



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE  
CDIP-2 (PÉPTIDO DERIVADO DE LA QUIMIOCINA CCL13) EN UN MODELO DE  
INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR**

?

**TESIS**

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

?

PRESENTA:

**ERIKA HAIDE MÉNDEZ ENRÍQUEZ**

?

**TUTOR**

DR. EDUARDO A. GARCÍA-ZEPEDA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. LEOPOLDO FLORES ROMO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO D.F. MAYO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

**VOCAL:** Dr. Enrique Ortega Soto

**VOCAL:** Dra. Sara Huerta Yépez

**VOCAL:** Dr. César Raúl González Bonilla

**SECRETARIO:** Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

**DIRECCIÓN DE TESIS**

**Dr. Eduardo Alberto García Zepeda**

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA,

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,

UNAM.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación sobre la Biología de las Quimiocinas (CBRL) del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Durante sus estudios de doctorado la sustentante recibió el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número 255922.

**A mis padres, por su guía,  
apoyo y comprensión.**

**A RAM, por darle más  
luz a mi camino.**

***“La ciencia es la poesía de la realidad”***

Richard Dawkins

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México; por formarme, por ser mi hogar, por mostrarme un mundo inimaginable de conocimiento y experiencias de vida. Muestro mi gratitud, a todos aquellos que lucharon para que nuestra Universidad sea hoy una garantía de justicia y educación pública para algunos Mexicanos. Abogo para que la UNAM siga creciendo y aprendiendo para formar más eficientemente, a las futuras generaciones de esta sociedad tan dividida por la desigualdad.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme el apoyo económico con número de beca 255922.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr Eduardo A. García-Zepeda, mi tutor académico y director de tesis, por su apoyo, ayuda para la realización de este trabajo, por su tiempo en la revisión, crítica durante toda mi formación y múltiples enseñanzas que me serán útiles el resto de la vida.

A la Dra Teresa Fortoul van der Goes por su tiempo, colaboración, por formar parte de mi comité tutor, por su profesionalismo, por darme confianza y ser un gran ejemplo como mujer en la ciencia.

Al Dr Leopoldo Flores Romo por sus aportaciones, colaboración durante esta tesis doctoral, por formar parte de mi comité tutor y por fomentar mi interés en la Inmunología con sus amenas presentaciones.

A la Dra Gloria Soldevila por el apoyo con múltiples reactivos durante la elaboración de este proyecto y por las enseñanzas académicas en seminarios.

A la Dra Jaciel Medina Tamayo, por su colaboración experimental, revisión exhaustiva de este manuscrito y la aportación de comentarios sobre el proyecto de investigación.

Al Dr Julio Valdivia Silva por sus aportaciones en la revisión de manuscritos, por sus comentarios objetivos y ejemplo profesional.

A los integrantes del jurado asignado para la revisión de este manuscrito: Dr Jesús Adolfo García Sáinz, Dr Enrique Ortega Soto, Dra Sara Huerta Yepez, Dr César Raúl González Bonilla, Dra Teresa Fortoul van der Goes; por sus comentarios críticos.

A la técnico académica Q.F.B. Gisela Dupont por su apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo de doctorado.

Al técnico académico Biólogo Jesús Ramsés Chávez Ríos por su apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo de doctorado.

Al Dr Badhin Gómez Valdez, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, por su apoyo con el modelo *in silico* de los péptidos.

Al personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, del cual obtuve los animales para la experimentación presentada en esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos del CBRL por motivarme y darme la mano en todo momento.

# ÍNDICE

Índice general	I
Índice de figuras	IV
Índice de Tablas	VI
Abreviaturas	VII
Resumen	VIII

# Índice general

<b>1. Antecedentes</b>	<b>1</b>
1.1. Quimiocinas . . . . .	1
1.1.1. Identificación y clasificación . . . . .	1
1.1.2. Características estructurales . . . . .	1
1.1.3. Papel de las quimiocinas en la inflamación . . . . .	3
1.2. Receptores de quimiocinas . . . . .	3
1.2.1. Mecanismos de activación y transducción de señales . . . . .	5
1.2.2. Mecanismos de regulación de la activación . . . . .	7
1.2.3. Internalización de receptores de quimiocina . . . . .	8
1.3. Proteínas quimioatrayentes de macrófagos . . . . .	9
1.4. Características de la quimiocina CCL13 . . . . .	9
1.5. Inflamación alérgica pulmonar . . . . .	11
1.5.1. Principales linajes celulares involucrados en asma . . . . .	14
1.6. Receptores de CCL13 implicados en el asma . . . . .	16
1.6.1. CCR1 . . . . .	16
1.6.2. CCR2 . . . . .	17
1.6.3. CCR3 . . . . .	17
1.7. CCL13 en el proceso asmático y enfermedades alérgicas . . . . .	17
1.8. Tratamientos farmacológicos usados en el asma . . . . .	18
1.9. Estrategias de bloqueo contra los receptores de quimiocina . . . . .	19
1.10. Péptidos derivados de CCL13 . . . . .	21
1.11. Mecanismos de los fármacos contra receptores de quimiocinas . . . . .	23
<b>2. Justificación</b>	<b>25</b>
<b>3. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>27</b>
3.1. Hipótesis . . . . .	27
3.2. Objetivos . . . . .	27
3.2.1. Objetivo general . . . . .	27
3.2.2. Objetivos específicos . . . . .	27
<b>4. Metodología experimental</b>	<b>29</b>
4.1. Células . . . . .	29
4.1.1. Separación de células mononucleares de sangre periférica humana . . . . .	29
4.2. Animales . . . . .	29
4.3. Experimentos <i>in vivo</i> . . . . .	30

4.3.1.	Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar (IAP)	30
4.4.	Procesamiento de las muestras	30
4.4.1.	Análisis por citometría de flujo de las células obtenidas del LBA	30
4.4.2.	Procesamiento del tejido pulmonar	31
4.4.3.	Extracción de ARN del tejido pulmonar	31
4.4.4.	Síntesis del ADN complementario	32
4.5.	Experimentos <i>in vitro</i>	32
4.5.1.	RT-PCR en tiempo real	32
4.5.2.	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para IgE, IgG1 anti OVA	32
4.5.3.	ELISA para determinar citocinas en LBA	33
4.5.4.	Estimulación con OVA de células extraídas de ganglio mediastinal.	33
4.6.	Activación de receptores de quimiocina	33
4.6.1.	Determinación de $Ca^{2+}$ intracelular	33
4.6.2.	Internalización de receptores de quimiocina por citometría de flujo	34
4.6.3.	Asociación de $\gamma$ -GTP	34
4.7.	Transfección de células	35
4.7.1.	Transfección de células CHO por electroporación	35
4.8.	Ensayos de quimiotaxis	35
4.9.	Derivación de eosinófilos	36
4.9.1.	Caracterización de eosinófilos murinos de médula ósea por citometría de flujo	37
4.9.2.	Western blot	37
4.9.3.	Estadística	37
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>38</b>
5.1.	Modelo murino	38
5.1.1.	Análisis por citometría de flujo de células del LBA obtenidas de ratones tratados y no tratados con CDIP-2	38
5.1.2.	Evaluación del infiltrado inflamatorio en pulmón	39
5.1.3.	Evaluación de citocinas en LBA y tejido pulmonar en ratones tratados con CDIP-2 por las técnicas de ELISA y RT-PCR	42
5.1.4.	Estudio del efecto de CDIP-2 en la secreción de citocinas $T_H2$ <i>in vitro</i>	45
5.1.5.	Determinación de inmunoglobulinas específicas anti OVA en LBA	45
5.2.	Efecto de CDIP-2 en eosinófilos	47
5.2.1.	Derivación y caracterización de eosinófilos murinos de médula ósea	47
5.2.2.	Quimiotaxis inducida por ligandos de CCR3 y CCR1 en eosinófilos murinos en presencia del péptido CDIP-2	49
5.2.3.	Efecto de CDIP-2 en la internalización del receptor CCR3 en eosinófilos	49
5.2.4.	Efecto de CDIP-2 en la expresión el gen de CCR3 y TNF- $\alpha$ , en eosinófilos murinos	49
5.2.5.	Evaluación de la liberación intracelular de $Ca^{2+}$ en eosinófilos murinos	51
5.2.6.	Fosforilación de las MAP cinasas: Erk y p38, en eosinófilos murinos incubados con CDIP-2	52
5.3.	Evaluación del efecto de CDIP-2 en el receptor hCCR3	55



5.3.1.	Evaluación del efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis mediada por el receptor hCCR3 . . . . .	55
5.3.2.	Evaluación de la disociación de GTP $\gamma$ S, . . . . .	55
5.3.3.	Efecto de CDIP-2 en la liberación de Ca <sup>2+</sup> intracelular debida a la activación del receptor hCCR3 . . . . .	58
5.3.4.	Efecto de CDIP-2 en la internalización del receptor CCR3 . . . . .	58
5.3.5.	Internalización de CCR1 y CCR2 producida por CDIP-2 . . . . .	61
5.4.	Efecto de CDIP-2 sobre la quimiotaxis inducida por ligandos de hCCR1 y hCCR2.	61
5.4.1.	Actividad del péptido CDIP-2 en el receptor humano CCR1 . . . . .	63
5.4.2.	CDIP-2 induce asociación de GTP en el receptor CCR1 . . . . .	63
5.4.3.	Efecto del péptido CDIP-2 en la liberación de Ca <sup>2+</sup> intracelular debida a la activación de CCR1 . . . . .	64
5.4.4.	Ensayos realizados con el receptor CCR2 . . . . .	64
5.4.5.	Efecto de CDIP-2 en la liberación de Ca <sup>2+</sup> en el receptor CCR2 . . . . .	67
<b>6.</b>	<b>Discusión</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>Apéndice: Soluciones y reactivos utilizados</b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>Artículos publicados</b>	<b>95</b>

# Índice de figuras

1.1. Quimiocinas humanas descritas, sus receptores y células que los expresan. . . . .	2
1.2. Familias de quimiocinas. . . . .	4
1.3. Principales vías de señalización activadas por las quimiocinas y sus receptores. . . . .	6
1.4. Regulación de la activación de receptores de quimiocina por internalización. . . . .	8
1.5. Familia de quimiocinas MCPs y eotaxinas. . . . .	10
1.6. Estructura terciaria del monómero de CCL13 . . . . .	11
1.7. Principales eventos inmunes inflamatorios durante el proceso asmático. . . . .	13
1.8. Péptido CDIP-2. . . . .	23
4.1. Protocolo experimental del modelo severo de IAP. . . . .	31
4.2. Protocolo para la diferenciación de eosinófilos de médula ósea. . . . .	36
5.1. Análisis de las células presentes en el LBA por citometría de flujo. . . . .	40
5.2. Evaluación del infiltrado inflamatorio en pulmón. . . . .	41
5.3. Estudio de la expresión relativa de genes relacionados con el proceso alérgico. . . . .	43
5.4. Determinación de citocinas en LBA. . . . .	44
5.5. Evaluación del efecto de CDIP-2 en la secreción de citocinas por células de ganglios mediastinales estimuladas <i>in vitro</i> con OVA. . . . .	46
5.6. Determinación de IgE e IgG1 específicas anti OVA en LBA. . . . .	47
5.7. Caracterización de los eosinófilos derivados de médula ósea por citometría de flujo y morfología. . . . .	48
5.8. Evaluación del efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis inducida por ligandos de CCR3 y CCR1. . . . .	50
5.9. Efecto de CDIP-2 en la internalización del receptor CCR3, en eosinófilos murinos . . . . .	51
5.10. Evaluación del ARN mensajero de CCR3 y TNF $\alpha$ en eosinófilos. . . . .	52
5.11. Evaluación de la liberación intracelular de Ca <sup>2+</sup> en eosinófilos . . . . .	53
5.12. Estudio de la fosforilación de Erk1/2 y p38. . . . .	54
5.13. Evaluación del efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis dada por la activación de CCR3. . . . .	56
5.14. Evaluación de la asociación de GTP $\gamma$ S en el receptor hCCR3. . . . .	57
5.15. Evaluación del Ca <sup>2+</sup> intracelular en el receptor hCCR3. . . . .	59
5.16. Estudio de la internalización del receptor hCCR3. . . . .	60
5.17. Estudio de la internalización de los receptores CCR2 y CCR1. . . . .	62
5.18. Evaluación del efecto del péptido CDIP-2 en la quimiotaxis dada por ligandos de los receptores CCR1 y CCR2). . . . .	63
5.19. Efecto del péptido CDIP-2 en la asociación de GTP $\gamma$ S producida por ligandos de CCR1. . . . .	65
5.20. Efecto de CDIP-2 en la liberación intracelular de Ca <sup>2+</sup> en el receptor hCCR1. . . . .	66

