-507.
 52. Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie, *Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation*. *Annual review of immunology*, 2009. **27**: p. 313-38.
 53. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(4): p. 345-352.
 54. Gambineri, E., T.R. Torgerson, and H.D. Ochs, *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis*. *Current Opinion in Rheumatology*, 2003. **15**(4): p. 430-435.
 55. Uhlig, H.H., et al., *Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis*, in *J Immunol*2006. p. 5852-60.
 56. Picca, C.C., et al., *Role of TCR specificity in CD4+CD25+ regulatory T-cell selection*. *Immunological Reviews*, 2006. **212**(1): p. 74-85.
 57. Coombes, J. and F. Powrie, *Dendritic cells in intestinal immune regulation*, in *Nat Rev Immunol*2008. p. 435-446.
 58. Sun, C.-M., et al., *Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007. **204**(8): p. 1775-1785.

59. Barnes, M.J. and F. Powrie, *Regulatory T Cells Reinforce Intestinal Homeostasis*. *Immunity*, 2009. **31**(3): p. 401-411.
60. Kühn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 263-274.
61. Oida, T., et al., *CD4+CD25- T Cells That Express Latency-Associated Peptide on the Surface Suppress CD4+CD45RBhigh-Induced Colitis by a TGF- β -Dependent Mechanism*. *The Journal of Immunology*, 2003. **170**(5): p. 2516-2522.
62. Pesu, M., et al., *T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance*. *Nature*, 2008. **455**(7210): p. 246-250.
63. Read, S., V. Malmström, and F. Powrie, *Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25+Cd4+ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000. **192**(2): p. 295-302.
64. Read, S., et al., *Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ Regulatory T Cells Abrogates Their Function In Vivo*. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(7): p. 4376-4383.
65. Cranmer, L.D. and E. Hersh, *The Role of the CTLA4 Blockade in the Treatment of Malignant Melanoma*. *Cancer Investigation*, 2007. **25**(7): p. 613-631.
66. Groux, H., et al., *A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. *Nature*, 1997. **389**(6652): p. 737-742.
67. Cong, Y., et al., *Bacterial-Reactive T Regulatory Cells Inhibit Pathogenic Immune Responses to the Enteric Flora*. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(11): p. 6112-6119.
68. M'Énager-Marcq, I., et al., *CD8+CD28- Regulatory T Lymphocytes Prevent Experimental Inflammatory Bowel Disease in Mice*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(6): p. 1775-1785.
69. Brimnes, J., et al., *Defects in CD8+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria of Patients with Inflammatory Bowel Disease*. *The Journal of Immunology*, 2005. **174**(9): p. 5814-5822.
70. Maynard, C., et al., *Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10*, in *Nat Immunol*2007. p. 931-941.
71. Chaput, N., et al., *Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue*. *Gut*, 2009. **58**(4): p. 520-529.
72. Fleissner, D., et al., *Local Induction of Immunosuppressive CD8⁺ T Cells in the Gut-Associated Lymphoid Tissues*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(10): p. e15373.
73. Kunkel, E., D. Campbell, and E. Butcher, *Chemokines in Lymphocyte Trafficking and Intestinal Immunity*, in *Microcirculation*2003. p. 313-323.
74. Gorfou, G., J. Rivera-Nieves, and K. Ley, *Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention*. *Curr Mol Med*, 2009. **9**(7): p. 836-50.
75. Johansson-Lindbom, B. and W.W. Agace, *Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa*. *Immunological Reviews*, 2007. **215**(1): p. 226-242.
76. Schön, M.P., et al., *Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice*, in *J Immunol*1999. p. 6641-9.
77. Lefrançois, L., et al., *The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response*, in *J Exp Med*1999. p. 1631-8.
78. Shang, L., et al., *Expression of the chemokine binding protein M3 promotes marked changes in the accumulation of specific leukocytes subsets within the intestine*, in *Gastroenterology*2009.
79. Salmi, M. and S. Jalkanen, *Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment*, in *Immunol Rev*2005. p. 100-13.
80. Agace, W.W., et al., *T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E) (CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines*, in *Curr Opin Cell Biol*2000. p. 563-8.
81. Reinecker, H.-C., et al., *Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal*

- epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa.* Gastroenterology, 1995. **108**(1): p. 40-50.
82. Wedemeyer, J., et al., *Enhanced production of monocyte chemoattractant protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa.* Gut, 1999. **44**(5): p. 629-635.
 83. Kang, S.G., et al., *Identification of a chemokine network that recruits FoxP3(+) regulatory T cells into chronically inflamed intestine,* in *Gastroenterology*2007. p. 966-81.
 84. Agace, W.W., et al., *Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation.* Current biology : CB, 2000. **10**(6): p. 325-328.
 85. Wurbel, M.A., et al., *The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9.* Eur J Immunol, 2000. **30**(1): p. 262-71.
 86. Kunkel, E.J., et al., *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.* J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 761-8.
 87. Meurens, F., et al., *Expression of mucosal chemokines TECK/CCL25 and MEC/CCL28 during fetal development of the ovine mucosal immune system.* Immunology, 2007. **120**(4): p. 544-55.
 88. Meurens, F., et al., *Expression of TECK/CCL25 and MEC/CCL28 chemokines and their respective receptors CCR9 and CCR10 in porcine mucosal tissues.* Vet Immunol Immunopathol, 2006. **113**(3-4): p. 313-27.
 89. Williams, I.R., *Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system.* Immunol Res, 2004. **29**(1-3): p. 283-92.
 90. Papadakis, K.A., et al., *The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system.* J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5069-76.
 91. Wurbel, M.A., et al., *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): p. 2626-32.
 92. Wendland, M., et al., *CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6347-52.
 93. Ericsson, A., et al., *CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes,* in *Eur J Immunol*2004. p. 2720-2729.
 94. Ericsson, A., A. Arya, and W. Agace, *CCL25 enhances CD103-mediated lymphocyte adhesion to E-cadherin,* in *Ann N Y Acad Sci*2004. p. 334-6.
 95. Kunkel, E., *CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells,* in *Journal of Clinical Investigation*2003. p. 1001-1010.
 96. Williams, I.R., *Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system,* in *Immunol Res*2004. p. 283-92.
 97. Wang, C., et al., *The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut,* in *Mucosal immunology*2009. p. 11.
 98. Kitamura, K., J.M. Farber, and B.L. Kelsall, *CCR6 Marks Regulatory T Cells as a Colon-Tropic, IL-10-Producing Phenotype.* Journal of Immunology, 2010. **185**(6): p. 3295-304.
 99. Iwata, M., et al., *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.* Immunity, 2004. **21**(4): p. 527-38.
 100. Annacker, O., et al., *Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis,* in *J Exp Med*2005. p. 1051-61.

101. Jaensson, E., et al., *Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans*. *J Exp Med*, 2008. **205**(9): p. 2139-49.
102. Elgueta, R., et al., *Imprinting of CCR9 on CD4 T Cells Requires IL-4 Signaling on Mesenteric Lymph Node Dendritic Cells*. *J Immunol*, 2008. **180**(10): p. 6501-7.
103. Papadakis, K., *CCR9-Positive Lymphocytes and Thymus-Expressed Chemokine Distinguish Small Bowel From Colonic Crohn's Disease*, in *Gastroenterology*2001. p. 246-254.
104. Saruta, M., et al., *Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease*, in *J Immunol*2007. p. 3293-300.
105. Rivera-Nieves, J., et al., *Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(5): p. 1518-29.
106. Walters, M.J., et al., *Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2010. **335**(1): p. 61-9.
107. Chemocentrix. *CCR9 Program*. 2012; Available from: <http://www.chemocentryx.com/product/CCR9.html>.
108. Coombes, J., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*, in *J Exp Med*2007. p. 1757-64.
109. Kang, S.G., et al., *Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(6): p. 3724-33.
110. Kang, S.G., et al., *High and low vitamin A therapies induce distinct FoxP3+ T cell subsets and effectively control intestinal inflammation*, in *Gastroenterology*2009.
111. Menning, A., et al., *Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation*. *European Journal of Immunology*, 2010. **40**(9): p. 2539-48.
112. Wermers, J.D., et al., *The chemokine receptor CCR9 is required for the T cell-mediated regulation of chronic ileitis in mice*. *Gastroenterology*, 2011.
113. Cassani, B., et al., *Gut-Tropic T Cells That Express Integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 Are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(6): p. 2109-2118.
114. WHO, *World Health Statistics 2010*. WHO, 2010: p. 177 p.
115. Sanchez Garay M, M.V.Y., *PANORAMA EPIDEMIOLOGICO DE LA AMEBIASIS INTESTINAL EN MÉXICO, 2003-2008*. Direccion General Adjunta de Epidemiologia, Secretaria de Salud., 2009.
116. Espinosa-Cantellano, M. and A. Martinez-Palomo, *Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease*. *Clinical microbiology reviews*, 2000. **13**: p. 318.
117. Mortimer, L. and K. Chadee, *The immunopathogenesis of Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology*, 2010.
118. Kammanadiminti, S.J. and K. Chadee, *Suppression of NF- κ B Activation by Entamoeba histolytica in Intestinal Epithelial Cells Is Mediated by Heat Shock Protein 27*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(36): p. 26112-26120.
119. Hamano, S., et al., *Resistance of C57BL/6 Mice to Amoebiasis Is Mediated by Nonhemopoietic Cells but Requires Hemopoietic IL-10 Production*. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**: p. 1208.
120. Haque, R., et al., *Amebiasis and Mucosal IgA Antibody against the Entamoeba histolytica Adherence Lectin in Bangladeshi Children*. *Journal of Infectious Diseases*, 2001. **183**(12): p. 1787-1793.
121. Houpt, E., et al., *Prevention of intestinal amebiasis by vaccination with the Entamoeba*

- histolytica* Gal/GalNac lectin. Vaccine, 2004. **22**(5-6): p. 611-7.
122. Ralston, K.S. and W.A. Petri, *Tissue destruction and invasion by Entamoeba histolytica*. Trends in parasitology, 2011. **27**(6): p. 254-263.
 123. Guerrant, R.L., et al., *Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils*. The Journal of infectious diseases, 1981. **143**: p. 83-93.
 124. Berninghausen, O. and M. Leippe, *Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by Entamoeba histolytica*. Infection and Immunity, 1997. **65**(9): p. 3615-21.
 125. Hellberg, A., et al., *Overexpression of cysteine proteinase 2 in Entamoeba histolytica or Entamoeba dispar increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils*. Cellular Microbiology, 2001. **3**(1): p. 13-20.
 126. Lejeune, M., F. Moreau, and K. Chadee, *Prostaglandin E2 Produced by Entamoeba histolytica Signals via EP4 Receptor and Alters Claudin-4 to Increase Ion Permeability of Tight Junctions*. The American journal of pathology, 2011. **179**(2): p. 807-818.
 127. Maldonado-Bernal, C., et al., *The innate immune response to entamoeba histolytica lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4*. Parasite Immunology, 2005. **27**: p. 127-137.
 128. Kammanadiminti, S.J., et al., *Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of Entamoeba histolytica*. The FASEB Journal, 2003: p. 305781.
 129. Zhang, Z., et al., *Entamoeba histolytica cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis*. Molecular Microbiology, 2000. **37**(3): p. 542-548.
 130. Eckmann, L., et al., *Entamoeba histolytica trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha*. The Journal of Clinical Investigation, 1995. **96**(3): p. 1269-1279.
 131. Sharma, M., H. Vohra, and D. Bhasin, *Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic Entamoeba histolytica : basis of invasive disease*. Parasitology, 2005. **131**: p. 783-96.
 132. García-Zepeda, E.A., et al., *Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis*. Parasite Immunology, 2007. **29**(12): p. 679-84.
 133. Haque, R., et al., *CORRELATION OF INTERFERON- γ PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS WITH CHILDHOOD MALNUTRITION AND SUSCEPTIBILITY TO AMEBIASIS*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2007. **76**: p. 340.
 134. Houpt, E.R., et al., *The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4496-503.
 135. Guo, X., S.E. Stroup, and E.R. Houpt, *Persistence of Entamoeba histolytica infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN-gamma*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(2): p. 139-46.
 136. Johansson-Lindbom, B., et al., *Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 963-9.
 137. Pabst, O., et al., *Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine*. J Exp Med, 2004. **199**(3): p. 411-6.
 138. Wurbel, M.A., et al., *Impaired accumulation of antigen-specific CD8 lymphocytes in chemokine CCL25-deficient intestinal epithelium and lamina propria*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7598-606.