5.21. Efecto de CDIP-2 en la liberación intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ en el receptor hCCR2. . . . .	67
9.1. Plásmidos utilizados en la transfección. . . . .	86

# Índice de tablas

1.1. Ejemplos de fármacos en fase clínica y aprobados por la FDA que actúan sobre receptores de quimiocina. . . . .	20
1.2. Ejemplos de quimiocinas modificadas con actividad antagonista en inflamación. . . . .	21
1.3. Péptidos derivados de CCL13 con actividad biológica. . . . .	22

## Abreviaturas

**ARN:**Ácido ribonucleico

**ARNm:**Ácido ribonucleico mensajero

**BSA:**Albúmina sérica bovina

**cADN:**Ácido desoxiribonucleico complementario

**CDIP-2:**Chemokine Derived Inhibitory Peptide-2

**DMEM:**Dulbecco s modified Eagles medium

**dNTPs:**Desoxirribonucleótidos trifosfatados

**Erk 1/2:** Cinasa reguladas por señales extracelulares

**GAGs:**Glicosaminoglicanos

**GTP:**Guanosina 5 trifosfato

**GPCR:**Receptor acoplado a proteínas G

**IP.:**Administración intraperitoneal

**i.t:**Administración intratraqueal

**IFN $\gamma$ :**Interferón gamma

**Ig:**Inmunoglobulina

**IL:**Interleucina

**MAPK:**Proteínas cinasas activadas por mitógenos

**MCP:**Proteína quimioatrayente demacrófagos

**MPP:**Metaloproteinasas

**OVA:**Ovoalbúmina

**PBS:**Solución amortiguadora de fosfatos

**PCR:**Reacción en cadena de la polimerasa

**PLC:**Fosfolipasa C

**PI3K:**Cinasa de fosfatidil inositol 3

**PKC:**Proteína cinasa C

**PKA:**Proteína cinasa A

**SFB:**Suero fetal bovino

**TNF $\alpha$ :**Factor de necrosis tumoral alfa

**TCR:**Receptor de linfocito T

## Resumen

Las quimiocinas son proteínas con propiedades quimioatrayentes que regulan la migración celular en homeostasis e inflamación; inducen desgranulación celular, proliferación, angiogénesis y poseen actividad antimicrobiana. Las quimiocinas se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) con siete dominios transmembranales.

La expresión elevada de quimiocinas y la activación de sus receptores, se relaciona con el desarrollo y progresión de diversas enfermedades asociadas a la inflamación; como lo es el asma, síndrome que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo. En este contexto, la inhibición del reclutamiento de células inflamatorias al pulmón, inducido por las quimiocinas, representa un blanco farmacológico importante, como estrategia para reducir el daño al tejido, y evitar la pérdida de la función pulmonar debida a la inflamación crónica.

Se han investigado diversas estrategias para reducir la activación de los receptores de quimiocina, tales como el uso de anticuerpos, moléculas sintéticas, quimiocinas modificadas y péptidos. En este trabajo se muestra el estudio hecho al péptido sintético nombrado CDIP-2 (*Chemokine Derived Inhibitory Peptide-2*); el péptido CDIP-2 fue obtenido de la secuencia de la quimiocina CCL13; tiene 19 aminoácidos (*19-KISLQRLKSYVITTSRCPQ-37*), peso molecular de 2221.66g/Mol, carga neta de 4<sup>+</sup> a pH 7, posee residuos conservados en la familia de quimiocinas, principalmente los aminoácidos cargados positivamente que en otras quimiocinas como CCL2, se han identificado experimentalmente como residuos involucrados con la activación de receptores

Para estudiar la actividad del péptido CDIP-2 *in vivo*, se utilizó un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar (IAP) inducida con OVA (Ovoalbúmina). Con este modelo, se demostró que la administración intratraqueal (i.t.) de CDIP-2, redujo el número total de células presentes en Lavado Broncoalveolar (LBA); principalmente el número de eosinófilos y macrófagos. Adicionalmente, en el fluido del LBA, se encontró menor concentración de IL-4 (*Interleucina-4*) y TNF- $\alpha$  (*Factor de necrosis tumoral- $\alpha$* ), en las muestras de los ratones tratados con CDIP-2.

Utilizando diferentes sistemas celulares, se demostró que el péptido CDIP-2, modificó la quimiotaxis inducida por los ligandos de los receptores CCR1, CCR2 y CCR3; además de internalizar a los receptores sin inducir quimiotaxis, disociación de proteínas G, y fosforilación significativa de MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos). El péptido CDIP-2 presentó actividad directa en eosinófilos murinos, reduciendo la quimiotaxis, liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> inducida por CCL11, modulando la expresión de los ARNm de los genes de TNF- $\alpha$  y CCR3.

Por lo que se concluyó que el péptido CDIP-2 posee actividad de agonista parcial, sobre los receptores de CCL13 (CCR1, CCR2 y CCR3); este resultado se considera un hallazgo interesante, debido a que se desconoce hasta el momento qué aminoácidos de CCL13 son importantes para la activación de cada receptor, por lo que sugerimos, que el estudio de secuencias de aminoácidos presentes en péptidos como CDIP-2, podrían ser relevantes para la creación de moléculas antiinflamatorias mas eficaces.

# 1 Antecedentes

## 1.1. Quimiocinas

### 1.1.1. Identificación y clasificación

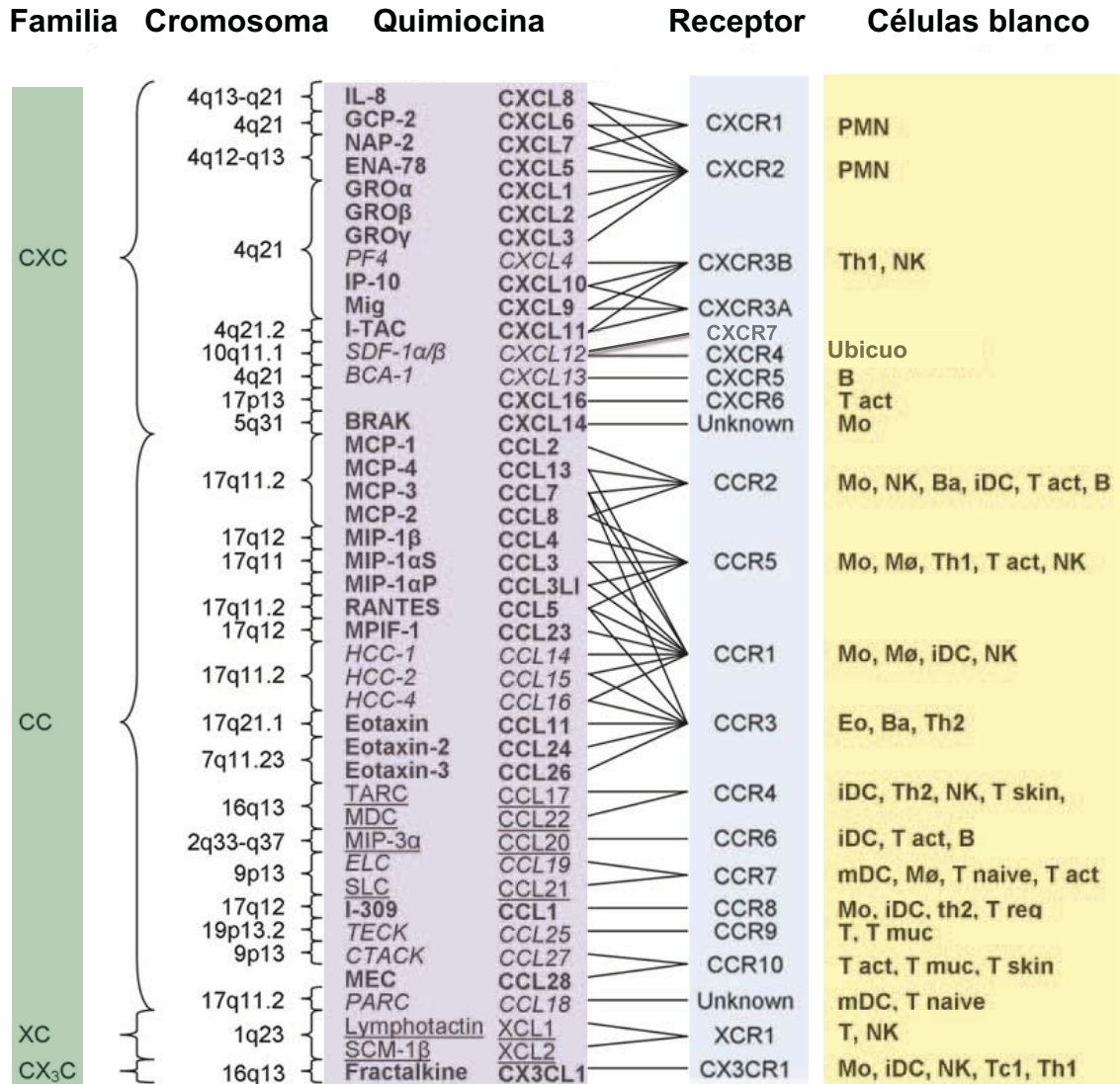
Las primeras observaciones de migración celular fueron descritas por el biólogo ruso Elie Metchnikoff, quien en sus experimentos de descripción de la fagocitosis publicados en 1884, observó que las células se movían direccionalmente hasta engullir partículas. Sin embargo, las proteínas con propiedades quimioatrayentes, denominadas quimiocinas (citocinas quimioatrayentes), fueron formalmente descritas hasta finales de 1980 [11].

Hasta nuestros días, se han clonado más de 50 quimiocinas, las cuales fueron inicialmente nombradas con siglas alusivas al contexto de su descubrimiento o a una función específica. En 1992, se decidió llamar a esta familia de citocinas como quimiocinas [1]. En 1999, se aprobó la nomenclatura sistemática para la familia de quimiocinas; esta clasificación se basa en la posición de cisteínas en la estructura primaria, teniendo a las familias; CC ( $\beta$ -quimiocinas), CXC ( $\alpha$ -quimiocinas), C ( $\gamma$ -quimiocinas), CX3C ( $\delta$ -quimiocinas), donde la X indica la presencia de un aminoácido cualquiera entre estas cisteínas, mientras que los receptores se nombran como CCR, CXCR, XCR y receptores atípicos [12].

Las quimiocinas homeostáticas se relaciona con la estructuración del sistema inmune, la localización celular restringida en diversos órganos y la recirculación celular; sus genes se agrupan en regiones presentes en diversos cromosomas (4, 5 y 16) altamente conservados entre especies; mientras que las quimiocinas proinflamatorias tienen un papel central en la acumulación de infiltrado inflamatorio, activación celular y su estructura genética es menos conservada entre especies localizándose en el caso de humanos en grandes grupos de genes en el cromosoma 4 y 17 (**Fig 1.1**) [13, 1].

### 1.1.2. Características estructurales

Las quimiocinas son proteínas básicas de 8-12 kDa de tamaño, son secretadas al medio extracelular a excepción de la fractalcina (CXCL3) que posee un dominio de mucina anclado a la membrana celular [2]. La estructura secundaria de las quimiocinas, se comparte entre familias, presentando una región flexible sin estructura secundaria en el extremo amino terminal, seguida por una región en asa de 10-20 aminoácidos involucrada con la unión al receptor, la cual es precedida por 3 hojas  $\beta$ -plegadas y una  $\alpha$ -hélice en el dominio carboxilo terminal [14]. La estructura terciaria es similar entre grupos; la estructura cuaternaria difiere, ya que para la familia CC las interacciones entre los monómeros se dan en el extremo amino terminal,



**Figura 1.1 Quimiocinas humanas descritas, sus receptores y células que los expresan.** En la figura se muestran las quimiocinas humanas descritas, la clasificación en familias, así como su nombre, cromosoma donde se ubican los genes, receptores a los que se une cada ligando y las principales células a las que se unen las diferentes quimiocinas. PMN (polimorfo nucleares), NK (Asesinas naturales), Mo (Monocitos), Ba (Basófilos), iDc (Células dendríticas inmaduras), Tact (Linfocitos T activados), Eo (Eosinófilos), M $\phi$  (Macrófagos), Th1 (T helper 1), Th2 (T helper 2), T skin (Linfocitos T de la piel), T naive (Linfocitos T virgenes), T muc (Linfocitos T de las mucosas) [2].



formando complejos con estructura cilíndrica; en contraste los multímetros de la familia CXC interaccionan en la parte central de la proteína. En la **Fig 1.2** se ejemplifica la estructura de cada familia de quimiocinas [13].

Las quimiocinas tienen carga neta positiva, lo que les permite unirse con glicosaminoglicanos (GAGs) que tienen cargas netas negativas. Los GAGs son moléculas constituidas por secuencias repetidas de sacáridos sulfatados y acetilados, estas moléculas se localizan en la matriz extracelular en forma de proteoglicanos y como moléculas solubles en el plasma [15].

### 1.1.3. Papel de las quimiocinas en la inflamación

La inflamación es un proceso regulado, que se genera en respuesta a un estímulo infeccioso o a un daño al tejido. El proceso inflamatorio, envuelve la activación de células endoteliales y epiteliales; así como el reclutamiento y activación de leucocitos, con la finalidad de erradicar al patógeno en caso de infecciones y/o reparación del tejido dañado [16].

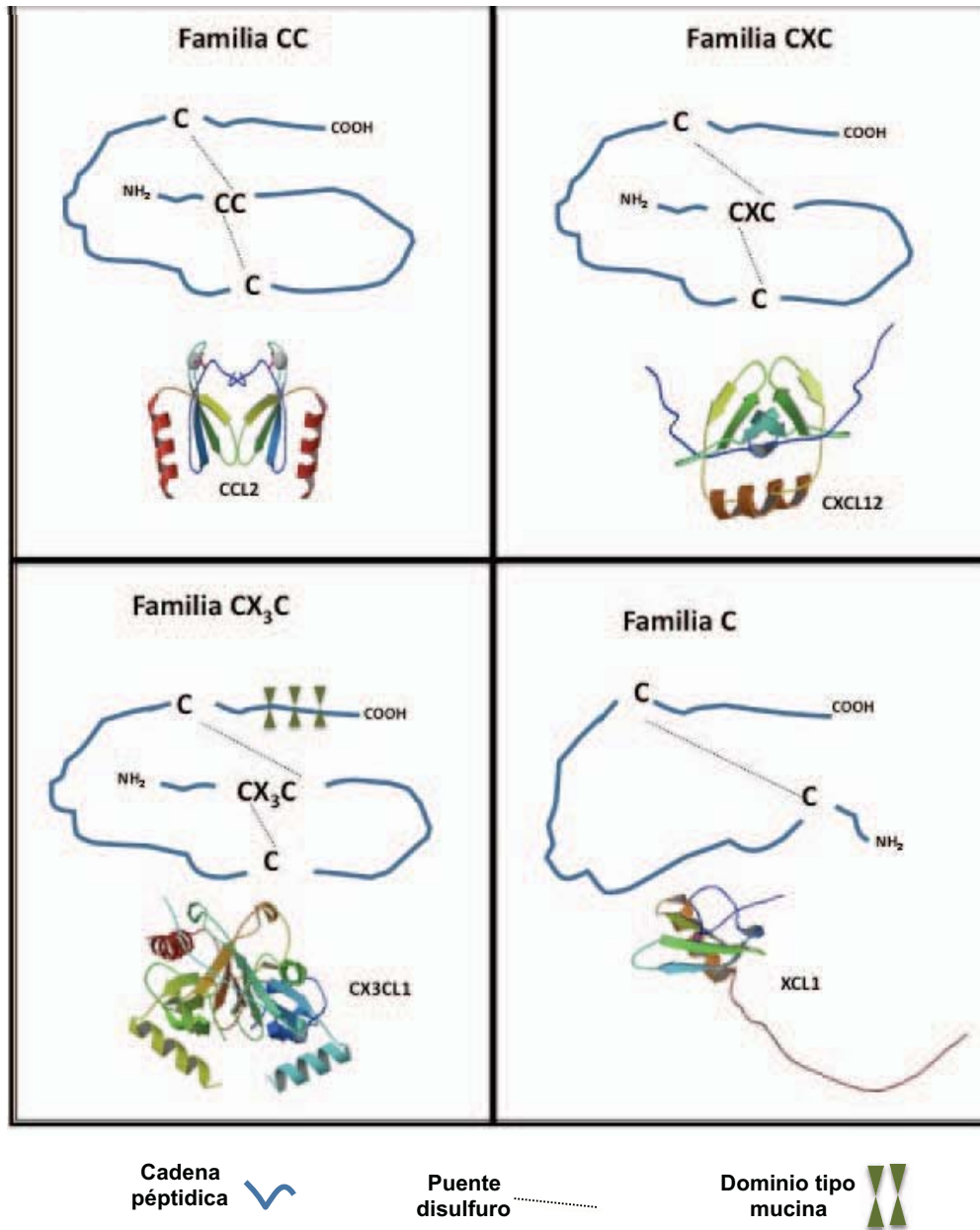
Las primeras células reclutadas en el sitio que sufrió el daño, son los neutrófilos, que se encargan de erradicar y remover células apoptóticas o debrís celulares. Si la inflamación aguda se resuelve exitosamente, el tejido se renueva recuperando la arquitectura normal; sin embargo, si el estímulo no es eliminado, el proceso inflamatorio persiste y la composición del infiltrado inflamatorio cambia a una mezcla de monocitos, macrófagos y linfocitos [17].

Una característica esencial de la inflamación es el rápido reclutamiento de leucocitos del torrente sanguíneo al tejido dañado, este proceso de reclutamiento requiere que las células migren a través de los vasos sanguíneos y entren al tejido (extravasación). La migración de células circulantes a los tejidos, es un proceso regulado por diversas moléculas de adhesión, proteínas de unión, proteasas y quimiocinas. En este proceso, las quimiocinas además de migración inducen la activación de moléculas de adhesión (integrinas) [19].

## 1.2. Receptores de quimiocinas

Los receptores de quimiocina, son receptores de siete dominios transmembranales, miembros de la súper familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), sensibles a la inhibición por toxina pertusis ( $G_{\alpha i}$ ). Están clasificados en 4 subfamilias (CCR, CXCR, XCR y receptores atípicos) [20]. Los genes, se agrupan en regiones del cromosoma 3 humano y se encuentran altamente conservados entre especies. Hasta el momento, se han identificado 18 receptores de quimiocina en humano y ratón. En la **Fig 1.2**, se muestra un resumen de los receptores de quimiocina y sus ligandos [11].

Los receptores de quimiocina, tienen el extremo amino terminal en la porción extracelular seguido por siete dominios transmembranales en configuración de  $\alpha$ -hélice unidos por tres asas intracelulares y tres extracelulares. El dominio carboxilo terminal, posee residuos de serina y treonina localizados en la porción intra-citoplasmática. Las asas extracelulares y el dominio amino terminal determinan la unión por los diferentes ligandos [13].



**Figura 1.2 Familias de quimiocinas.** Clasificación basada en la posición de cisteínas en la estructura primaria y estructura al formar dímeros. En su estructura terciaria las quimiocinas presentan tres estructuras hojas  $\beta$ -plegada hacia el extremo amino terminal y una  $\alpha$ -hélice cerca del dominio carboxilo terminal. Se caracterizan por residuos de cisteína conservados en la estructura primaria. Se dividen en familias de acuerdo a la posición de cisteínas cercanas al dominio amino terminal en: CC ( $\beta$ -quimiocinas), CXC ( $\alpha$ -quimiocinas), C ( $\gamma$ -quimiocinas), CX<sub>3</sub>C ( $\delta$ -quimiocinas), la X indica la presencia de un aminoácido cualquiera entre las dos cisteínas. Figura basada en [13, 2].