139. Wurbel, M.A., et al., *CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis*. PLoS ONE, 2011. **6**(1): p. e16442.
140. Diamond, L.S., D.R. Harlow, and C.C. Cunnick, *A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1978. **72**(4): p. 431-2.
141. Rivero-Nava, L., et al., *Entamoeba histolytica: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice*. Experimental parasitology, 2002. **101**: p. 183-192.
142. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
143. da Silva, J.B., et al., *Chemokines expression during Leptospira interrogans serovar Copenhageni infection in resistant BALB/c and susceptible C3H/HeJ mice*. Microbial pathogenesis, 2009. **47**(2): p. 87-93.
144. Lefrançois, L. and N. Lycke, *Isolation of Mouse Small Intestinal Intraepithelial Lymphocytes, Peyer's Patch, and Lamina Propria Cells*, in *Current Protocols in Immunology*2001, John Wiley & Sons, Inc.
145. Schaerli, P. and B. Moser, *Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic*. Immunologic research, 2005. **31**(1): p. 57-74.
146. Papadakis, K.A., et al., *CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease*. Gastroenterology, 2001. **121**(2): p. 246-54.
147. Yu, S., et al., *Failure of T cell homing, reduced CD4/CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut of vitamin D receptor KO mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20834-9.
148. Shibayama, M., et al., *Innate immunity prevents tissue invasion by <i>Entamoeba histolytica</i>*, in *Can. J. Microbiol.*2008. p. 1032-1042.
149. Asgharpour, A., et al., *Resistance to Intestinal Entamoeba histolytica Infection Is Conferred by Innate Immunity and Gr-1+ Cells*. Infection and immunity, 2005. **73**: p. 4522.
150. Guo, X., et al., *Protection against intestinal amebiasis by a recombinant vaccine is transferable by T cells and mediated by gamma interferon*. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3909-18.
151. Guo, X., et al., *CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated protection against Entamoeba histolytica induced by a recombinant vaccine*. Vaccine, 2011. **29**(4): p. 772-777.
152. Schwerbrock, N.M.J., et al., *Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria*. Inflammatory Bowel Diseases, 2004. **10**(6): p. 811-823.
153. Kammanadiminti, S.J., et al., *Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of Entamoeba histolytica*, in *FASEB J*2004. p. 155-7.
154. Yu, Y. and K. Chadee, *Entamoeba histolytica Stimulates Interleukin 8 From Human Colonic Epithelial Cells Without Parasite-Enterocyte Contact*. Gastroenterology, 1997. **112**: p. 1536-1547.
155. Soboslay, P.T., et al., *Cytokine and chemokine responses in patients co-infected with Entamoeba histolytica/dispar, Necator americanus and Mansonella perstans and changes after anti-parasite treatment*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2006. **8**(1): p. 238-47.
156. Kocherscheidt, L., et al., *Cytokine and chemokine responses in adults, newborns and children exposed to Entamoeba histolytica/dispar, Onchocerca volvulus and Plasmodium falciparum*. Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology, 2010. **21**(4 Pt 2): p. e756-63.
157. Kunkel, E.J., et al., *CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal*

- epithelial tissue IgA Ab-secreting cells*. J Clin Invest, 2003. **111**(7): p. 1001-10.
158. Feng, N., et al., *Redundant role of chemokines CCL25/TECK and CCL28/MEC in IgA+ plasmablast recruitment to the intestinal lamina propria after rotavirus infection*, in *J Immunol* 2006. p. 5749-59.
159. Haque, R., et al., *Innate and acquired resistance to amebiasis in bangladeshi children*. The Journal of infectious diseases, 2002. **186**(4): p. 547-52.
160. Babu, S., et al., *Chemokine receptors of T cells and of B cells in lymphatic filarial infection: a role for CCR9 in pathogenesis*, in *J Infect Dis* 2005. p. 1018-26.

ANEXO: Artículo publicado



CCR9⁺ T cells contribute to the resolution of the inflammatory response in a mouse model of intestinal amoebiasis

A.E. Rojas-López^{a,b}, G. Soldevila^b, S. Meza-Pérez^c, G. DuPont^{a,b}, P. Ostoa-Saloma^b, M.A. Wurbel^d, J. Ventura-Juárez^e, L. Flores-Romo^c, E.A. García-Zepeda^{a,b,*}

^a CBRL, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^b Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^c Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

^d Division of Gastroenterology/Nutrition, Children's Hospital, Harvard Medical School, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

^e Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2011

Accepted 27 April 2012

Keywords:

Amoebiasis

Chemokine receptor

Chemokines

Colitis

Entamoeba histolytica

Inflammation

Regulatory T cells

ABSTRACT

Analysis of the mechanisms underlying the inflammatory response in amoebiasis is important to understand the immunopathology of the disease. Mucosal associated effector and regulatory T cells may play a role in regulating the inflammatory immune response associated to *Entamoeba histolytica* infection in the colon. A subpopulation of regulatory T cells has recently been identified and is characterized by the expression of the chemokine receptor CCR9. In this report, we used CCR9 deficient (CCR9^{-/-}) mice to investigate the role of the CCR9⁺ T cells in a murine model of *E. histolytica* intestinal infection. Intracecal infection of CCR9^{+/+}, CCR9^{+/-} and CCR9^{-/-} mice with *E. histolytica* trophozoites, revealed striking differences in the development and nature of the intestinal inflammatory response observed between these strains. While CCR9^{+/+} and CCR9^{+/-} mice were resistant to the infection and resolved the pathogen-induced inflammatory response, CCR9^{-/-} mice developed a chronic inflammatory response, which was associated with over-expression of the cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 and IL-17, while IL-10 was not present. In addition, increased levels of CCL11, CCL20 and CCL28 chemokines were detected by qRT-PCR in CCR9^{-/-} mice. *E. histolytica* trophozoites were identified in the lumen of the cecum of CCR9^{-/-} mice at seven days post infection (pi), whereas in CCR9^{+/+} mice trophozoites disappeared by day 1 pi. Interestingly, the inflammation observed in CCR9^{-/-} mice, was associated with a delayed recruitment of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells to the cecal epithelium and lamina propria, suggesting that this population may play a role in the early regulation of the inflammatory response against *E. histolytica*, likely through IL-10 production. In support of these data, CCR9⁺ T cells were also identified in colon tissue sections obtained from patients with amoebic colitis. Our data suggest that a population of CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells may participate in the control and resolution of the inflammatory immune response to *E. histolytica* infection.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Amoebiasis, caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, is an endemic disease of tropical developing countries with a prevalence of, in some cases, up to 50% in the general population. It

is estimated to cause more than 100,000 deaths per year worldwide (WHO 2010). *E. histolytica* infects mainly the large intestine, however extra-intestinal infections, including the skin, brain and mostly the liver, can also occur (García-Zepeda et al. 2007; Mortimer and Chadee 2010). In Mexico, recent epidemiological reports indicate that intestinal amoebiasis is one of the 20 main causes of disease with an incidence of 498 cases per 100,000 individuals (Sanchez Garay and Mujica Vargas 2009).

While the majority of individuals infected with *E. histolytica* remain asymptomatic, approximately 10% of patients will develop acute intestinal inflammation associated to diarrhoea and dysentery. The inflammatory immune response driven by innate immune cells appears to be sufficient to eliminate the parasite in most patients. However, a small percentage of these individuals will develop chronic amoebic colitis (CAC). CAC is characterized by the

Abbreviations: CAC, chronic amoebic colitis; FBS, fetal bovine serum; IEL, intra epithelial cells; KO, knock out; LP, lamina propria; MLN, mesenteric lymph nodes; qRT-PCR, quantitative real time-polymerase chain reaction; Treg, regulatory T cells; WT, wild type.

* Corresponding author at: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar S/N, México, D.F. CP 04510, Mexico. Tel.: +52 56233890; fax: +52 556223369.

E-mail addresses: garciaze@servidor.unam.mx, garciaze@biomedicas.unam.mx (E.A. García-Zepeda).

presence of multiple discrete lesions of varying stages ranging from superficial erosion of colonic epithelia to deep flask-shaped ulcers involving the mucosa and part of the muscularis mucosa and the serosa. Amoebic colitis progression has been related to Th2 type immune responses, while the resolution of the infection in this phase of the disease, appears to be mediated by a Th1 response (Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo 2000; Garcia-Zepeda et al. 2007; Mortimer and Chadee 2010).

The mechanisms that determine progression versus resolution of the infection are poorly understood. In this regard, it has been demonstrated that regulatory cytokines such as IL-10, may be a key determinant of resistance as it was observed in a murine model of *E. histolytica* infection (Hamano et al. 2006). Analysis of IL-10^{-/-} mice infected with *E. histolytica* showed an increase in the parasite load and the degree of mucosal inflammation compared to WT animals. Although these results may indicate that IL-10 has a role in maintaining host resistance and promoting resolution of the inflammatory immune response in the intestinal mucosa, it is not clear whether a population of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells, IL-10 producers, may also be involved in this process. It has been reported that Treg cells migrate into the intestinal mucosa through the use of CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 and CCR7 chemokine receptors (Izcue et al. 2009; Kitamura et al. 2010). Specifically, CCR4 and CCR6 have proved to be important in the recruitment of Treg cells to the colon mucosa under inflammatory conditions, since adoptive transfer of CCR4^{-/-} and CCR6^{-/-} Treg cells are unable to resolve colitis *in vivo* (Yuan et al. 2007; Kitamura et al. 2010). Recently, CCR9 has also been identified in both Treg cells and T cells of regulatory phenotype (such as Th3) in human PBMCs and after being recruited into the small intestine in mouse models of intestinal inflammation (Papadakis et al. 2003; Alford et al. 2008; Kang et al. 2009).

However, it is not known whether CCR9⁺ T cells may play a role in regulating inflammation during protozoa infection in the colon. To investigate the specific role of CCR9⁺ T cell populations during infections in the colon, we generated an *E. histolytica* infection model in CCR9^{-/-} (KO) mice. We found that, in the absence of CCR9, *E. histolytica* infected mice developed a chronic inflammation associated with parasite presence in the lumen and progressive destruction of the cecal mucosa. This inflammatory response was associated with reduced expression of IL-10 and a significant decrease in the number of intraepithelial (IE) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs in CCR9^{-/-} mice.

Our results suggest that a population of CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IEL Tregs may play an important role in the resolution of infection and in the control of inflammation against *E. histolytica*.

Materials and methods

Mice

C57BL/6 CCR9^{-/-} mice were generated as described previously (Wurbel et al. 2001). Eight to ten week old CCR9^{-/-} mice and their heterozygous littermates were used in all experiments. C57BL/6 age-matched mice (WT) were used as controls (The Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME). Animals were kept in pathogen-free conditions in the animal research facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. All animals were handled in strict accordance with good animal practice, as defined by the Animal Experimental Bio-Ethics Guidelines of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. This study was reviewed and approved by the Animal Experimental Bio-Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Parasite culture and intracecal inoculation

Axenic cultures of *E. histolytica* strain HM1-IMSS were maintained in TYI-S-33 medium, according to standard protocols (Diamond et al. 1978). For all intracecal inoculations, axenic trophozoites were grown to the log phase, counted under a light microscope with a haemocytometer and adjusted to 25 × 10⁶ trophozoites/ml in TYI-S-33 medium. 5 × 10⁶ trophozoites were intracecally injected after laparotomy, as described (Rivero-Nava et al. 2002).