### 1.2.1. Mecanismos de activación y transducción de señales

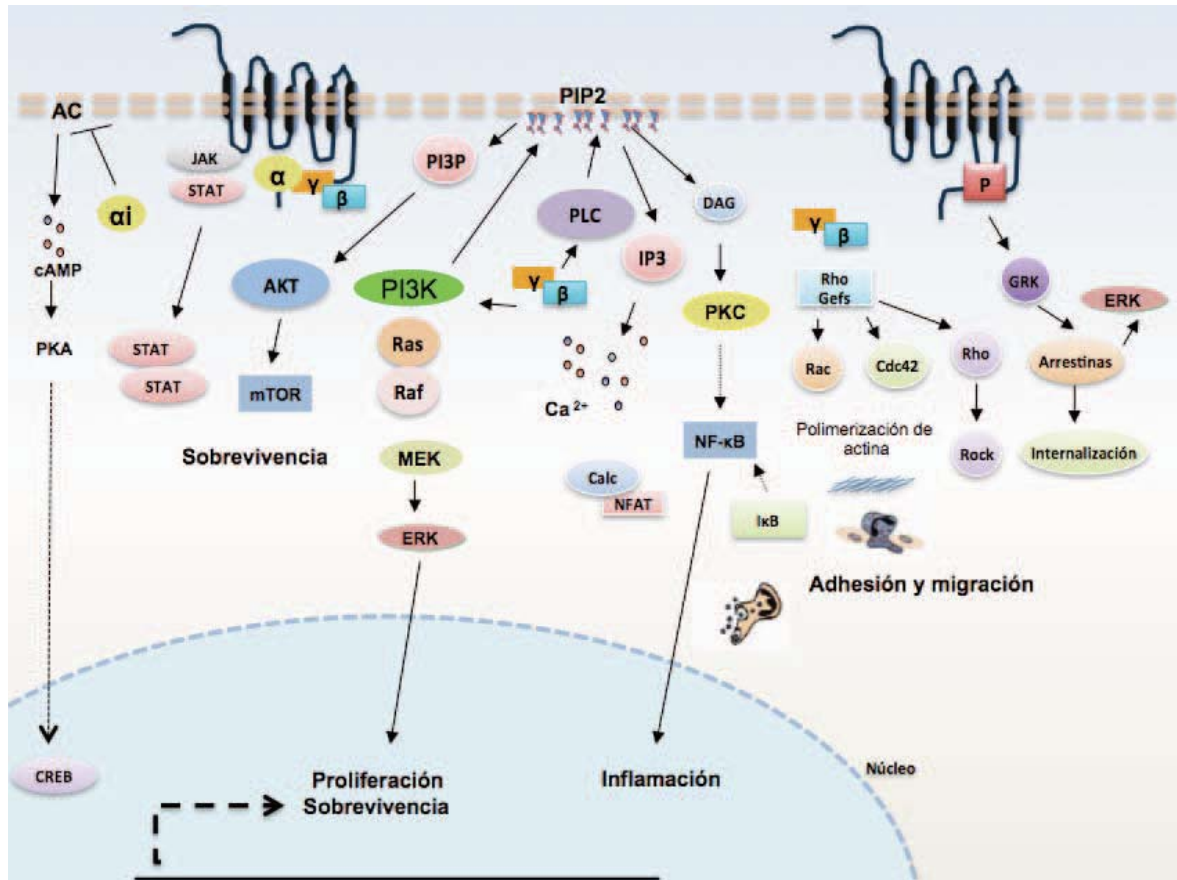
Son varios los dominios necesarios para la activación de los receptores de quimiocina, esto se ha descrito utilizando receptores quiméricos o receptores con mutaciones [11]. Los primeros estudios con los receptores CXCR2 y CXCR1, demostraron que el extremo amino terminal del receptor, determina la especificidad y unión por el ligando CXCL8. Posteriormente en CXCR2 y en otros receptores como CCR1 y CCR3 se demostró, que además del extremo amino terminal, secuencias presentes en los dominios de las asas extracelulares de los receptores son importantes para la activación. Por ejemplo, para el receptor CCR2 se describió que el extremo amino es suficiente para la unión de CCL2; sin embargo, residuos de la primera asa extracelular, son requeridos para la unión de alta afinidad y la señalización del receptor [21]. Con estos estudios se propuso que el mecanismo molecular de la activación de los receptores es un proceso de dos pasos, donde inicialmente la parte amino terminal del receptor reconoce residuos del extremo amino de la quimiocina, este reconocimiento produce cambios conformacionales en el receptor que favorecen la formación de una segunda interfase entre aminoácidos de asas extracelulares del receptor y la sección central de las quimiocinas [11]. Este modelo se ha comprobado experimentalmente con receptores como CXCR4, donde se describió que la primera interacción de CXCL12 con su receptor, induce cambios conformacionales en CXCR4, produciendo la ruptura de un puente salino (Arg188-Glu277), que favorece la exposición del segundo sitio de unión del ligando en los dominios de las asas transmembranales de CXCR4 [22].

Los receptores de quimiocinas, activan múltiples vías de señalización que regulan la maquinaria necesaria para promover la motilidad celular, debido a la polimerización de los filamentos del citoesqueleto de actina [19, 23].

La activación de los receptores de quimiocina, lleva a la disociación de los heterotrímeros de proteínas G (compuestas por las subunidades  $\alpha_i$ ,  $\beta\gamma$ ). El receptor sufre un cambio conformacional que se relaciona con el intercambio de nucleótidos de guanina de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G, la cual esta asociada a GDP (Guanosin difosfato) en estado inactivo, este nucleótido se intercambia por GTP cuando el receptor es activado; este intercambio genera la separación de la subunidad  $\alpha$  de las subunidades  $G\beta\gamma$  [25].

El complejo  $G\beta\gamma$  activa a la fosfolipasa (PLC), la cual hidroliza a fosfolípidos de la membrana como el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en productos como el inositol 1, 4, 5 trisfosfato (IP3) y los diacilglicéridos como el diacilglicerol (DAG). El IP3 regula la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico; mientras que el DAG activa a la serin treonin cinasa (PKC), la cual participa en la activación de factores de transcripción importantes en inflamación como el NF $\kappa$ B [25].

La activación de pequeñas GTPasas de las familias Ras, Rac y Rho, participan en la motilidad celular, a través de la regulación de procesos dependiente de actina, como la formación de pseudópodos y el ensamble de complejos de adhesión focal [11].



**Figura 1.3 Principales vías de señalización activadas por las quimiocinas y sus receptores.** El complejo  $G\beta\gamma$  activa a la fosfolipasa (PLC), la cual hidroliza a fosfolípidos de la membrana como el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en productos como el inositol 1, 4, 5 trisfosfato (IP3) y los diacilglicéridos como el diacilglicerol (DAG). El IP3 regula la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico; mientras que el DAG activa a la serin treonin cinasa (PKC), la cual participa en la activación de factores de transcripción importantes en inflamación como el  $NF\kappa B$ . Modificada de [24].

Por otra parte la cinasa PI3K, activada por la subunidades  $G\beta\gamma$ , genera PIP3 derivado del PIP2 e induce la activación de un amplio rango de cinasas, también el PIP3 formado por PI3K, se une a otras proteínas importantes en señalización como AKT, que es conocida también como PKB y su señalización se relaciona con la sobrevivencia celular [11]. Adicionalmente, PI3K activa a cinasas como: JNK, p38, ERK1/2 conocidas como cinasas activadas por mitogenos (MAPK). En mamíferos existen tres grupos principales de MAPK: extracelular signal-regulated protein kinases (ERK1/2), p38 y Jun NH2-terminal kinases (JNK) [26]. La activación de estas cinasas se da mediante la fosforilación de la secuencia Thr-Xaa-Tyr. Para el caso de ERK1/2 la secuencia corresponde al motivo (Thr-Glu-Tyr), la fosforilación de estos residuos se da por la familia de proteínas conocidas como MAP cinasas cinasas (MKK) [26].

ERK se relaciona con la proliferación celular; sin embargo, en receptores de quimiocina se ha descrito que la activación de ERK deriva de diversas vías de señalización, principalmente de la disociación de las subunidades  $G\beta\gamma$  de las proteínas G, que lleva a la fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas Grb2 y Sos que activan la vía de Ras. Además se ha descrito que Cdc42 y PI3K activan la cinasa de ERK de forma independiente a Ras, adicionalmente Erk se activa por una vía independiente de proteínas G mediada por arrestinas [26, 27].

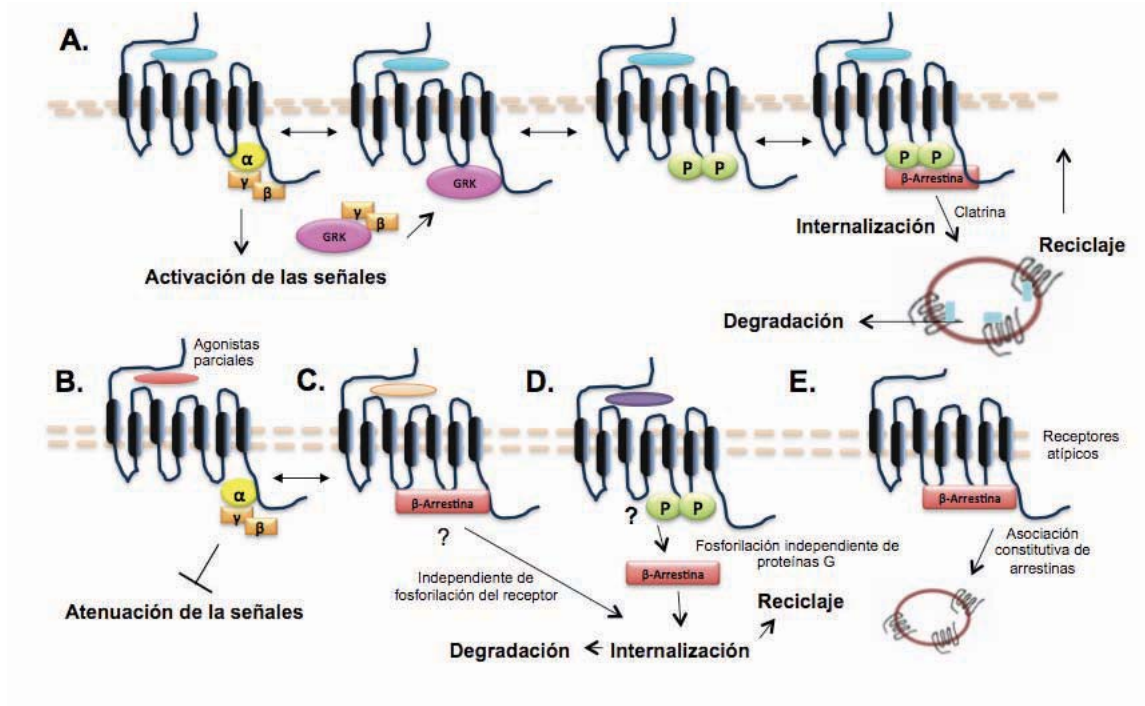
La liberación del  $Ca^{2+}$  intracelular, como segundo mensajero durante la activación de los receptores de quimiocina tiene varias implicaciones biológicas relacionadas con la adhesión celular, la adquisición del fenotipo migratorio y la motilidad. La activación de los receptores de quimiocina lleva a liberación de  $Ca^{2+}$  citoplasmático por dos vías, la primera que responde a la liberación de  $Ca^{2+}$  presente en vesículas del retículo endoplásmico, esta liberación depende de la activación de PLC, ya que los canales presentes en estas vesículas responden al IP3 [11]. La liberación de  $Ca^{2+}$  de estas vesículas esta implicado en la activación de proteínas como la calmodulina y pequeñas GTPasas que llevan junto con otras al cambio de afinidad de las integrinas [11].

### 1.2.2. Mecanismos de regulación de la activación

La habilidad de respuesta de las células a las quimiocinas, puede modularse por diversos mecanismos que modifican la expresión y función de los receptores. La regulación puede ser a nivel de la expresión génetica (largo plazo) o por modulación en la transducción de señales, desensibilizando las respuestas inducidas por el ligando de forma reversible (corto plazo) [32].

La regulación a largo plazo, se relaciona con el control de los niveles de mRNA, su estabilidad o bien la síntesis adecuada o degradación de la proteína; dichos mecanismos pueden modular positiva o negativamente la expresión de los receptores. Cambios significativos en la regulación de la expresión de los receptores de quimiocina, puede relacionarse con el progreso de enfermedades inflamatorias; por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer, la proteína  $\beta$ 4-amiloide al unirse a receptores de glicación avanzada (RAGE), aumenta la expresión del receptor de quimiocina CCR5 en las células endoteliales; lo que produce la infiltración de linfocitos T al cerebro [32].

Los receptores de quimiocina pueden formar multímeros (heterodímeros u homodímeros) por ejemplo CXCR4/CCR5 y CCR2/CCR5, estas asociaciones son dependientes de mecanismos alostéricos dependientes del ligando. La dimerización de los receptores puede llevar a la cooperación de las señales entre receptores (CXCR4/CCR7), impedimento de la unión de los ligandos a uno o ambos receptores y modificación del tránsito intracelular (CCR5/C5ar) [32].



**Figura 1.4 Regulación de la activación de receptores de quimiocina por internalización.** Algunos receptores de quimiocina se internalizan al ser activados por sus algunos de sus ligandos, mediante el reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas mediada por la fosforilación del receptor por las GRKs, seguido de la disociación del heterotrímero de proteínas G (vía clásica) (A), Agonistas parciales pueden transducir señales atenuadas, internalizando a los receptores por la vía clásica con temporalidad diferente a los agonistas (B). Los receptores de quimiocina al ser activados por agonistas parciales, internalizan al receptor sin producir fosforilación del receptor (C). Los receptores pueden ser fosforilados sin la disociación de las proteínas G y reclutar  $\beta$ -arrestinas (D). Los receptores de quimiocina atípicos se asocian constitutivamente a la  $\beta$ -arrestinas (E). Modificada de [32].

### 1.2.3. Internalización de receptores de quimiocina

La activación de receptores de quimiocina puede regularse por la desensibilización, fosforilación e internalización del receptor. La vía principal por la cual los receptores de quimiocina se internalizan es mediada por clatrina. La unión del ligando a su receptor induce la separación del heterotrímero de las proteínas G, donde la subunidad  $\beta\gamma$  activa a las proteínas cinasas de GPCRs (GRKs) que fosforilan residuos de serina y treonina del extremo carboxilo y asas intracelulares del receptor; además se fosforilan otros residuos presentes en motivos



de di-Leucina, lo que resulta importante para el reclutamiento de proteínas adaptadoras, cruciales para la internalización, como la Adaptina 2 (AP-2) y las  $\beta$ -arrestinas [20, 33]. La fosforilación del receptor en los residuos de Serina del extremo carboxilo y los dominios conservados de Asparagina-Arginina-Tirosina, son necesarios para la asociación de la  $\beta$ -arrestina. La asociación de los receptores, con estas moléculas adaptadoras, resulta en el reclutamiento de clatrina, lo que favorece la formación de cúmulos de esta proteína en forma de vesículas que posteriormente se cubren de dinamina separándose de la membrana [34, 35].

Los receptores de quimiocina endocitados, pueden entrar a regiones peri-nucleares, desfosforilarse en compartimientos de reciclaje para ser expresados nuevamente en la membrana celular o ir directamente al compartimento endosomal tardío que lleva a la vía de degradación lisosomal [32].

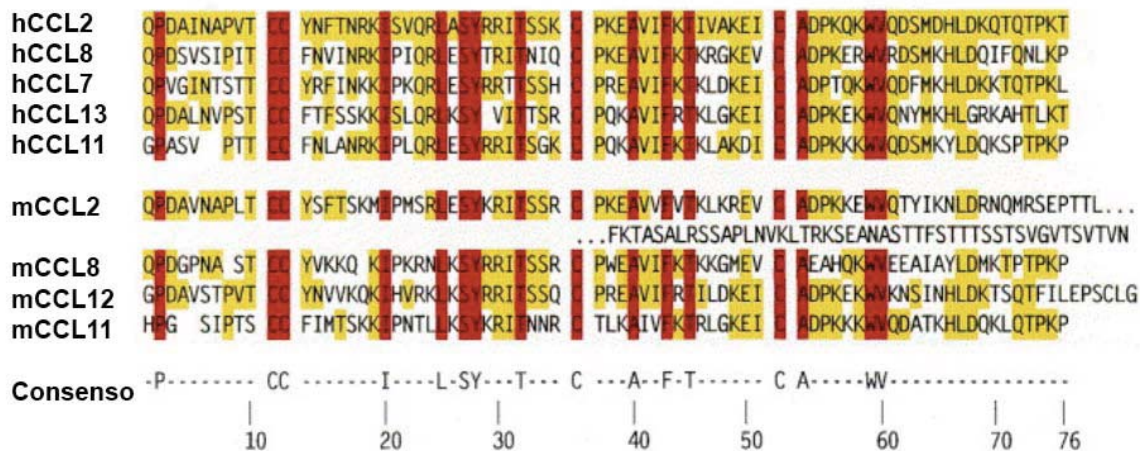
### 1.3. Proteínas quimioatrayentes de macrófagos

Las proteínas quimioatrayentes de macrófagos (MCPs) son miembros de la familia de quimiocinas CC y comparten alrededor del 66 % de homología en secuencia de aminoácidos (**Fig 1.5**). En humanos, se han identificado cuatro miembros CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2) y CCL13 (MCP-4); en ratón se han identificado CCL12 (MCP-5), CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3) y CCL8 (MCP-2) [5]. Adicionalmente, CCL11 (Eotaxina-1) comparte entre el 60 % de identidad en secuencia de aminoácidos con algunos miembros de la subfamilia MCP, todas estas quimiocinas tienen alta homología en los primeros 23 aminoácidos iniciando del extremo amino terminal y residuos de serina y treonina entre el segundo y tercer residuo de cisteína, éstas regiones consenso parecen tener un relevancia en cuanto a la función biológica y la activación de los receptores [10, 5]. Las quimiocinas del subgrupo MCP y eotaxinas son quimioatrayentes de monocitos, células T de memoria, macrófagos, DCs inmaduras, células NK (Asesinas naturales o citotóxicas), eosinófilos, basófilos, células cebadas, neutrófilos, células epiteliales, musculares y diferentes células estructurales en los tejidos[10].

### 1.4. Características de la quimiocina CCL13

La quimiocina CCL13, fue descrita por dos grupos independientes en los 90s y se nombró inicialmente como MCP-4 [36, 37]. CCL13, se une a los receptores CCR1 y CCR2 como las otras MCPs, pero es la única quimiocina de este grupo que se une al receptor CCR3 con alta afinidad, lo que la convierte junto con CCL11 en una de las principales quimiocinas activadoras y quimioatrayentes de eosinófilos [36, 37, 38]. Además de la quimiotaxis, CCL13 induce desgranulación de eosinófilos, basófilos, liberación de histamina de basófilos, secreción de citocinas proinflamatorias por parte del epitelio y endotelio, proliferación en células del músculo liso de vías respiratorias y promueve la expresión de moléculas de adhesión [39, 40, 41, 42].

CCL13 se expresa constitutivamente en varios órganos y es inducible durante procesos inflamatorios como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y asma. Su expresión es regulada por citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-4 o IFN $\gamma$  las cuales favorecen la expresión de CCL13 [36].



**Figura 1.5 Familia de quimiocinas MCPs y eotaxinas. A.** Secuencias de aminoácidos de las quimiocinas humanas y murinas de la familia de las MCPs y los aminoácidos consenso. Las quimiocinas humanas del subgrupo de las MCP comparten homología de entre el 51% y el 66% en la secuencia, mientras que las quimiocinas murinas comparten del 49% al 64%. Modificada de [5].

CCL13 se expresa en diversos tejidos de forma homeostática (intestino delgado, colon, pulmón, corazón, placenta, timo, hígado, músculo, riñón, páncreas, próstata, glandula mamaria y ovarios) [36]. Las fuentes de CCL13 son muy diversas y en algunos subtipos celulares se requiere de una estimulación inflamatoria para la producción de esta quimiocina, por ejemplo en células epiteliales de pulmón A549 (Neumocitos humanos tipo II) y BEAS-2B (Epitelio bronquial humano) el ARN mensajero de CCL13 no se detecta hasta después de la adición de TNF- $\alpha$  y otras citocinas proinflamatorias [43, 42].

La proteína inmadura resultado de la transcripción de CCL13 tiene 98 aminoácidos, después del corte en el péptido señal; tiene 75 aminoácidos, con una glicina en la sección del amino terminal, que se conserva en la familia de MCP (**Fig 1.5**) [48]. Los datos obtenidos de la cristalización de CCL13, muestran que esta quimiocina presenta una estructura similar a otras quimiocinas CC. Comparando el cristal obtenido de CCL13 y otras quimiocinas MCPs como CCL2, se observa diferencia importante sólo en el extremo amino terminal, lo que en secuencia de aminoácidos, parece resultar importante en cuanto a la habilidad de CCL13 para inducir quimiotaxis en eosinófilos; igualmente el cristal de CCL13 sugiere la existencia de dímeros [48].



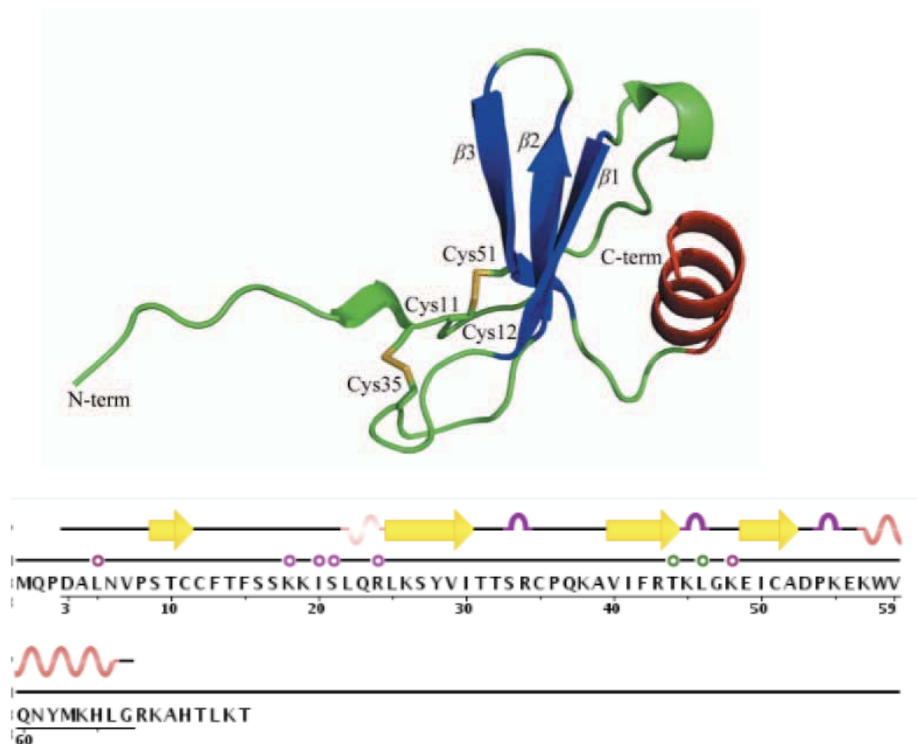


Figura 1.6 Estructura terciaria de la quimiocina CCL13 obtenida del banco de datos de proteínas (PDB) y la estructura secundaria de cada región de la secuencia de aminoácidos de la quimiocina. CCL13, presenta una estructura similar a otras quimiocinas CC con una sección amino terminal sin estructura, tres secciones con estructura de hojas  $\beta$ -plegadas antiparalelas en la parte central y una estructura de  $\alpha$ -hélice en la sección carboxilo terminal basada en [48].

## 1.5. Inflamación alérgica pulmonar

El asma, es un síndrome caracterizado por la obstrucción reversible de las vías respiratorias relacionado con la infiltración de leucocitos que liberan mediadores inflamatorios en respuesta a algún estímulo alérgico [50]. El proceso inflamatorio crónico en el asma produce remodelación constante del tejido, favoreciendo la proliferación excesiva del músculo liso, hipertrofia del epitelio y células mucoproducidas; en conjunto estos factores se asocian con el fenómeno de la hiperreactividad bronquial [3]. El daño constante producido por la inflamación provoca susceptibilidad ante estímulos ambientales como el polvo, frío, contaminantes, infecciones virales y bacterianas. En las crisis o episodios asmáticos se presenta estrechamiento en el diámetro de las vías aéreas, edema e inflamación eosinofílica, producción de moco, sibilancias, tos y dificultad para respirar [3].

El asma y otras enfermedades alérgicas han incrementado su prevalencia, fenómeno que se atribuye a diversos factores ambientales y genéticos como alelos específicos del MHC, polimorfismos en genes que codifican citocinas (IL-4, IL-33, IL-13), PRRs (TLR4), factores de transcripción (STAT6) entre otros [50].