Tissue processing and histochemical analysis

Infected and control mice were sacrificed at days 1, 7, and 20. The cecum was dissected and processed for histochemistry. The tissue was frozen at -70 °C in OCT compound (Tissue Teck, Sakura Finetek) and 6–8 μm cryostat sections were obtained. Tissue sections were stained with haematoxylin/eosin (H/E) to assess the cellular infiltrate. Mucus production was revealed by periodic acid Schiff (PAS) staining. The degree of mucosal inflammation observed was scored as follows: 0, normal; 1, mucosal hyperplasia; 2, increase of inflammatory cells in the mucosa and submucosa; 3, marked increase of inflammatory cells in the mucosa and submucosa; 4, destruction of the cecal mucosa by inflammation (Hamano et al. 2006). Human tissue specimens were obtained from patients with fulminant amoebic colitis undergoing surgical resections of the ileum and colon (Ventura-Juarez et al. 2007). Tissues were obtained from fully informed patients undergoing surgical resections of the ileum and colon for amoebic lesions. The data obtained were analyzed anonymously. This study was reviewed and approved by the ethical committee of the hospitals involved as well as by the IRB of the Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. Tissue sections were obtained and processed as described elsewhere (Sierra-Puente et al. 2009). Analysis of CCR9 protein expression was performed using a mouse anti-human CCR9 antibody (R&D) and a goat anti-mouse-HRP secondary antibody.

Real time PCR analysis

Cecal tissue obtained from infected mice at different time points was homogenized and total RNA was obtained using Trizol (Invitrogen), according to manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from RQ-DNase (Promega) treated total RNA using M-MLV reverse transcriptase (Promega) and Oligo-dT (Invitrogen). RT-PCR was performed using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), as indicated by manufacturer. Relative expression of chemokines, chemokine receptors and cytokines was determined using the ΔΔCT method described (Livak and Schmittgen 2001; Schmittgen and Livak 2008). β-Actin was used as housekeeping gene. Primer sequences for selected genes: β-actin, F: 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3', R: 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'; CCR9, F: 5'-TCCGAAGGGATCTGGTGAAG-3', R: 5'-GAATGAAACCACTGGGCC-3'; CCR10, F: 5'-TCAATCCGGTGTCTTATGCC-3', R: 5'-AGCAGCTCCGCAGGT C-3'; CCR3, F: 5'-TTCTC-ACCA-GGAAGAAACGGA-3', R: 5'-GGAGGTGACTGAGGTGATTGC-3'; CCR6, F: 5'-GATGCTGCTCCTGGCCTG-3', R: 5'-AAGAT TTGGTTC-CTGGA-CG-3'; CCL25, F: 5'-GCCTGGTTGCTGTTTTGTT-3', R: 5'-CAGCA-GTCTTCAAAGGCACT-3'; CCL28, F: 5'-CAGGCTCACACTCATGGCT-3', R: 5'-GCCATGGGAAGTATGGCC TTC-3'; CCL11, F: 5'-TCCAC-AGCGCTTATTCTCG-3', R: 5'-GGAGCCTGGG TGAGCCA-3'; CCL20, F: 5'-TTTTGGGATGGAATTGGACAC-3', R: 5'-TGCAGGTGAAGCCTT CAACC-3'; IFN-γ, F: 5'-AACGCTACACTGCATCTTGG-3', R: 5'-GCCGTGGAGTA ACAGCC-3'; TNF-α, F: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGT CATTGG-3',

R: 5'-ACATTCG AGGCTCCAGTGAATTCGG-3'; IL-4: F: 5'-TCAT-CGGCATTTTGAAC GAG-3', R:5'-CGTTTGGCACATCCATCTCC-3'; IL-6: F: 5'-GGAGTCACAGAAGGA GTGGC-3', R: 5'-AACGCACTAGGTTTGCCGAG-3'; IL-17: F: 5'-GCTCCAGAAGG CCCTCA GA-3'; R: 5'-AGCTTTCCCTCCGATTGA-3'; IL-10: F: 5'-TTTGAATCCCTG GGTGAGAA-3', R: 5'-GGAGAAA-TCGATGACAGCGC-3'.

Tissue homogenization

Dissected organs were homogenized in 1.5 ml of lysis buffer containing 0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 15 mM Tris, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂, pH 7.4, according to methodology previously described (Greenberger et al. 1995). The supernatant was collected and kept at -80 °C until further use.

Cytokine analysis

Cytokines levels in tissues and serum were quantified using commercially available ELISA kits (Opt EIA, BD Pharmingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocols.

Isolation of intraepithelial (IE) and lamina propria (LP) lymphocytes

IE and LP lymphocytes isolation was performed as previously reported with minor modification (Lefrançois and Lycke 2001). Briefly, cecum was removed and fat and connective tissues were taken away. Cecum was opened longitudinally, then washed twice, to remove the faeces, in cold calcium- and magnesium-free HBSS containing 2% FBS. The cecal tissue from three mice was pooled and then cut into 10 mm pieces. This tissue was placed in 50-ml tubes and washed three times in HBSS containing 2% FCS at 4 °C. The tissue was transferred to 50 ml tubes and incubated at 37 °C, with vigorous shaking for 30 min in HBSS containing 10% FBS, 0.2 mmol/l EDTA, and 1 mmol/l DTT. The supernatant containing the IEL was separated from the tissue fragments using a stainless steel sieve. The supernatant was collected and immediately placed on ice, tissue fragments were returned to the flasks, and the process was repeated twice. The IEL cell suspensions were pooled, washed, and suspended in complete RPMI 1640 medium at 4 °C. For the isolation of LPL, cecal tissue was washed in cold complete RPMI 1640 medium during 10 min at room temperature, then were incubated 1 h at 37 °C with vigorous shaking in complete RPMI 1640 containing 100 U/ml of collagenase IV. This step was repeated until no tissue pieces were left, collecting and pooling the supernatant between digestion steps. LPL were finally washed with cold calcium- and magnesium-free HBSS containing 2% FBS and suspended in complete RPMI-1640 at 4 °C.

Flow cytometry

Analysis of the expression of surface markers on IEL, LPL, mesenteric lymph node (MLN) and spleen cells was performed by staining with fluorochrome- or biotin-conjugated anti-CD4 (Biolegend, San Diego, CA), anti-CD8 α (Biolegend, San Diego, CA), anti-CD25 (Biolegend, San Diego, CA), anti-CD103 (BD Pharmingen, San Diego, CA), anti-CCR9 (eBioscience, San Diego, CA) and anti-Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA) mAbs, and analyzed using a FACScalibur (BD Biosciences, San Diego, CA) cytometer. Data was analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR). Acquisition of multi-parameter data was performed with an appropriate forward-scatter threshold to exclude erythroid cells and debris. Intracellular staining was performed using the fixation/permeabilization buffer provided by the manufacturer (BD Biosciences, San Diego, CA).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Prism 4.0 (Graph-Pad Software Inc.). Data were analyzed by using the two-way ANOVA test to determine significance between groups. *P* values <0.05 were considered as significant.

Results

In the absence of CCR9, mice developed a chronic inflammatory response against E. histolytica trophozoites

To evaluate the potential role of CCR9 in the development and regulation of the inflammatory immune response against *E. histolytica*, CCR9^{-/-} (KO), heterozygous CCR9^{+/-} (HT) and CCR9^{+/+} wild type (WT) mice were intracably infected with trophozoites and sacrificed at days 1, 7, and 20 post-infection (pi). Colon tissue sections were analyzed by H&E and PAS staining to determine the number of trophozoites present and the extent of the induced inflammatory immune response. In both CCR9^{+/-} and CCR9^{-/-} mice, we observed an increase of leukocyte infiltration in the lamina propria and submucosa, on day 1 post-infection (pi). However, while CCR9^{+/-} mice were able to resolve the inflammatory response on day 7 pi, CCR9^{-/-} mice developed a chronic inflammatory immune response characterized by an increase of eosinophils in the colonic mucosa and submucosa (Fig. 1A, C and D). By day 20 post-infection, destruction of cecal architecture was also observed (Fig. 1A). In addition, *E. histolytica* trophozoites were identified in the cecal lumen of CCR9^{-/-} mice on days 1 and up to 7 pi. In contrast to infected CCR9^{+/-} mice that have no trace of *E. histolytica* trophozoites and overcome the infection (Fig. 1B).

Analysis of the inflammatory response in E. histolytica infected CCR9^{-/-} mice is associated with increased levels of proinflammatory cytokines but lower IL-10 production

Our results showed that CCR9^{-/-} infected mice are capable to induce a chronic inflammatory response compared to a transient response observed in CCR9^{+/-} mice. To identify the differences in the cytokine profile between CCR9^{+/-} and CCR9^{-/-} mice during *E. histolytica* infection, we performed qRT-PCR and ELISA from total cecal lysates of both groups. qRT-PCR $\Delta\Delta$ CT analysis showed statistical significant increase in the relative gene expression of IFN- γ and IL-4 in the cecum of CCR9^{-/-} mice at day 7 pi, and of IL-6 at days, 1 and 20 pi compared to non-infected controls (NI) and to CCR9^{+/-} infected mice (Fig. 2A, C and E; *P*<0.05). Even though there were not statistically significant differences in the relative expression of TNF- α and IL-17, CCR9 KO mice showed a moderate increment of these cytokines during infection, compared to NI and WT infected mice (Fig. 2B and F). In contrast, the relative gene expression of IL-10 increased in CCR9^{+/-} mice at day 1 pi, while CCR9^{-/-} mice did not show a significant increase as a result of the infection (Fig. 2D).

Compared to CCR9^{+/-} mice, CCR9 KO infected mice showed a significant increase in the protein concentration of the cytokines IL-4 and IL-6 (Fig. 3B and C; *P*<0.001), while the concentration of IL-10 was significantly reduced (Fig. 3D; *P*<0.001) at day 1 pi. We observed a moderate increase in the expression of TNF- α in mice cecal lysates at day 7 pi, compared to CCR9^{+/-} and non-infected mice (NI) (Fig. 3A). These results imply that the absence of CCR9 results in impaired early IL-10 production and secretion, but an increase in the expression of pro-inflammatory cytokines in response to *E. histolytica* infection, which could lead to chronic inflammation of the cecal mucosa.