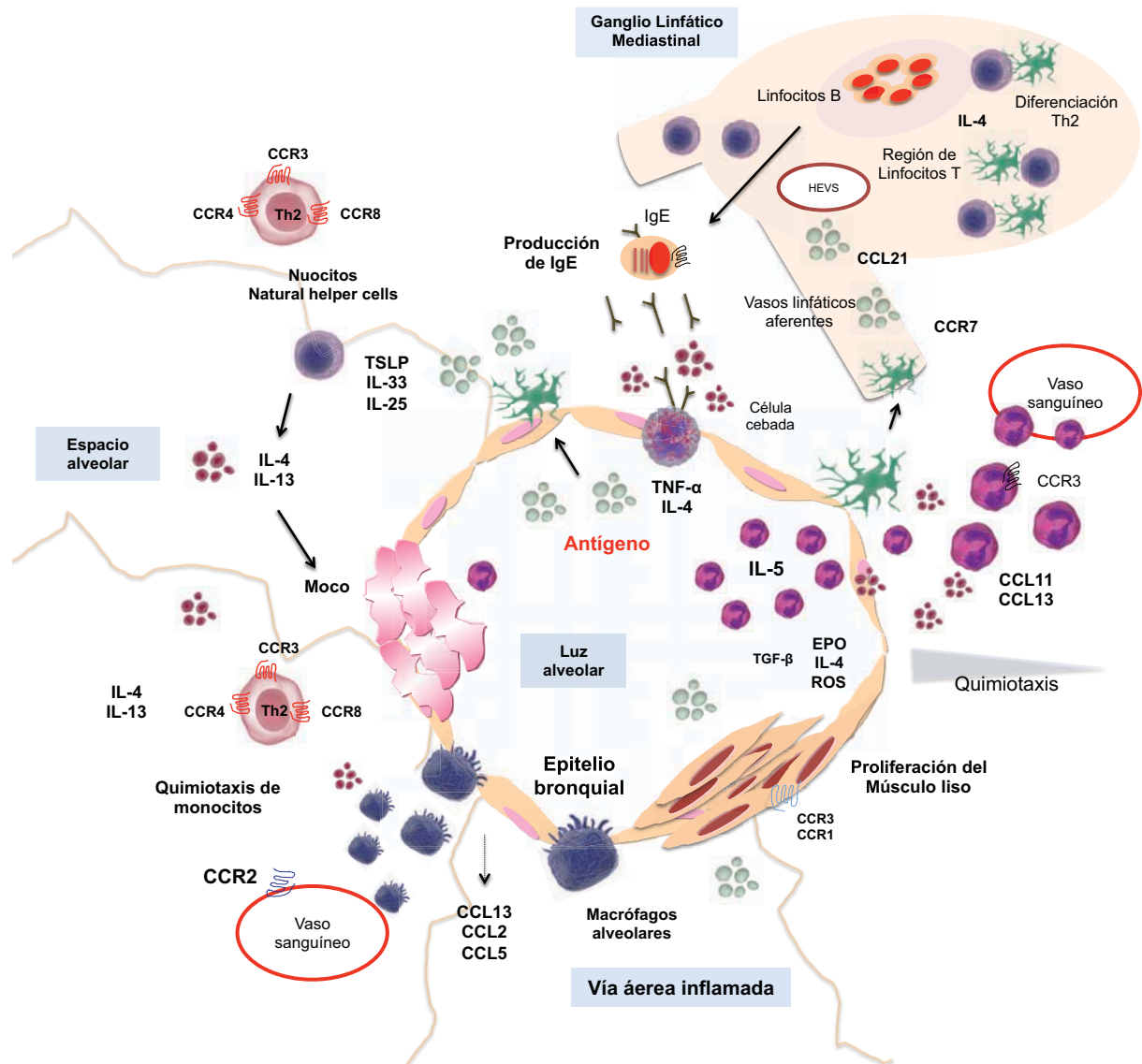
La sensibilización producida por los alérgenos activa receptores como TLR4 y la respuesta inmune innata generada, favorece la aparición de clonas específicas de linfocitos T con fenotipo  $T_H2$ , los cuales se caracterizan por la expresión de la transcripción GATA3, receptores como CCR3, CCR4, secreción de las citocinas que se agrupan en el cromosoma 5q31-33 (IL-4, IL-13, IL-3, IL-9, IL-5 y GM-CSF) las cuales favorecen la sobrevivencia y activación de eosinófilos, basófilos, célula cebadas y cambio de isotipo de inmunoglobulina en los linfocitos B al tipo IgE. Este proceso se ejemplifica en la **Fig 1.7** [51].

La IgE se une a los receptores  $Fc\epsilon RI$  expresados principalmente en células cebadas, basófilos y eosinófilos. Este receptor de alta afinidad se encuentra estrechamente relacionado con la respuesta de hipersensibilidad y el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria en el asma [52, 53].

La IL-4 favorece la generación de IgE y es importante durante las etapas de sensibilización junto con la IL-13, relacionada con la remodelación del tejido, producción de moco e hiperreactividad bronquial. La IL-13 es una citocina secretada principalmente por linfocitos con fenotipo  $T_H2$  [56]. La producción de IL-13 en las vías respiratorias, promueve la sobrevivencia y migración de eosinófilos, activación de macrófagos, incremento en la permeabilidad vascular, producción de moco, transformación en los fibroblastos, proliferación del epitelio y favorece la hiperreactividad bronquial. En pacientes asmáticos esta citocina se encuentra elevada en el fluido y células del LBA, además existen múltiples polimorfismos de IL-13 y sus receptores que se asocian con susceptibilidad al desarrollo del asma y niveles elevados de IgE [57].

Otra citocina importante en el asma es el  $TNF-\alpha$ , que se produce inicialmente como una proteína unida a la membrana de 26 kDa que es proteolisada por la enzima convertidora ADAM17 lo que produce un producto de 17 kDa; tanto la proteína unida a membrana como la soluble forman trímeros que interactúan con los receptores de la familia del TNF (TNF-Rs) TNF-RI (CD120a), (p60 en humano y p55 en ratón) y TNF-RII (CD120b) (ratón p65 y humano p80). Aunque los receptores son co-expresados en varios tipos celulares, el receptor TNF-RI se encuentra más relacionado con respuestas proinflamatorias, mientras que el TNF-RII se vincula con proliferación en linfocitos [58].

La liberación de  $TNF-\alpha$  en inflamación alérgica, contribuye al reclutamiento de leucocitos, favoreciendo la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E-Selectina y P-Selectina en células endoteliales. Aunado a esto, los ratones deficientes en los receptores p55/p75 presentan menor eosinofilia [59]. Adicionalmente se ha descrito que el  $TNF-\alpha$  está implicado en la proliferación y activación de fibroblastos de las capas subepiteliales, mediante la regulación de receptores como EGFR, entre otros, contribuyendo al desarrollo de fibrosis y remodelación, así como la secreción de moco por células caliciformes [60].



**Figura 1.7 Principales eventos inflamatorios durante el proceso asmático.** La aparición de IgE, se debe al desarrollo de la respuesta inmune que inicia con la captura del antígeno por las células presentadoras de antígeno; principalmente DCs, las cuales se activan en respuesta al ambiente inicial de IL-4 e IL-13 producidas por células innatas; las DCs migran a los ganglios linfáticos guiadas por el receptor CCR7, donde presentan el antígeno procesado bajo el contexto de moléculas principales de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), que en conjunto con moléculas co estimuladoras, inducen vía el TCR en linfocitos T activación, proliferación y adquisición de un fenotipo  $T_H2$ . La interacción de linfocitos B con un linfocito  $T_H2$ , productor de IL-4 e IL-13 induce en los linfocitos B cambio de clase de inmunoglobulina. La inflamación alérgica, se caracteriza por una fase temprana en la cual se da la activación de célula cebadas residentes sensibilizados por IgE, liberación de mediadores químicos que provocan la contracción del músculo liso bronquial y una fase tardía caracterizada por un infiltrado inflamatorio de monocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos T principalmente de tipo  $T_H2$ . Modificada de [54, 53, 55].

### 1.5.1. Principales linajes celulares involucrados en asma

#### Eosinófilos

Los eosinófilos fueron descritos por primera vez en 1879 por Paul Ehrlich como células con alta afinidad por colorantes acidofílicos como la eosina. Estas células derivan de progenitores  $CD34^+$  e  $IL5R^+$  y están asociados a la defensa contra parásitos y helmintos [61]. Se caracterizan por tener gránulos citoplasmáticos que almacenan diversas proteínas catiónicas, como EPO (*peroxidasa de eosinófilos*), MBP (*proteína básica principal*), ECP (*proteína catiónica eosinofílica*), también contienen factores de crecimiento, enzimas y citocinas (IL-2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 13,  $IFN\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , CCL5, CCL11) [62].

La diferenciación de los eosinófilos depende de las citocinas IL-5, IL-3, GM-CSF y la expresión de factores de transcripción como PU1 y GATA-1. Los eosinófilos maduros, salen de médula ósea y migran a diversos tejidos, en procesos de alergia, los progenitores de estas células aumentan en número y dejan la médula ósea para migrar a las vías respiratorias en el caso del asma [61].

Los eosinófilos expresan moléculas de adhesión como VLA-4 ligando de VCAM-4 y de la P-selectina ligando de PSGL-1, la expresión de estas moléculas de adhesión incrementa por la estimulación dada por quimiocinas como CCL11; una vez en el tejido los eosinófilos pueden liberar el contenido de sus gránulos del espacio citoplásmico, mediante un proceso conocido como desgranulación; que puede ser citolítica, cuando las células vacían el contenido total de los gránulos o por desgranulación parcial, cuando el eosinófilo libera parte del contenido de sus gránulos manteniendo la viabilidad; este fenómeno se observa en respuesta a la estimulación con citocinas como  $IFN\gamma$  y quimiocinas como CCL11 [62].

Otros marcadores importantes en los eosinófilos, además del receptor de  $IL-5\alpha$  son proteínas de tipo inmunoglobulina que se unen al ácido sialico denominadas Siglec, para los eosinófilos humanos Siglec-8 puede ser utilizado como un marcador específico y SiglecF para eosinófilos murinos [62].

#### Células cebadas

Las células cebadas son células derivadas de progenitores hematopoyéticos de médula ósea que presentan marcadores de superficie como  $CD13^+$ ,  $CD34^+$ ,  $CD117^+$ . Estas células se localizan en el tejido conectivo alrededor de los vasos sanguíneos y linfáticos cerca de sitios de contacto con antígenos provenientes del exterior. En pacientes asmáticos el número de células cebadas en la mucosa pulmonar, se encuentra aumentado comparado con el número en pacientes sanos [63].

La desgranulación de las células cebadas en la lámina propia de las vías respiratorias produce los signos y síntomas clásicos de la inflamación alérgica [7]. La desgranulación ocurre por dos mecanismos, el primero relacionado con la unión de IgE al receptor (Fc RI), las moléculas de IgE se entrecruzan al unirse al alérgeno induciendo la secreción de mediadores inflamatorios de los gránulos y la transcripción de genes de citocinas y otros mediadores inductores de la

respuesta alérgica; el segundo mecanismo de desgranulación de las células cebadas es causado por neuropéptidos, compuestos básicos, factores de la cascada del complemento, entre otros [64].

Las células cebadas liberan compuestos con actividad vasodilatadora y espasmogénica como la histamina, prostaglandinas y leucotrienos. También poseen proteasas como la triptasa, quimasa y carboxipeptidasa A relacionadas con la remodelación del tejido [65]. Otros mediadores inflamatorios secretados son las citocinas (IL-1, -3, -4, -5, -6, -8, -10, -13, -16, TNF- $\alpha$ , y TGF $\beta$ ), que contribuyen a fases más tardías de la inflamación promoviendo la infiltración de otros tipos celulares [64].

## Monocitos y macrófagos

Los macrófagos son células importantes en la respuesta inmune en pulmón, ya que contribuyen con el establecimiento de la tolerancia, reconocimiento de antígenos, fagocitosis, eliminación de patógenos y presentación antigénica [66].

Los macrófagos pulmonares derivan de monocitos periféricos, pueden distinguirse dos poblaciones en las vías respiratorias bajas, los macrófagos alveolares y los macrófagos intersticiales. Como otras poblaciones de macrófagos estas células se caracterizan por la expresión de las moléculas F4/80 y CD68, además de expresar moléculas como CD11c y DEC-205 que también se encuentran en DCs [67].

Para su estudio se han dividido en M1 o activados por la vía clásica y M2 o alternativamente activados. Los macrófagos M1 son inducidos por citocinas como IFN $\gamma$  y estímulos como LPS, esta población de macrófagos se caracteriza por secretar IL-12, IL-6 y TNF- $\alpha$  y quimiocinas como CXCL9, CXCL10 y CCL3 en contraste los macrófagos M2 son inducidos por IL-4 e IL-13 y producen quimiocinas como CCL17, CCL22 y CCL24 y expresan marcadores como Arginasa I y Retnl $\alpha$  [67].

Durante el proceso asmático los macrófagos M2 aumentan en número considerablemente en muestras de pacientes asmáticos comparadas con las obtenidas de sujetos sanos. En modelos animales se ha descrito que la transferencia de macrófagos M2 durante las primeras horas posteriores al reto con el alérgeno, induce exacerbación de la inflamación y aumento en la eosinofilia y remodelación del tejido [68].

## Linfocitos T

La participación de linfocitos T efectores en el asma es muy clara, principalmente los linfocitos T con un fenotipo T<sub>H</sub>2, caracterizados por la expresión del factor de transcripción GATA3 [69]. El asma se ha descrito como una enfermedad con una predominante respuesta T<sub>H</sub>2, ya que el contacto con el alérgeno induce la acumulación de linfocitos con este fenotipo dentro de las vías respiratorias, así como un incremento en las citocinas producidas por estas células (IL-4, IL-13 e IL-5), que favorecen la inflamación alérgica [50, 51].

La participación de los linfocitos  $T_H1$  no resulta clara, ya que diversos trabajos muestran que las citocinas  $T_H2$  tienen efectos inhibitorios sobre el fenotipo  $T_H1$  y durante exacerbaciones asmáticas se presenta un incremento de células  $T_H1$  en pulmón. En modelos animales se observó que ratones deficientes en el factor de transcripción Tbet presentan hiperreactividad exacerbada, por lo que se propone que el flujo de células  $T_H1$  al pulmón regula la inflamación  $T_H2$ ; sin embargo, la administración de citocinas como  $IFN-\gamma$  en pacientes asmáticos no produce mejoras [50].

Por otra parte, las células T reguladoras ( $T_{Reg}$ ) caracterizadas por la expresión de los marcadores  $CD4^+/CD25^+$  y el factor de transcripción  $FOXP3^+$ . Existen subgrupos de ( $T_{Reg}$ ), algunas son de origen natural ( $T_{nReg}$ ) o las  $T_{Reg}$  y las inducidas en periferia. Las células reguladoras inducidas, resultan cruciales para el proceso asmático, ya que éstas mediante la secreción de citocinas como IL-10 y  $TGF\beta$  y expresión de moléculas como CD80, CD86 y CTLA4 regulan la inflamación y reducen la hiperreactividad bronquial [51]. Otros linajes de linfocitos T efectoros también se relacionan con la inflamación en el asma, por ejemplo los linfocitos  $T_H17$  que expresan diferencialmente el factor de transcripción  $ROR\gamma_t$ , los pacientes asmáticos presentan un incremento en la IL-17A en pulmón lo que se correlaciona con la severidad, esto particularmente en pacientes asmáticos con resistencia a esteroides y neutrofilia [70, 71].

## 1.6. Receptores de CCL13 implicados en el asma

### 1.6.1. CCR1

Este receptor de quimiocinas fue el primer receptor CC identificado, posee 351 aminoácidos. Es expresado por diversos tipos celulares cruciales en asma: las células cebadas, eosinófilos, basófilos, epitelio, células musculares, células NK y monocitos [1]. Diversas quimiocinas se unen a CCR1 (CCL3, CCL5 y CCL13); las cuales se elevan en LBA y tejido de pacientes asmáticos [4].

El receptor CCR1 se expresa en células musculares lisas de las vías respiratorias, donde estímulos con citocinas como  $TNF-\alpha$  e  $IFN\gamma$  aumentan su expresión, mientras que otras como IL-4 e IL-13 no modifican los niveles de expresión del receptor [72]. La delección del receptor por ingeniería genética, reduce significativamente el proceso de remodelación, mientras que en un modelo de fibrosis pulmonar la administración de un anticuerpo bloqueante de CCR1 disminuye significativamente el proceso fibrótico [73].

CCR1 como CCR3, es un receptor de quimiocina expresado en eosinófilos, macrófagos y DCs; su expresión se eleva en pacientes asmáticos y que además se expresa en células musculares lisas. En los modelos murinos de asma donde este receptor se neutraliza o se elimina por ingeniería genética, se observa remodelación reducida y fibrosis pulmonar [74, 75]. CCR1 se co-localiza con el  $Fc\epsilon RI$  en la membrana citoplásmica de las células cebadas, cuando estos dos receptores son co-estimulados, estas células incrementan la desgranulación y disminuye la quimiotaxis inducida por CCL2 [76].

### 1.6.2. CCR2

El receptor CCR2 une a los cinco miembros del grupo de las MCPs (CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 y CCL13), siendo CCL2 el ligando con mayor afinidad, tiene 374 aminoácidos [41]. CCR2 es expresado en monocitos, linfocitos  $T_H1$ , basófilos, DCs inmaduras y células cebadas. En el caso de las reacciones alérgicas, se sabe que CCL2, CCL7 y CCL13 favorecen la desgranulación en basófilos. Además el ratón deficiente en CCL2 presenta niveles bajos de producción de IL-4 e IL-5, disminución en el cambio de isotipo de inmunoglobulina y una respuesta tipo  $T_H2$  reducida; sin embargo el ratón deficiente en CCR2 presenta una respuesta  $T_H2$  exacerbada [77, 78].

En modelos de asma en primates, la administración de anticuerpos neutralizantes del receptor CCR2, antes de la sensibilización con el alérgeno; reduce significativamente la hiperreactividad bronquial y el número de células en LBA [79].

### 1.6.3. CCR3

CCR3 es el principal receptor de quimiocina asociado al proceso de inflamación alérgica, debido a su importante expresión en eosinófilos y células  $T_H2$  [69, 80]. Este receptor une a más de 10 quimiocinas entre las que destacan CCL24, CCL26 y CCL11, así como CCL13 [81, 82, 83].

La acumulación de eosinófilos alrededor de las vías respiratorias, es una característica importante del asma. Esta acumulación, está vinculada con CCR3 ya que el ratón deficiente de este receptor, presenta deficiencia en la acumulación de eosinófilos e inflamación; sin embargo este ratón presenta un aumento en la hiperreactividad bronquial con respecto a los ratones silvestres sometidos a un modelo de asma inducido con OVA [75].

En suero de pacientes asmáticos, los ligandos de CCR3 aumentan, lo que indica la participación del receptor en la movilización de eosinófilos, además su activación produce desgranulación, aumento de moléculas de adhesión como CD11b y sobrevivencia de eosinófilos [40].

Los ligandos de CCR3 inducen proliferación de células epiteliales y músculo liso, además de dar protección contra la apoptosis, vía la activación de MAP cinasas[84].

## 1.7. CCL13 en el proceso asmático y enfermedades alérgicas

Diversos hallazgos demuestran que los ligandos de CCR3 incluyendo CCL13 se elevan en pacientes asmáticos, esto se ha observado en muestras de LBA y biopsias de pulmón mediante la determinación de proteína, ARN mensajero y en suero mediante ELISA [89, 90].

Pacientes con asma crónica estable presenta niveles elevados en suero de CCL13, adicionalmente el aumento en la expresión de CCL13 en LBA se relaciona con el número de macrófagos en pacientes asmáticos con infecciones virales asociadas, basados en estos hallazgos algunos



autores proponen a CCL13 como un biomarcador de exacerbaciones asmáticas [89, 91]. Los hallazgos en biopsias muestran que CCL13 se ubica en el epitelio y la submucosa, en contraste con otras quimiocinas como CCL7 y CCL3 que se secretan mas abundantemente por macrófagos [36, 10].

Citocinas como IL-4 regulan la expresión de quimiocinas como CCL11 y CCL13 en células mononucleares de sangre periférica, en contraste con las células epiteliales donde la secreción de éstas quimiocinas no se ve modificada después del estímulo con IL-4 [43]. Esta regulación en los diferentes compartimientos, favorece la acumulación de eosinófilos en sangre periférica, mientras que otros quimioatrayentes como CCL13 contribuyen con el reclutamiento de eosinófilos alrededor de las vías aéreas y el aumento en la expresión de moléculas de adhesión como CD11b [43, 40].

CCL13 induce trans migración endotelial de eosinófilos *in vitro* en ensayos donde se utilizaron células HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical), esta hallazgos se asocian con la cinética de infiltración de eosinófilos y otras células inflamatorias *in vivo* donde se reporta que los eosinófilos presentan un máximo de acumulación a las 6 horas después de la exposición con el alérgeno, lo que correlaciona con el máximo de expresión de ARN y proteína de CCL11, mientras que CCL13 tiene un máximo de expresión alrededor de las 24 horas posteriores al contacto con el alérgeno, lo que sugiere que esta quimiocina a diferencia de CCL11 esta relacionada con el mantenimiento de la eosinofilia [44, 92].

## 1.8. Tratamientos farmacológicos usados en el asma

El asma, se trata principalmente con dos tipos de fármacos: a) Fármacos que controlan la enfermedad a largo plazo, que reducen la inflamación de las vías respiratorias y b) otros que controlan los síntomas agudos [3].

Entre los fármacos de largo plazo, destacan los corticoesteroides inhalados, los cuales representan la primera línea de tratamiento según la iniciativa global contra el asma (GINA) ya que reducen la intensidad y frecuencia de los síntomas debido al control de la inflamación, mediante la inhibición de la transcripción de diversos genes de moléculas proinflamatorias [3]. En las muestras de biopsias de la vía aérea de pacientes con asma, que han tenido un tratamiento prolongado con corticosteroides inhalados se disminuyen los eosinófilos, linfocitos T y DCs en la mucosa y submucosa, hiperplasia de las células caliciformes y la hiperreactividad bronquial. Sin embargo, no todos los pacientes se benefician por igual con los corticosteroides inhalados [50]. Por ejemplo, la inflamación donde predominan neutrófilos responde menos al tratamiento que la inflamación eosinofílica.

Los corticoesteroides inhalados producen efectos secundarios en dosis elevadas, aumentan los riesgos de pigmentación de la piel, cataratas, hipertensión intraocular y pérdida acelerada de la masa ósea. En los niños se puede producir retardo del crecimiento [3].