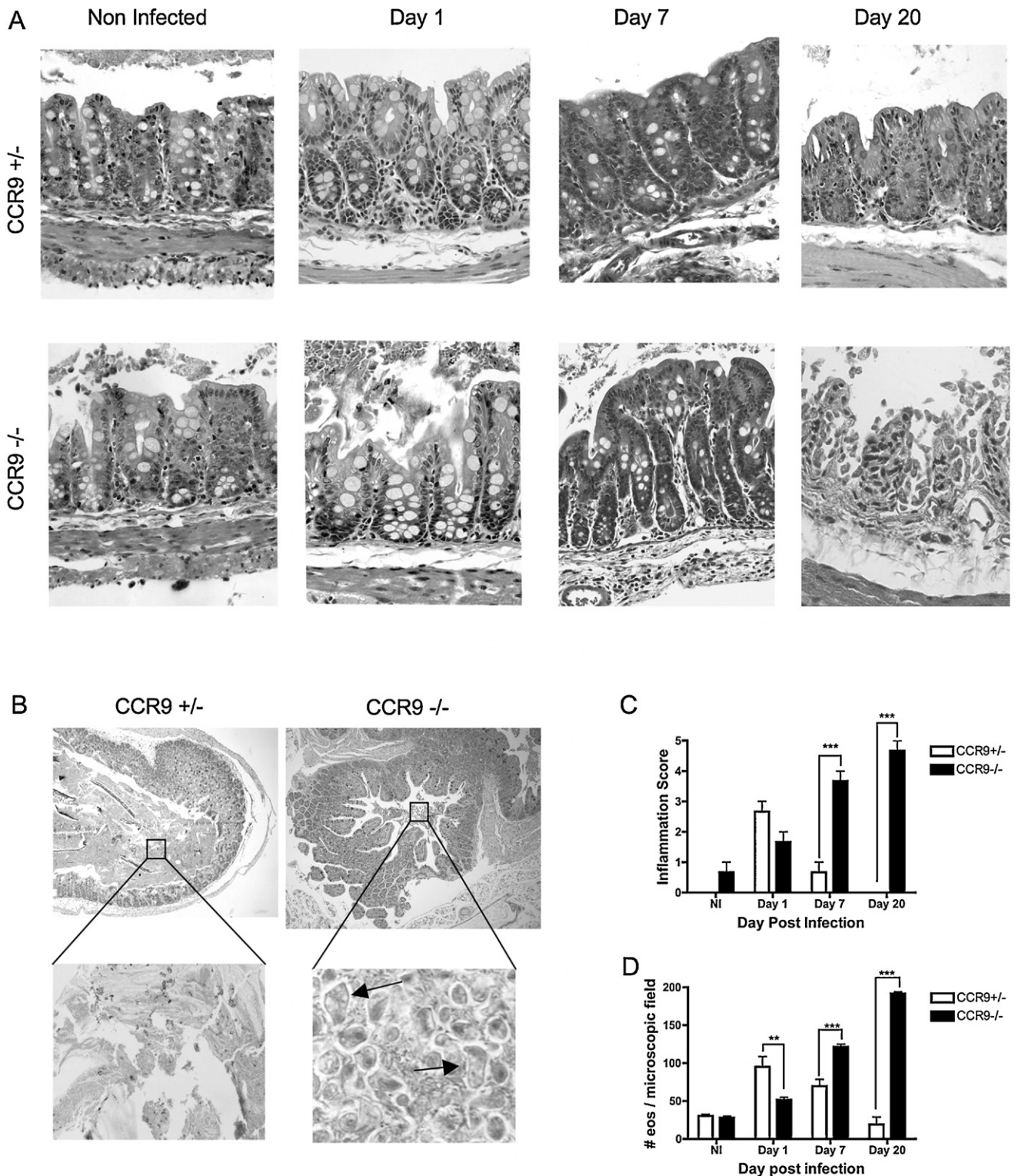


Fig. 1. CCR9^{−/−} mice developed a chronic inflammatory immune response to *E. histolytica* infection in the colon: (A) histological analysis of cecal tissues obtained from CCR9^{+/-} and CCR9^{-/-} infected and non-infected (NI) mice at days 1, 7 and 20 post-infection (pi). All pictures were taken at 40× magnification. (B) Identification of *E. histolytica* trophozoites in the cecum lumen of infected mice at day 7 pi. Trophozoites are shown and indicated by black arrows (40× magnification). (C) Analysis of histological inflammation scores after *E. histolytica* infection. Scores were determined as indicated in 'Materials and methods' section. (D) Number of eosinophils observed per cecal tissue section field. Average of four fields per tissue section observed at 100× magnification. CCR9^{+/-} (open bars) and CCR9^{-/-} (closed bars). Data shown from N=3, from three independent experiments. ***P*<0.01, ****P*<0.001.

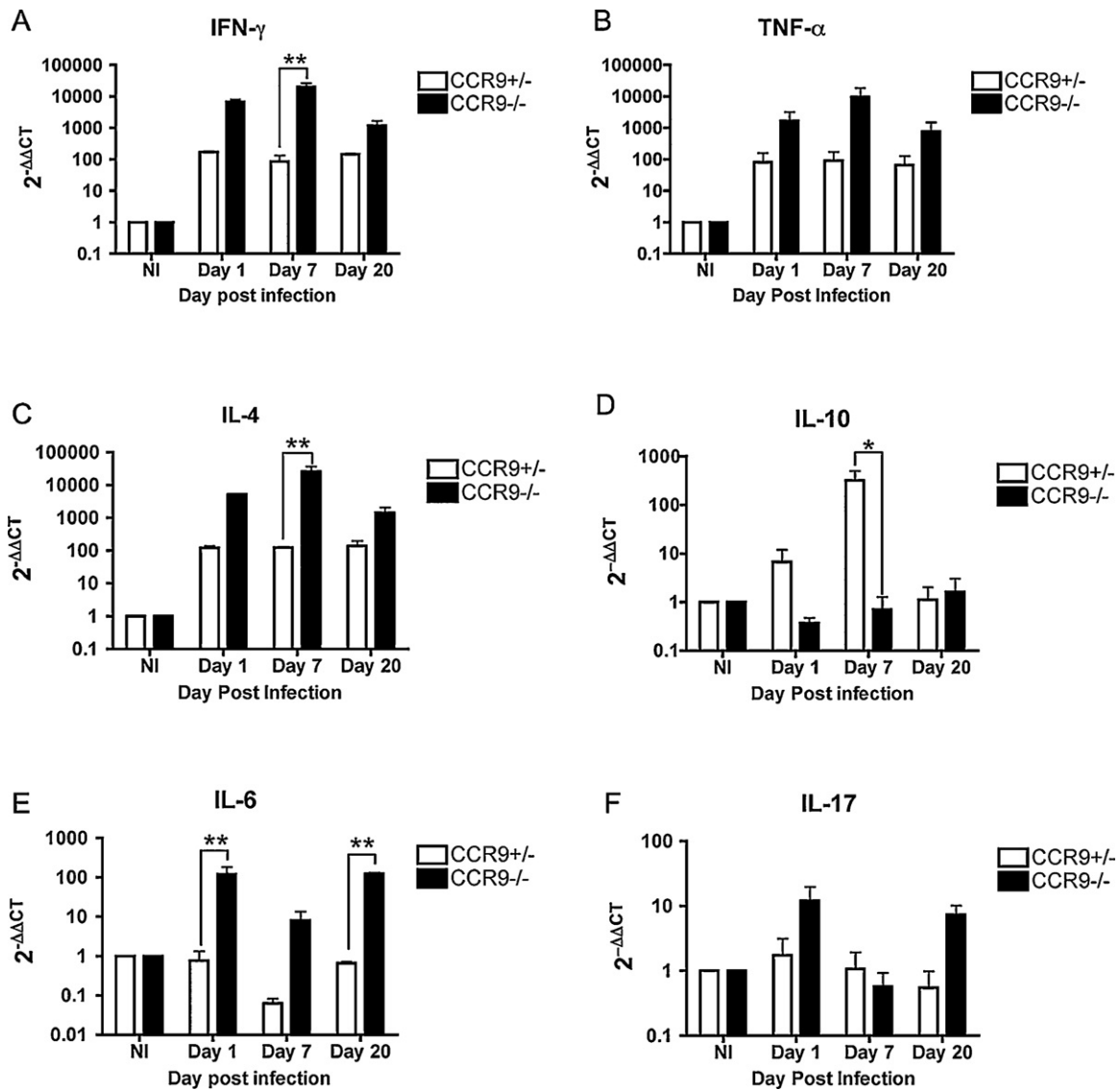


Fig. 2. CCR9^{-/-} infected mice have an increased expression of proinflammatory cytokines and impaired IL-10 expression: $\Delta\Delta\text{CT}$ analysis of relative gene expression of (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-4, (D) IL-10, (E) IL-6 and (F) IL-17 cytokines in total cecal lysates of CCR9^{+/-} (open bars), CCR9^{-/-} (closed bars), non-infected (NI) and *E. histolytica* infected mice sacrificed at days 1, 7 and 20 pi. β -actin was used as housekeeping gene. Analysis of three mice per time analyzed. $N = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

The inflammatory response observed in E. histolytica infected CCR9^{-/-} mice is associated with an increase in pro-inflammatory chemokines and chemokine receptor expression

To characterize the chemokine/chemokine receptor axis leading to the inflammatory response observed during infection in CCR9^{+/-} and KO mice, we analyzed the expression of CCR9, CCR10, CCR3, CCR6 chemokine receptors and their ligands CCL25, CCL28, CCL11 and CCL20, respectively, by qRT-PCR. *E. histolytica* infection induced a statistically significant increase in CCR9 relative gene expression cecal tissue from CCR9^{+/-} compared to NI controls at all time points analyzed (Fig. 4A; $P < 0.05$), while CCL25 was significantly increased in CCR9^{+/-} mice compared to KO mice at day 1 pi (Fig. 4B; $P < 0.001$). These results indicate that CCR9⁺ cells might contribute to the early control of infection and inflammation in response to *E. histolytica*.

Also, we analyzed the expression of CCR10, CCR6, and CCR3 receptors, which have been associated with leukocyte recruitment to the intestinal mucosa under inflammatory conditions. We observed a significant increase in CCR10 gene expression in KO mice at days 1 and 20 pi, compared to CCR9^{+/-} mice (Fig. 5A; $P < 0.001$ – 0.01); although no differences were observed in the

expression of its ligand CCL28 between experimental and control groups during the course of infection (Fig. 5B; $P < 0.001$ – 0.01). In addition, CCR6 and CCL20 levels were significantly increased in KO mice compared to NI controls and CCR9^{+/-} mice during the course of the infection (Fig. 5C and D; $P < 0.001$). Finally, we found a significant increase in the expression of both CCL11 and its CCR3 receptor from day 1 which was slightly higher at day 20 post-infection in KO mice, compared to CCR9^{+/-} mice (Fig. 5C and D; $P < 0.001$ – 0.01).

CCR9 KO mice show impaired recruitment of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IEL to the intestinal mucosa in response to E. histolytica infection

As we found an impairment of IL-10 production in the absence of CCR9, we hypothesized that it might be due to a reduction in the recruitment of CCR9⁺ Treg cells to the cecal mucosa of infected KO mice. To confirm this possibility, we isolated mesenteric lymph node (MLN), spleen, cecal intraepithelial (IE) and lamina propria (LP) lymphocytes of non infected (NI) and infected mice, and analyzed the total numbers and percentages of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells between experimental and control groups by flow cytometry. Our

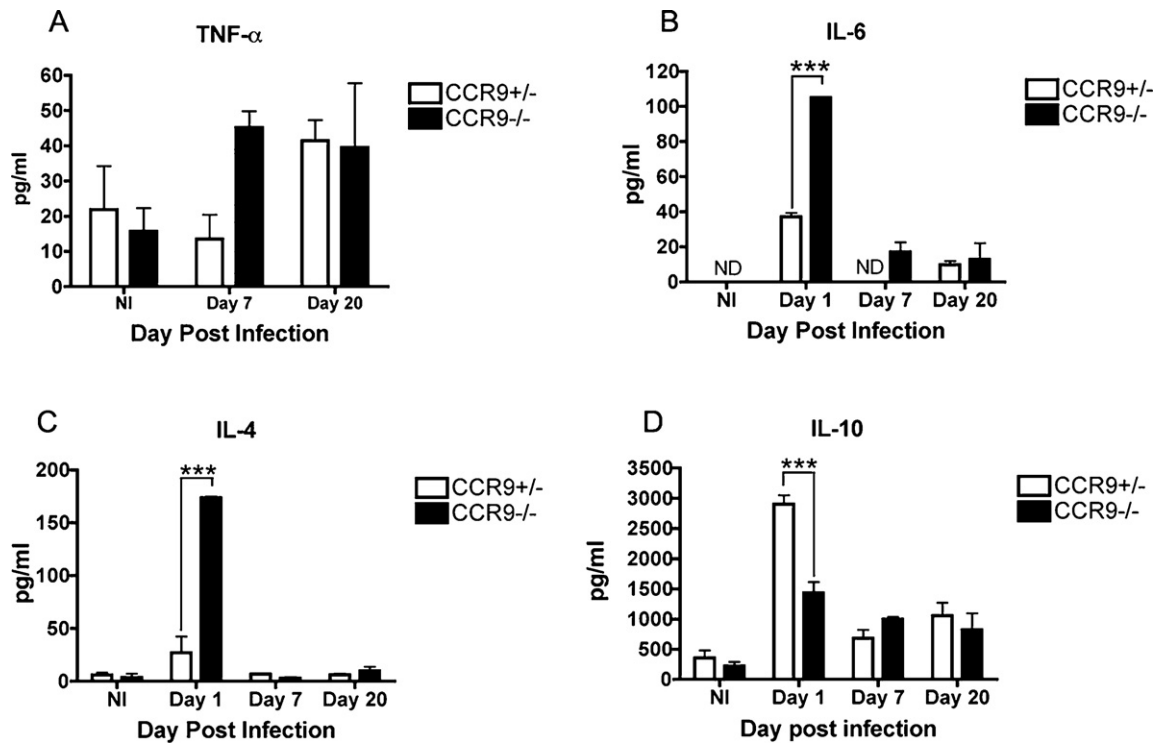


Fig. 3. CCR9^{-/-} infected mice have differential expression of proinflammatory cytokines protein levels: (A) TNF-α, (B) IL-6, (C) IL-4 and (D) IL-10 in total cecal lysates of CCR9^{+/-} (open bars), CCR9^{-/-} (closed bars), non infected (NI) and *E. histolytica* infected mice, sacrificed at days 1, 7 and 20 pi. Protein levels were measured by ELISA assays. Analysis of three mice per time analyzed. Asterisks indicate statistically significant differences: ****P* < 0.001. Data are representative of three independent experiments.

results showed no differences in the percentages and number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells in MLN and spleen lymphocytes between experimental groups in all times analyzed (data not shown). This could imply that recruitment of Treg cells in response to *E. histolytica* into secondary lymphoid tissues might not be fully impaired in the absence of CCR9. However, we found significant differences in the number of CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells isolated from cecal tissue, between experimental groups. Although no significant differences were observed in the percentages of CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ IEL between CCR9^{+/-} and KO infected mice (Fig. 6A and C), the number of total CD4⁺ IEL was reduced in KO mice at day 7 pi (Fig. 6B; *P* < 0.05). In addition, the total number of CD4⁺CD25⁺ IEL was reduced at day 1 but increased by day 20 post-infection in the KO mice compared to WT mice (Fig. 6D; *P* < 0.05, *P* < 0.001) which may represent infiltrating activated CD4⁺ T lymphocytes.

In contrast to the data obtained in IEL, analysis of LPL showed no differences in the total cell number or in the percentage of CD4⁺ T

lymphocytes between CCR9^{+/-} and KO mice (Fig. 6G and H). On the other hand, at day 1 pi, we observed a significant reduction in the percentage (*P* < 0.001) and number (*P* < 0.05) of CD4⁺CD25⁺ T cells in the LPL of KO mice (non infected and infected), compared to non infected and infected CCR9^{+/-} mice respectively, while these cells increased in percentage (*P* < 0.001) and numbers (*P* < 0.05) at day 7 and 20 pi in the lamina propria of KO mice, compared to CCR9^{+/-} mice (Fig. 6I and J).

When we analyzed the percentage and number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ it was found a reduction in the percentage of Tregs in the IEL population of KO mice at day 7 (Fig. 6E), while in the lamina propria of KO mice, Treg cells increased at day 7 pi (Fig. 6K, *P* < 0.05). Total Treg cell numbers of IEL and LPL were also affected; we observed a significant reduction in the number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IEL at day 1 pi (Fig. 6F; *P* < 0.05), and an increase in the number of the LPL subpopulation by day 7 pi in KO mice, compared to CCR9^{+/-} mice (Fig. 6L; *P* < 0.01).

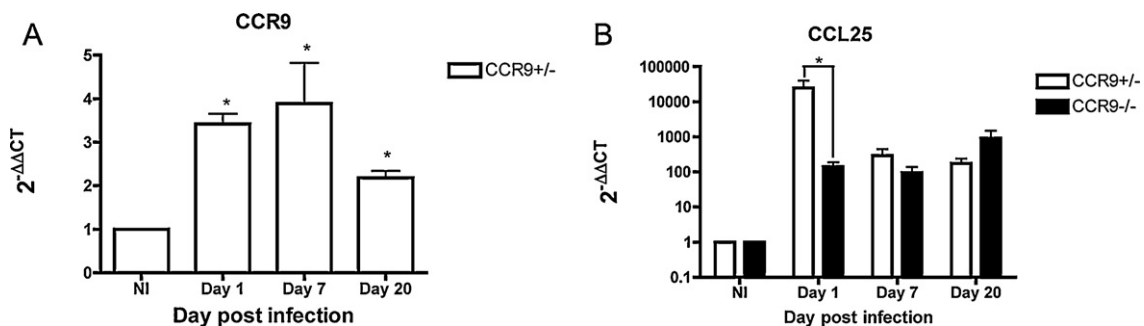


Fig. 4. *E. histolytica* colonic infection induces an increase in the mRNA expression of CCR9 and CCL25 in WT mice cecum: ΔΔCT analysis of relative gene expression of (A) CCR9 and (B) CCL25 in total cecal lysates of CCR9^{+/-} (open bars), CCR9^{-/-} (closed bars) non-infected (NI) and *E. histolytica* infected mice, sacrificed at days 1, 7 and 20 pi. β-actin was used as housekeeping gene. Analysis of three mice per time analyzed. Asterisks indicate statistically significant differences: ***P* < 0.01. Data are representative of three independent experiments.

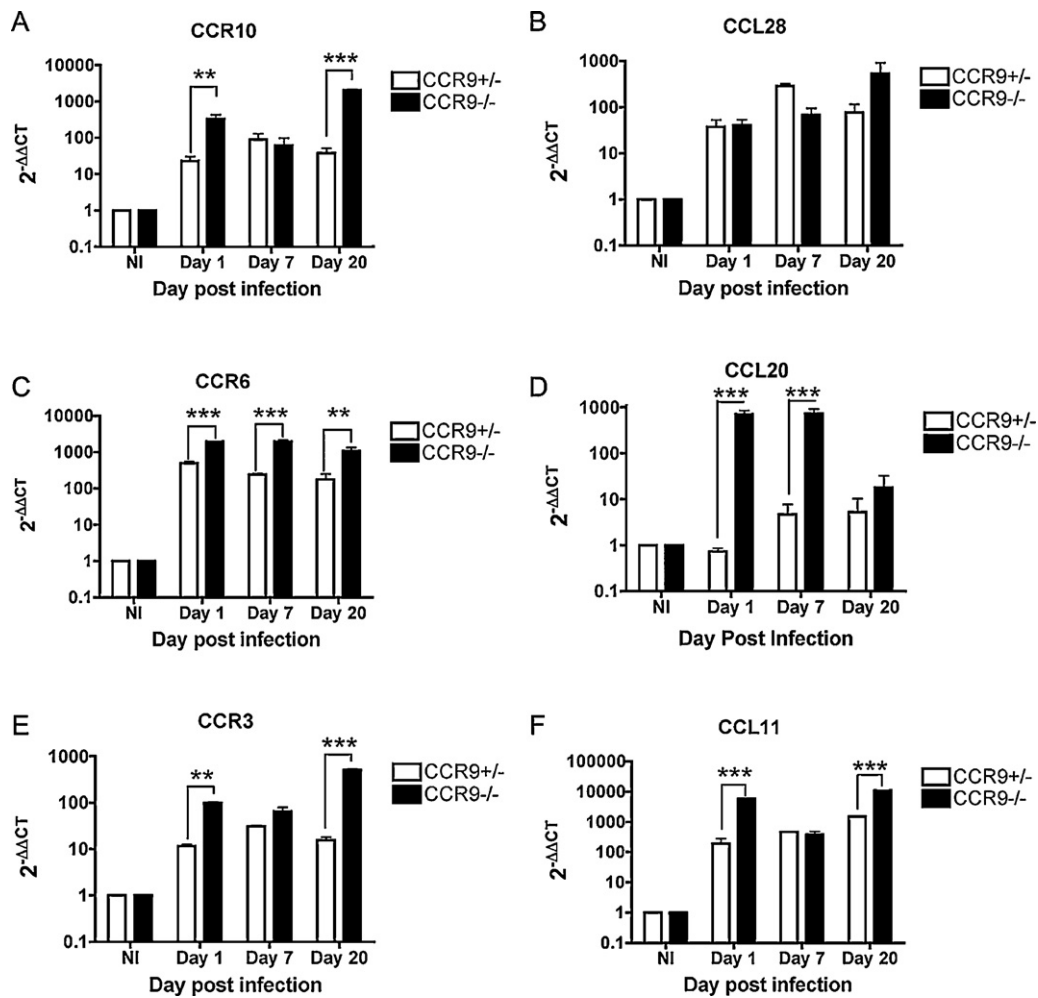


Fig. 5. CCR9^{-/-} infected mice showed increased expression of chemokines and chemokine receptors compared to WT mice. $\Delta\Delta CT$ analysis of relative gene expression of (A) CCR10, (B) CCL28, (C) CCR6, (D) CCL20, (E) CCR3 and (F) CCL11 in total cecal lysates of CCR9^{+/+} (open bars) and CCR9^{-/-} (closed bars) non-infected (NI) and *E. histolytica* infected mice sacrificed at days 1, 7 and 20 pi. β -actin was used as housekeeping gene. Three mice per time were analyzed, per duplicate. Data are representative of three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

We further analyzed the expression of CCR9 in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IEL and LPL isolated from cecal tissue of CCR9^{+/+} mice. As shown in Fig. 7, there was an increase of CD4⁺CCR9⁺ T cells but not CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ CCR9⁺ T cells in the IEL population at day 7 pi, whereas at day 20 pi, there was an increase that correlated with an impairment of IL-10 expression. Thus, a steady number of CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ in IEL and LPL populations may be needed to preserve intestinal epithelial integrity and may be required for an early resolution of inflammation during infection.

CCR9⁺ cells are present in colonic tissue of fulminant amoebic colitis patients

To assess the functional relevance of the CCR9⁺ subpopulation in patients with amoebiasis, we analyzed by immunohistochemistry the expression of CCR9 on sections of colonic tissue obtained from fulminant amoebic colitis patients. We found an increase of CCR9⁺ cells in the lamina propria and intraepithelial cells in the colon of these patients (Fig. 8A) compared to controls (Fig. 8B). These results suggest that CCR9⁺ cells are recruited into the colon during development of the immune inflammatory response during human amoebic colitis.

Discussion

Amoebic colitis is a clinical manifestation of intestinal amoebiasis that causes more than 50% of the deaths associated with *E. histolytica* infection worldwide and is only present in a small percentage of symptomatic patients (WHO 2010). Although the immune responses that mediate pathology and contribute to resolution of the *E. histolytica* infection have been investigated, the mechanisms that regulate inflammation during infection, and the role of intraepithelial and lamina propria T lymphocytes in limiting amoebic colitis immunopathology are poorly understood.

Although several chemokine receptors have been reported to induce migration of T cells to the intestinal mucosa in homeostatic and inflammatory conditions (Schaerli and Moser 2005), only CCR9 expression, together with $\alpha 4\beta 7$ expression, has been recognized as the homing receptor for small intestinal T cells in response to CCL25 produced by epithelial cells (Wurbel et al. 2000, 2001).

Almost 85% of total of human small intestinal T cells express CCR9, but only 15% of these cells are present in colon (Kunkel et al. 2003). CCR9 also mediates the recruitment of mouse and human IgA plasmablast, plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and macrophages to the intestinal mucosa (Wendland et al. 2007; Sundstrom et al. 2008; Mora and von Andrian 2009). CCR9⁺ pDC and macrophages may participate in the resolution of colitis since the absence of CCR9

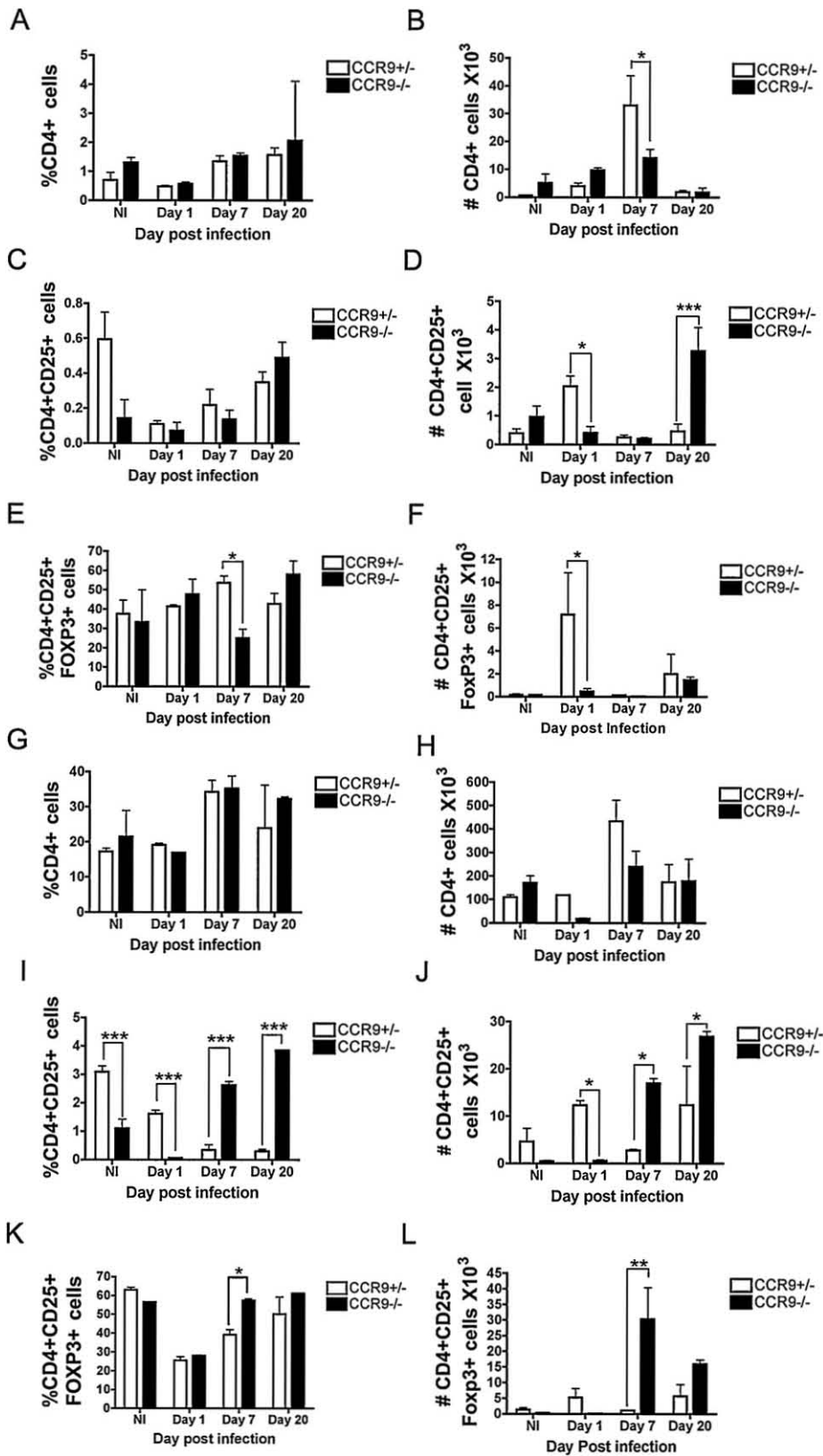


Fig. 6. CCR9^{-/-} showed reduced percentage and number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IEL cells at day 1 pi compared to WT mice: FACS analysis of CD4, CD25 surface expression and FoxP3 in IEL (A–F) and LP lymphocytes (G–L) isolated from cecal mucosa of CCR9^{+/-} and CCR9^{-/-} NI and *E. histolytica* infected mice. Percentages (A, C, E, G, I and K) and total numbers ($\times 10^3$) (B, D, F, H, J and L) are shown. A, B, G and H, represent CD4⁺ cells; C, D and J, CD4⁺CD25⁺ cells; I, E, F, K and L, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells. Analysis of three mice per time. $N=3$ Asterisks indicate statistically significant differences * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

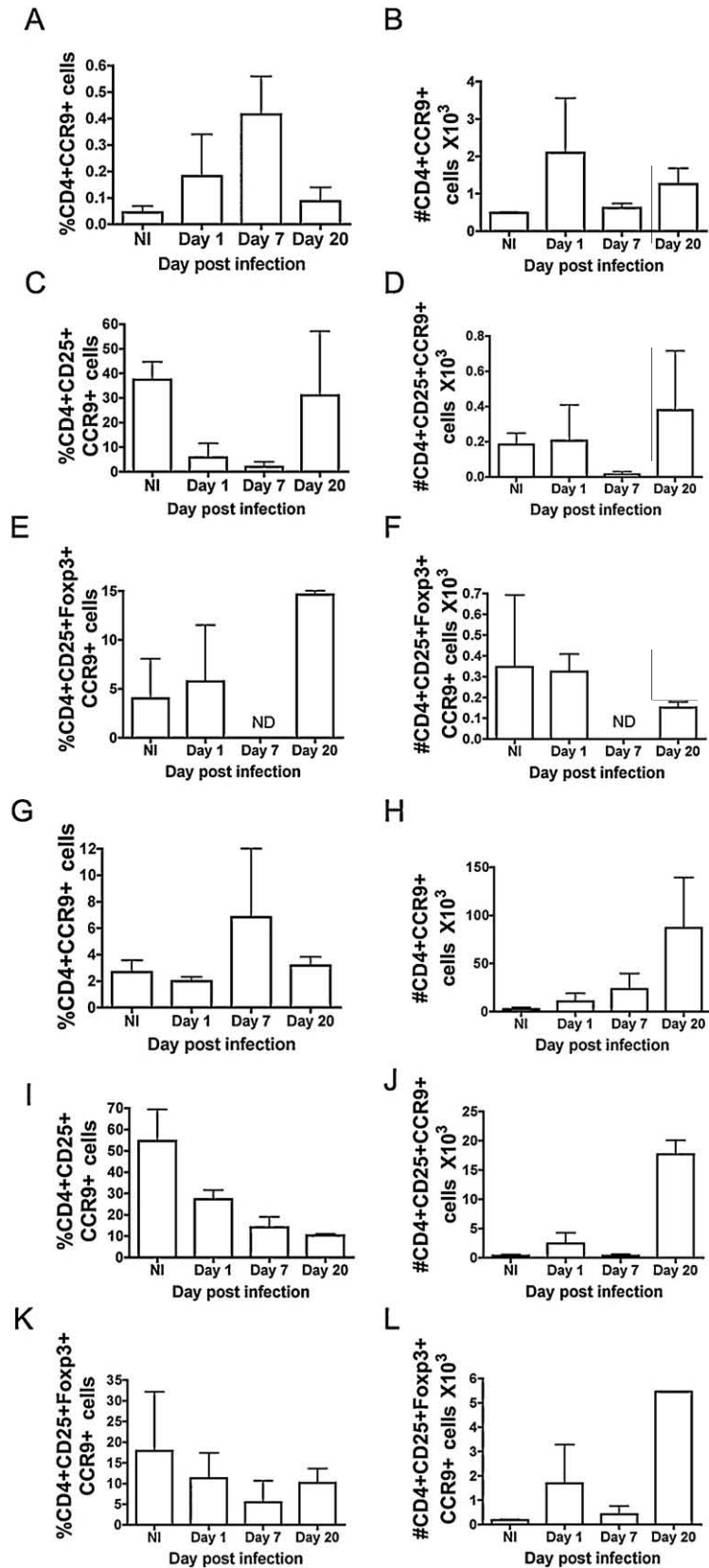


Fig. 7. CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells are required for resolution of inflammation after *E. histolytica* infection. FACS analysis for the surface expression of CCR9, CD4, CD25, and FoxP3 in IE (A–F) and LP lymphocytes (G–L) isolated from cecal mucosa of CCR9^{-/-} NI and *E. histolytica* infected mice. Percentages (A, C, E, G, I and K) and total numbers ($\times 10^3$) (B, D, F, H, J and L) are shown. A, B, G and H, represent CCR9⁺CD4⁺ cells; C, D, I, and J, represent CCR9⁺CD4⁺CD25⁺ cells; E, F, K and L, represent CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells. Data shown are obtained from pooled mice. Analysis was performed from three mice per time analyzed. $N = 3$.

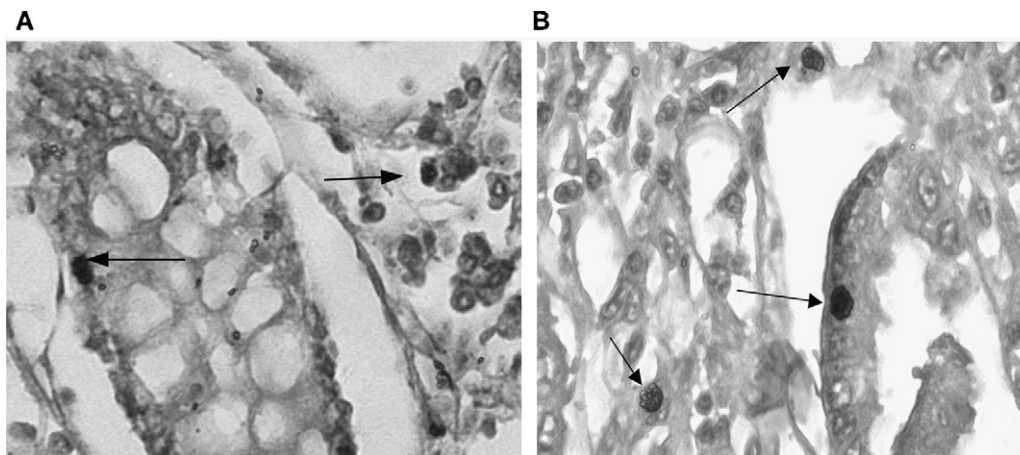


Fig. 8. Analysis of CCR9⁺ expression in the inflammatory cell infiltrate of amoebic colitis patients. Immunohistochemistry analysis of human CCR9 in formalin-fixed colon tissue sections of (A) a non infected subject and (B) an amoebic colitis patient. Black arrows indicate CCR9⁺ cells. Image displays data from one representative patient.

increases disease susceptibility, as it was reported recently (Wurzel et al. 2011). However, CCR9⁺ Treg cells contribution to inflammation control during pathogen infection in the colon, specifically by *E. histolytica*, has not been addressed.

In this report, we analyzed the role of CCR9 in the development of the inflammatory process during experimental *E. histolytica* infection. Our data demonstrated that in the absence of CCR9, *E. histolytica* trophozoites induced chronic inflammation characterized by an increase in eosinophil recruitment and the expression and secretion of pro-inflammatory cytokines, differential chemokine/chemokine receptor expression, accompanied by impaired production of IL-10 in the cecal mucosa. Of importance, trophozoites were identified in cecal lumen of CCR9 KO mice as far as day 7 pi, compared to CCR9^{+/-} mice that were able to control infection within hours, since no trophozoites were identified at this time post-infection.

Analysis of murine models of infection has shown that amoebic colitis develops after *E. histolytica* trophozoites deplete the mucus barrier invading the intestinal epithelium. Epithelial cells might respond by secreting proinflammatory cytokines and chemokines that induce the migration of neutrophils and mononuclear cells into the colon mucosa (Seydel and Stanley 1998; Garcia-Zepeda et al. 2007; Mortimer and Chadee 2010). Although *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that neutrophils are important in controlling *E. histolytica* infection, they are also associated with tissue destruction contributing to disease progression (Seydel et al. 1997; Stenson et al. 2001; Zhang et al. 2003). In the chronic phase of the disease, macrophages, plasma cells, lymphocytes, and eosinophils are also recruited into the lamina propria. Infiltration of granulocytes is a characteristic of human intestinal lesions (Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo 2000; Ventura-Juarez et al. 2007). Also, in murine models of intestinal amoebiasis, an increase in PMN cells, particularly eosinophil, has been reported (Ghosh et al. 2000). Nevertheless, controversy exists regarding a specific role for eosinophils in regulating *E. histolytica* infection (Lopez-Osuna et al. 1997). In human, eosinophils are located in the fibrous zone that separates the floor of the ulcers from viable human tissue, in the lamina propria (LP) of amoebic colitis patients suggesting a potential role for these cells in the progression of infection and mucosal lesion development, although it remains to be elucidated (Prathap and Gilman 1970; Ventura-Juarez et al. 2007).

At the chronic stage of amoebic colitis, a proper balance between Th1 (protective) and Th2 (detrimental) cytokine responses may be important to resolve infection (Haupt et al. 2002; Guo et al. 2008a,b). It is clear now that pro-inflammatory cytokines have a role in regulating inflammation during *in vitro* stimulation or

after *in vivo E. histolytica* infection. Indeed, recent studies in animal models have suggested that a Th1-IFN- γ dependent responses may provide protection (Guo et al. 2011). IL-6 drives the recruitment of neutrophils to inflamed tissues (Fattori et al. 1994; Romani et al. 1996) and has shown an important role in the protection from *E. histolytica* liver abscess formation (Estrada-Villasenor et al. 2007). In addition, IL-6 has a relevant role in the development of experimental colitis and has been found in high levels in patients with ulcerative colitis (UC) (Kaser et al. 2004; Kaser and Tilg 2008; Mudter et al. 2008). IL-6 also has a direct effect in the function of Treg cells, as the trans-signalling of this cytokine with its soluble receptor reduces induction of adaptive Treg (Dominitzki et al. 2007). Likewise, IL-4 has been identified as a key participant in T cell mediated responses during *E. histolytica* experimental infection in a susceptible mouse strain. CD4⁺ T cell depletion of infected mice diminished the production of IL-4 and IL-13, contributing to the resolution of experimental infection (Haupt et al. 2002). Moreover, increased levels of IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-6 cytokines have been identified in amoebic colitis patients (Bansal et al. 2005; Sierra-Puente et al. 2009).

In our model, we analyzed cytokine expression both at mRNA and protein level in CCR9 KO infected mice and compared with NI controls. Our results showed a statistical significant increase in the expression of IFN- γ , IL-4 and IL-6, and an average increment in TNF- α and IL-17 transcripts in cecal tissue of CCR9 KO mice since day 1 of infection. This increase remained even after day 20 pi. These results, together with an increase in eosinophil recruitment to the LP of infected mice, may suggest that in absence of CCR9, a Th2 detrimental response may be developing.

It has been proposed that unregulated Th1, Th2, and Th17 responses, may be responsible for inducing colitis in murine models, due to a deficiency of regulatory mechanisms mediated by CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells and IL-10 secretion (Izcue et al. 2009). Intestinal IL-10 expression has been identified in *E. histolytica* susceptible mouse strains as well as in human epithelial cell lines exposed to amoeba-derived proteins (Sharma et al. 2005; Kasper and Buzoni-Gatel 2001). In bone marrow-chimerical mice infected with *E. histolytica*, epithelial cell-derived IL-10 is proposed as the main mechanism to resolve inflammation. In this model, depletion of CD4⁺CD25⁺T cells showed no significant differences in the inflammatory scores recorded by histological examinations compared to non-depleted controls. Nevertheless, since depletion of CD4⁺CD25⁺ using anti-CD25 antibodies is transitory and not specific for FoxP3⁺ cells, suggesting that a role for IL-10 produced by Treg cells during infection should not be excluded (Hamano et al. 2006). Interestingly, we found reduced levels of IL-10 in CCR9 KO

infected mice compared to NI controls. These results imply that in the absence of CCR9⁺, the inflammation observed in infected CCR9 KO mice is, in part, related to a deficiency in the regulatory mechanisms driven by IL-10.

It is now clear that stromal and dendritic cell-derived retinoic acid (RA) induces expression of CCR9 chemokine receptor and $\alpha 4\beta 7$ integrin on CD4⁺T cells, in draining mesenteric lymph nodes, imprinting gut-homing specificity that enables lymphocyte migration to the small intestine. Furthermore, RA has an additional role in inducing CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells under inflammatory conditions (Iwata et al. 2004; Hammerschmidt et al. 2008; Kang et al. 2009). However, it has not been studied the role of these Treg cells in the regulation of the inflammatory response under pathogen-induced colitis. In our experimental model of colonic *E. histolytica* infection, we analyzed the percentages and total numbers of IEL and LPL CD4⁺ and CD8⁺ T cells populations isolated from the cecal mucosa of WT and CCR9 KO infected mice. In WT infected mice, CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CCR9⁺ T cells were identified in cecal IEL and LPL subpopulations. However, no differences were found in the percentage and total numbers of these subpopulations at different times post-infection. Since CCR9^{+/-} infected mice did not develop disease, it is not surprising that the proportion of CCR9⁺CD4⁺ subpopulations were not changed in these mice.

A significant increase in relative gene expression of CCR9 in cecal tissue of infected mice compared to NI controls was determined. Likewise, CCL25 expression increased in CCR9^{+/-} mice compared to CCR9 KO mice at day 1 pi. This increase in both CCR9 and CCL25 ligand expression in infected CCR9^{+/-} mice could result in augmented recruitment of CCR9⁺ macrophages and DCs that might be involved in controlling inflammatory immune responses in the intestinal mucosa. Also, this might reflect an increase in surface expression of CCR9 on IEL and LPL cells.

Opposite to that observed in infected WT mice, CCR9 KO mice displayed reduced numbers of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IEL, and LPL at day 1 pi. CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells started to accumulate in the LP of KO mice at day 7 pi, with no increment in their number in the intraepithelial population. These results demonstrate that, although Treg cells are able to enter the colon mucosa in absence of CCR9 receptor, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ failed to migrate to cecal epithelium allowing development of amoebic colitis in CCR9 KO mice. The interaction between CCR9⁺ Treg cells and intestinal epithelial cells (IECs) could be fundamental in conferring protection to *E. histolytica* infection, through either direct synthesis of IL-10 by CCR9⁺ Treg cells, or by stimulation of IEC.

The interaction between CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and IEC through adhesion molecules such as CD103 could stimulate IEC for the production of regulatory cytokines. Moreover, increased CD103 expression in the Treg population within DC clusters in the LP has been observed during the establishment of colitis in a naïve T cell transfer model (Leithäuser et al. 2006). Resolution of inflammation in this model of colitis was associated to a subpopulation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IL-10-producing T cells that accumulate in the colon LP of transferred mice (Uhlir et al. 2006). In contrast, in our model, accumulation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IL-10 in LP of infected CCR9 KO mice was not sufficient to increase IL-10 expression and to resolve inflammation. Although IL-10 production is associated to CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T cells, we are not ruling out the possibility that other subpopulation of Tregs, such as Tr1 (FoxP3⁻) may also be involved in IL-10 production. Moreover, CCL25 signalling through CCR9 on Treg cells may also be directly involved in either up-regulating IL-10 expression by CCR9⁺ Treg cells, or by increasing CD103 expression on CCR9⁺ Treg cells, since a positive regulation of the expression of CD103 by CCL25 signalling has also been reported (Ericsson et al. 2004).

IL-10 KO mice have displayed a reduction in MUC-2 secretion, a major component of intestinal mucin, by goblet cells, favouring induction of intestinal inflammation by commensals (Schwerbrock et al. 2004). In this context, IL-10 secreted by CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ could stimulate epithelial cells to down-regulate the expression of proinflammatory cytokines and secretion of MUC-2, maintaining epithelial barrier integrity and promoting *E. histolytica* trophozoite expulsion.

In this report, we have analyzed several chemokine and chemokine receptors expression during murine amoebic colitis. We have shown that expression of chemokine receptors CCR10 and CCR6 were augmented in *E. histolytica* infected CCR9 KO mice. CCR10 is involved in recruitment of T and B lymphocytes to mucosal sites (Johansson-Lindbom and Agace 2007). In particular, CCR10 induce migration of IgA producing plasma cells to intestine LP in homeostasis (Kunkel et al. 2003; Kunkel 2003; Lazarus et al. 2003) and during viral infection (Feng et al. 2006). Although IgA seems to be non-protective in newly acquired intestinal amoebiasis, it has been demonstrated to protect from re-infection in endemic areas (Haque et al. 2002). Increased expression of CCR10 in CCR9 KO infected mice could be associated with an increase in IgA producing cells to the LP. CCR10⁺ cells contribution to disease progression in our model of infection remains to be investigated.

CCR6 chemokine receptor is required for proper migration of immature DCs to the subepithelial dome of Peyer patches (Cook et al. 2000). Also, CCR6 may be involved in the migration of both Th17 and IL-10 producer Treg cells to the colonic mucosa and correlated with protection against colitis (Kitamura et al. 2010; Wang et al. 2009). In our model of amoebic colitis we identified an augmented expression of CCR6 and its ligand CCL20 in cecal tissue of CCR9 KO infected mice compared to WT mice. However, this increase in CCR6 expression is not related with an increment in IL-10 cytokine expression, suggesting that CCR6⁺ IL-10 producer Treg cells may not be the main cell type recruited to LP during infection. Additionally, an increment in relative gene expression of IL-17 in CCR9 KO infected mice was identified, which may indicate that CCR6⁺ Th17 cells were recruited to LP in susceptible mice. Indeed, increased IL-17A expression has already been reported in murine models of amoebic colitis (Guo et al. 2008a,b). However the exact role of CCR6⁺ Th17 lymphocytes in amoebic colitis remains to be elucidated.

Earlier reports have demonstrated that *E. histolytica*-derived proteins induced expression of CC and CXC chemokines in human colonic epithelial cell lines (Kammanadiminti et al. 2007). However, very few reports have been published regarding chemokine expression in human amoebiasis patients. In one of these, CCL3, CCL4, CCL22 and CXCL8 chemokines were identified as being highly induced by multi-parasite infections in both adults and paediatric patients (Soboslay et al. 2006; Kocherscheidt et al. 2010). Moreover, lymphocytes obtained from amoebic liver abscess (ALA) patients respond to pathogenic *E. histolytica* lectin induced medium (LCM) by secreting CCL5 and increasing their CCR5 expression compared to non-pathogenic LCM (Sharma et al. 2005).

Expression of CCR9 in human parasitic diseases has not been thoroughly explored. To the best of our knowledge, only one report has been published analysing CCR9 expression in filaria-infected individuals. An increase in CCR9 expression was found in peripheral T and B lymphocytes and correlated with some of the pathological features of this disease (Babu et al. 2005). In our study, we have analyzed CCR9⁺ expression in the epithelium and lamina propria of fulminant amoebic colitis patients. Our results showed higher CCR9⁺ expression in lymphocytes of infected tissues compared to controls. To the best of our knowledge, this is the first report of CCR9 expression in amoebic colitis patients.

In summary, we have identified a CCR9⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IEL population that might be related with resolution of an early

inflammatory response, mediated by IL-10 expression that could be involved in further protection against development of amoebic colitis. Furthermore, our data suggest that CCR9 may be involved in the regulation of trafficking of cells with an important role in regulating the inflammatory process found in human intestinal amoebiasis. Thus, developing therapeutic strategies targeting these cells may be a novel strategy in reducing the inflammatory process associated to amoebiasis.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Maria T. Fortoul, Verónica Rodríguez and Judith Reyes from Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM for processing tissue samples for histological analysis. We thank Espiridión Ramos, and Mario Nequiz (Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM) for their technical assistance, and Dr. Aaron Silva for critical comments.

References

- Alford, S.K., Longmore, G.D., Stenson, W.F., Kemper, C., 2008. CD46-induced immunomodulatory CD4⁺ T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells. *J. Immunol.* 181, 2544.
- Babu, S., Blauvelt, C.P., Kumaraswami, V., Nutman, T.B., 2005. Chemokine receptors of T cells and of B cells in lymphatic filarial infection: a role for CCR9 in pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 191, 1018.
- Bansal, D., Sehgal, R., Chawla, Y., Malla, N., Mahajan, R.C., 2005. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol.* 27, 37.
- Cook, D.N., Prosser, D.M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N.A., Abbondanzo, S.J., Niu, X.D., Chen, S.C., Manfra, D.J., Wiekowski, M.T., Sullivan, L.M., Smith, S.R., Greenberg, H.B., Narula, S.K., Lipp, M., Lira, S.A., 2000. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 12, 495.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431.
- Dominitzi, S., Fantini, M.C., Neufert, C., Nikolaev, A., Galle, P.R., Scheller, J., Monteleone, G., Rose-John, S., Neurath, M.F., Becker, C., 2007. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Immunol.* 179, 2041.
- Ericsson, A., Svensson, M., Arya, A., Agace, W., 2004. CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 34, 2720.
- Espinosa-Cantellano, M., Martinez-Palomo, A., 2000. Pathogenesis of intestinal amoebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microb. Rev.* 13, 318.
- Estrada-Villasenor, E., Morales-Montor, J., Rodriguez-Dorantes, M., Ramos-Martinez, E., Nequiz-Avendano, M., Ostoa-Saloma, P., 2007. IL-6 KO mice develop experimental amoebic liver infection with eosinophilia. *J. Parasitol.* 93, 1424.
- Fattori, E., Cappelletti, M., Costa, P., Sellitto, C., Cantoni, L., Carelli, M., Faggioni, R., Fantuzzi, G., Ghezzi, P., Poli, V., 1994. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180, 1243.
- Feng, N., Jaimes, M.C., Lazarus, N.H., Monak, D., Zhang, C., Butcher, E.C., Greenberg, H.B., 2006. Redundant role of chemokines CCL25/TECK and CCL28/MEC in IgA⁺ plasmablast recruitment to the intestinal lamina propria after rotavirus infection. *J. Immunol.* 176, 5749.
- García-Zepeda, E.A., Rojas-Lopez, A., Esquivel-Velazquez, M., Ostoa-Saloma, P., 2007. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunol.* 29, 679.
- Ghosh, P.K., Ventura, G.J., Gupta, S., Serrano, J., Tsutsumi, V., Ortiz-Ortiz, L., 2000. Experimental amoebiasis: immunohistochemical study of immune cell populations. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 395.
- Greenberger, M.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Danforth, J.M., Goodman, R.E., Standiford, T.J., 1995. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumoniae. *J. Immunol.* 155, 722.
- Guo, X., Stroup, S.E., Houpt, E.R., 2008a. Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- γ . *Mucosal Immunol.* 1, 139.
- Guo, X., Barroso, L., Lyerly, D.M., Petri Jr., W.A., Houpt, E.R., 2011. CD4⁺ and CD8⁺ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. *Vaccine* 29, 772.
- Guo, Z., Jang, M., Otani, K., Bai, Z., Umemoto, E., Matsumoto, M., Nishiyama, M., Yamasaki, M., Ueha, S., Matsushima, K., Hirata, T., Miyasaka, M., 2008b. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *Int. Immunol.* 20, 307.
- Hamano, S., Asgharpour, A., Stroup, S.E., Wynn, T.A., Leiter, E.H., Houpt, E., 2006. Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production. *J. Immunol.* 177, 1208.
- Hammerschmidt, S.I., Ahrendt, M., Bode, U., Wahl, B., Kremmer, E., Forster, R., Pabst, O., 2008. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 205, 2483.
- Haque, R., Duggal, P., Ali, I.M., Hossain, M.B., Mondal, D., Sack, R.B., Farr, B.M., Beaty, T.H., Petri Jr., W.A., 2002. Innate and acquired resistance to amoebiasis in Bangladeshi children. *J. Infect. Dis.* 186, 547.
- Haupt, E.R., Glembocki, D.J., Obrig, T.G., Moskaluk, C.A., Lockhart, L.A., Wright, R.L., Seaner, R.M., Keepers, T.R., Wilkins, T.D., Petri Jr., W.A., 2002. The mouse model of amoebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 169, 4496.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., Song, S.Y., 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21, 527.
- Izcue, A., Coombes, J.L., Powrie, F., 2009. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 27, 313.
- Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W., 2007. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol. Rev.* 215, 226.
- Kammanadiminti, S.J., Dey, I., Chadee, K., 2007. Induction of monocyte chemoattractant protein 1 in colonic epithelial cells by *Entamoeba histolytica* is mediated via the phosphatidylinositol 3-kinase/p65 pathway. *Infect. Immun.* 75, 1765.
- Kang, S.G., Wang, C., Matsumoto, S., Kim, C.H., 2009. High and low vitamin A therapies induce distinct FoxP3⁺ T cell subsets and effectively control intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 1391.
- Kaser, A., Ludwiczek, O., Holzmann, S., Moschen, A.R., Weiss, G., Enrich, B., Graziadei, I., Dunzendorfer, S., Wiedermann, C.J., Mürtl, E., Grasl, E., Jasarevic, Z., Romani, N., Offner, F.A., Tilg, H., 2004. Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. *J. Clin. Immunol.* 24, 74.
- Kaser, A., Tilg, H., 2008. Novel therapeutic targets in the treatment of IBD. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 553.
- Kasper, L.H., Buzoni-Gatel, D., 2001. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect. Immun.* 69, 1.
- Kitamura, K., Farber, J.M., Kelsall, B.L., 2010. CCR6 marks regulatory T cells as a colonic IL-10-producing phenotype. *J. Immunol.* 185, 3295.
- Kocherscheidt, L., Agossou, A., Gantin, R.G., Hamm, D.M., Banla, M., Soboslay, P.T., 2010. Cytokine and chemokine responses in adults, newborns and children exposed to *Entamoeba histolytica*/dispar, *Onchocerca volvulus* and *Plasmodium falciparum*. *Pediatr. Allergy Immunol.* 21, e756.
- Kunkel, E., Campbell, D., Butcher, E., 2003. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 10, 313.
- Kunkel, E., 2003. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J. Clin. Invest.* 111, 1001.
- Lazarus, N.H., Kunkel, E.J., Johnston, B., Wilson, E., Youngman, K.R., Butcher, E.C., 2003. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J. Immunol.* 170, 3799.
- Lefrançois, L., Lycke, N., 2001. Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's patch, and lamina propria cells. In: Coligan, John E. (Ed.), *Current Protocols in Immunology*, Chapter 3, Unit 3.19.
- Leithäuser, F., Meinhardt-Krajina, T., Fink, K., Wotschke, B., Möller, P., Reimann, J., 2006. Foxp3-expressing CD103⁺ regulatory T cells accumulate in dendritic cell aggregates of the colonic mucosa in murine transfer colitis. *Am. J. Pathol.* 168, 1898.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402.
- Lopez-Osuna, M., Velazquez, J.R., Kretschmer, R.R., 1997. Does the eosinophil have a protective role in amoebiasis? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92 (Suppl. 2), 237.
- Mora, J.R., von Andrian, U.H., 2009. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Semin. Immunol.* 21, 28.
- Mortimer, L., Chadee, K., 2010. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 126, 366.
- Muder, J., Amoussina, L., Schenk, M., Yu, J., Brüstle, A., Weigmann, B., Atreya, R., Wirtz, S., Becker, C., Hoffman, A., Atreya, I., Biesterfeld, S., Galle, P.R., Lehr, H.A., Rose-John, S., Mueller, C., Lohoff, M., Neurath, M.F., 2008. The transcription factor IFN regulatory factor-4 controls experimental colitis in mice via T cell-derived IL-6. *J. Clin. Invest.* 118, 2415.
- Papadakis, K.A., Landers, C., Prehn, J., Kouroumalis, E.A., Moreno, S.T., Gutierrez-Ramos, J.C., Hodge, M.R., Targan, S.R., 2003. CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *J. Immunol.* 171, 159.
- Prathap, K., Gilman, R., 1970. The histopathology of acute intestinal amoebiasis. A rectal biopsy study. *Am. J. Pathol.* 60, 229.
- Rivero-Nava, L., Aguirre-García, J., Shibayama-Salas, M., Hernández-Pando, R., Tsutsumi, V., Calderón, J., 2002. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice. *Exp. Parasitol.* 101, 183.
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F., Poli, V., 1996. Impaired neutrophil response and CD4⁺ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J. Exp. Med.* 183, 1345.
- Sanchez Garay, M., Mujica Vargas, Y., 2009. Panorama Epidemiológico de la Amebiasis Intestinal en México, 2003–2008. Dirección General Adjunta de Epidemiología, Secretaría de Salud.
- Schaerli, P., Moser, B., 2005. Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol. Res.* 31, 57.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative $C(T)$ method. *Nat. Protoc.* 3, 1101.

- Schwerbrock, N.M., Makkink, M.K., van der Sluis, M., Buller, H.A., Einerhand, A.W., Sartor, R.B., Dekker, J., 2004. Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria. *Inflamm. Bowel Dis.* 10, 811.
- Seydel, K.B., Zhang, T., Stanley Jr., S.L., 1997. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 65, 3951.
- Seydel, K.B., Stanley Jr., S.L., 1998. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 2980.
- Sharma, M., Vohra, H., Bhasin, D., 2005. Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology* 131, 783.
- Sierra-Puente, R.E., Campos-Rodríguez, R., Jarillo-Luna, R.A., Muñoz-Fernández, L., Rodríguez, M.G., Muñoz-Ortega, M.H., Ventura-Juárez, J., 2009. Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol.* 31, 384.
- Soboslay, P.T., Hamm, D.M., Pfafflin, F., Fendt, J., Banla, M., Schulz-Key, H., 2006. Cytokine and chemokine responses in patients co-infected with *Entamoeba histolytica*/dispar *Necator americanus* and *Mansonella perstans* and changes after anti-parasite treatment. *Microbes Infect.* 8, 238.
- Stenson, W.F., Zhang, Z., Riehl, T., Stanley Jr., S.L., 2001. Amebic infection in the human colon induces cyclooxygenase-2. *Infect. Immun.* 69, 3382.
- Sundstrom, P., Lundin, S.B., Nilsson, L.A., Quiding-Jarbrink, M., 2008. Human IgA-secreting cells induced by intestinal, but not systemic, immunization respond to CCL25 (TECK) and CCL28 (MEC). *Eur. J. Immunol.* 38, 3327.
- Uhlig, H.H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., Tan- napfel, A., Fontenot, J.D., Ramsdell, F., Powrie, F., 2006. Characterization of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ and IL-10-secreting CD4⁺CD25⁺ T cells during cure of colitis. *J. Immunol.* 177, 5852.
- Ventura-Juarez, J., Barba-Gallardo, L.F., Munoz-Fernandez, L., Martinez-Medina, L., Marquez-Diaz, F., Sosa-Diaz, S.J., Gerardo-Rodriguez, M., Gonzalez-Romo, R., Campos-Rodriguez, R., 2007. Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol.* 29, 201.
- Wang, C., Kang, S., Lee, J., Sun, Z., Kim, C., 2009. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol.* 11.
- Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., Forster, R., 2007. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6347.
- Wurbel, M.A., Philippe, J.M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M.G., Malissen, M., Jordan, B.R., Malissen, B., Carrier, A., Naquet, P., 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur. J. Immunol.* 30, 262.
- Wurbel, M.A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Richelme, M., Carrier, A., Malissen, B., 2001. 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* 98, 2626.
- Wurbel, M.A., McIntire, M.G., Dwyer, P., Fiebiger, E., 2011. CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis. *PLoS ONE* 6, e16442.
- Yuan, Q., Bromley, S., Means, T., Jones, K., Hayashi, F., Bhan, A., Luster, A., 2007. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* 204, 1327.
- Zhang, Z., Mahajan, S., Zhang, X., Stanley Jr., S.L., 2003. Tumor necrosis factor is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse-human intestine xenograft model of disease. *Infect. Immun.* 71, 5355.
- WHO, 2010. World Health Statistics 2010. WHO Press.