Los fármacos de uso continuo para aliviar síntomas agudos son los agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos, que relajan el músculo liso, permitiendo el paso de aire; otro ejemplo claro de este tipo de fármacos son los antagonistas de los receptores del cisteinil leucotrienos, (montelukast, zafirlukast y pranlukast), los cuales bloquean la acción de los leucotrienos C4, D4 y E4 en el receptor de cisteinil leucotrieno tipo 1. El zileuton inhibe la producción de cisteinil leucotrieno (y del leucotrieno B4, con gran afinidad por los neutrófilos) antagonizando la acción de la enzima 5-lipoxigenasa [3].

Otro ejemplo de tratamiento para los pacientes con asma persistente moderada a grave resistentes a los corticoesteroides y a los antagonistas de leucotrienos, es el omalizumab, que es un anticuerpo monoclonal anti IgE que se une a la porción de IgE que reconoce su receptor de alta afinidad ( $Fc\epsilon RI$ ) [64].

## 1.9. Estrategias de bloqueo contra los receptores de quimiocina

La reducción del reclutamiento de células en procesos inflamatorios crónicos, representa una estrategia farmacológica que tiene como finalidad reducir el daño al tejido causado por la inflamación; diversas moléculas están involucradas en el proceso de migración celular (moléculas de adhesión, leucotrienos, citocinas, componentes del complemento); sin embargo, las quimiocinas junto con sus receptores representan un grupo de moléculas con un gran potencial para ser antagonizadas [2].

Los patógenos secretan proteasas que degradan quimiocinas a fragmentos antagonista y de forma endógena existen mecanismos de regulación de la función de las quimiocinas dadas por proteasas como las MMPs y CD26 [93, 94, 95].

La actividad de una quimiocina puede inhibirse bloqueando la unión a su receptor o mediante la inhibición de segundos mensajeros o proteínas como  $PI3K\gamma$ ; sin embargo, la falta de selectividad de este tipo de compuestos resulta un problema. La inhibición de las funciones de quimiocinas puede desarrollarse mediante diversas estrategias farmacológicas, por ejemplo anticuerpos, moléculas orgánicas, quimiocinas modificadas y péptidos derivados de quimiocinas [2].

### Anticuerpos

En el caso de las quimiocinas, el anticuerpo ABX-IL8 (Abgenix) que se une a CXCL8, se utilizó para inhibir el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al pulmón de pacientes con enfermedad obstructiva crónica (COPD), la administración del anticuerpo mejoró la función pulmonar; sin embargo, su producción se detuvo por la aparición de efectos adversos no reportados. Otro ejemplo es el anticuerpo anti CCR2 (MLN1202, Millennium) para tratar la artritis reumatoide y aterosclerosis [2, 96].

<i>Receptor</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Compañía</i>	<i>Enfermedad</i>
CCR5	Maraviroc	Pfizer	Aprobado para uso en VIH
CCR9	CCX282	ChemoCentryx	Enfermedad de Crohn
CCR2	MK0812	MERK	Esclerosis múltiple
CCR4	Anticuerpo	Amgen/Kyowa	Psoriasis
CCR3	Bimosiamose	Varios	Asma
CCR2	Anticuerpo (MLN002)	Millenium (Fase 2)	Arteriosclerosis
CXCR4	AMD3100	Genzyme	Aprobado para movilizar progenitores de médula ósea

Tabla 1.1 Ejemplos de fármacos en fase clínica y aprobados por la FDA que actúan sobre receptores de quimiocina [96]

### Moléculas orgánicas pequeñas

La creación de moléculas capaces de bloquear receptores acoplados a proteínas G es un campo muy estudiado. Diversos compuestos se han patentado; sin embargo, no son efectivos cuando son administrados en modelos animales o durante las fases clínicas en pacientes [97].

Por otra parte, aunque las quimiocinas representan un buen blanco para generar compuestos antagonistas la llamada promiscuidad de la familia podría ser un obstáculo en la creación de antagonistas. Actualmente se sabe que cada ligando puede tener funciones diferenciales de acuerdo al receptor y el contexto celular, tal es el caso de CCL19 y CCL21 en CCR7 o CCL5 en CCR1, CCR3 y CCR5 donde se ha observado un patrón específico de internalización y reciclaje del receptor con los diferentes ligandos [97].

Los ejemplos claros de éxito, son moléculas creadas contra los receptores CCR5 (Maraviroc) que reduce la infección de algunas cepas de HIV y CXCR4 para (ADM3100), utilizado para la movilización de células progenitoras CD34<sup>+</sup> de médula ósea a circulación sanguínea [2]. Algunas moléculas se mencionan en la **Tabla 1.1**.

### Quimiocinas modificadas y péptidos derivados de quimiocinas

Se han hecho diversas modificaciones a las secuencias de las quimiocinas para producir análogos con actividad de antagonistas, por ejemplo la adición de grupos orgánicos en el extremo amino terminal como con CCL5 (Met-RANTES y APO-RANTES), estas quimiocinas modificadas presentan actividad antiinflamatoria *in vivo* compitiendo con los ligandos de CCR5; estas quimiocinas modificadas, bloquean la infección de algunas cepas HIV induciendo la internalización del receptor, llevándolo a degradación a diferencia del reciclaje a superficie que induce la quimiocina [98].

La mayoría de las modificaciones se han realizado en el extremo amino de las quimiocinas, por ejemplo en la quimiocina CXCL8 los residuos que siguen de la primera cisteína

<i>Quimiocina</i>	<i>Modificación</i>	<i>Efecto</i>	<i>Usos</i>
met-RANTES	Adición de una metionina	Agonista parcial de CCR5, CCR1 y CCR3	Infección VIH, reducción de inflamación en modelos de asma y EAE [100]
AOP-RANTES	Grupo amino oxipentano	Agonista parcial de: CCR5, CCR1 y CCR3	Infección de VIH [101, 102]
44-AANA-47-RANTES	Sustitución por alaninas en el dominio de unión a GAGs	Inhibición <i>in vivo</i> de la inflamación	Infección VIH, arterosclerosis, EAE, peritonitis [103]
NNY-CCL14	Grupo n-nonanoyl	Agonista parcial CCR1, CCR2 y CCR3	Asma [104, 105]
Mutantes IL8	Mutación en la secuencia ELR	Actividad variable en CXCR2	Neutrofilia disminuida [99]
7ND-CCL2	Eliminación de los primeros 8 aa	Antagonista de CCR2	Reducción de la inflamación [106, 107]

Tabla 1.2 **Ejemplos de quimiocinas modificadas con actividad antagonista en inflamación.** En la tabla se resumen algunos ejemplos de quimiocinas modificadas principalmente en el extremo amino terminal, estos péptidos antagonista y agonistas parcial y se han probado en diversos modelos de inflamación. EAE (Encefalomiелitis autoinmune).

resultan importantes para la quimiotaxis de neutrófilos [99]. Algunos ejemplos de quimiocinas modificadas con efectos antiinflamatorios se mencionan en la **Tabla 1.2**.

## 1.10. Péptidos derivados de CCL13

Aunque CCL13 es una quimiocina poco estudiada, se han descrito algunos péptidos derivados de su proteólisis, los cuales son antagonista en quimiotaxis y péptidos sintéticos derivados de la secuencia de CCL13 con actividad antimicrobiana y anti-inflamatoria en modelos *in vivo*. Esta información se resume en la **Tabla 1.3**.

Los patógenos secretan proteasas, por ejemplo EhCP2 (Cistein proteasa-2), derivada de *Entamoeba histolytica*, la cual corta quimiocinas como CCL2, CCL13 y CXCL8; dando como resultado péptidos que reducen la quimiotaxis de monocitos humanos inducida por quimiocinas [108]. También se ha descrito, que proteasas como la cruzipaina derivada de *Trypanosoma cruzi* proteolisa quimiocinas como CCL12, CCL13 y no CCL2, para el caso de CCL13 se producen péptidos como *cruzipain-derived chemokine peptide-1* (CDCP-1), (24-LKSYVKITTSRCPQK-38). La modulación de la actividad de las quimiocinas *in vivo* le permite al parásito regular la inflamación para establecer nichos en tejidos específicos [109].

CCL13 presenta actividad antimicrobiana principalmente sobre cepas de bacterias Gram negativas; péptidos sintéticos como CDAP-4 (Chemokine derived antimicrobial peptide-4), (57-KWVQNYMKHLGRKAHTLKT-75) derivado del extremo carboxilo de la quimiocina CCL13, presenta actividad antimicrobiana sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosas* resistentes a antibióticos [111].

<i>Nombre</i>	<i>Origen</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Actividad</i>
CDCP-1	Proteólisis de CCL13 por cruzipaina	<i>24-LKSYVITTSRCPQK-38</i>	Reducción de la quimiotaxis [109]
*NI	Proteólisis por EhCP2	ND	Reducción de la quimiotaxis [108]
CDIP-2	Sintético	<i>19-KISLQRLKSYVITTSRCPQ-37</i>	Reducción de la inflamación <i>in vivo</i> [110]
CDAP-4	Sintético	<i>57-KWVVQNYMKHLGRKAHTLKT-75</i>	Antimicrobiano [111]
Sin nombre	Proteólisis por MMP-12	4-75,5-75,8-75	Antagonistas de CCR2 [95]

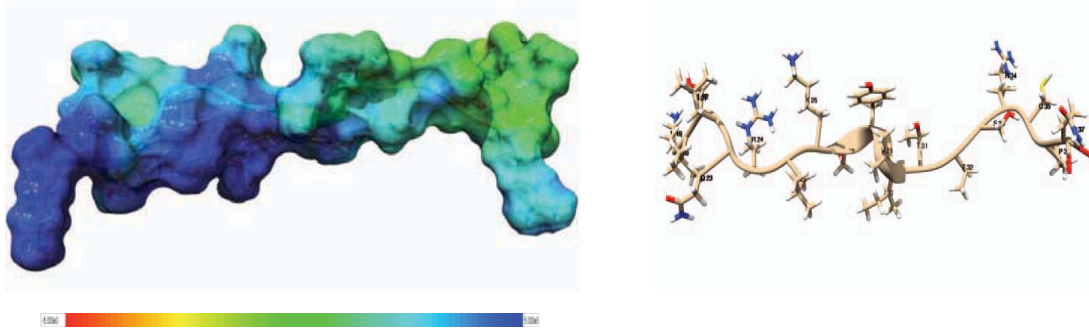
Tabla 1.3 **Péptidos derivados de CCL13 con actividad biológica.** En la tabla se muestran los péptidos derivados de CCL13 con alguna actividad descrita. CDAP-4 (*Chemokine derived antimicrobial peptide-4*), CDCP-1 (*Chemokine driven cruzipain peptide-1*).

En este trabajo se muestra, que el péptido sintético denominado CDIP-2, presenta actividad anti-inflamatoria en un modelo de inflamación alérgica pulmonar inducido con OVA, reduce el infiltrado inflamatorio; actuando como agonista parcial con los receptores CCR3, CCR2 y CCR3; modulando así el proceso inflamatorio en las vías respiratorias [110].

El péptido CDIP-2 fue obtenido de la secuencia de la quimiocina CCL13 por cortes; tiene 19 aminoácidos (*19-KISLQRLKSYVITTSRCPQ-37*), peso molecular de 2221.66g/Mol, carga neta de 4<sup>+</sup> a pH 7, estos detalles se muestran en la **Fig 1.8**; tiene residuos conservados en la familia de MCP, principalmente los aminoácidos cargados positivamente que en quimiocinas como CCL2 se han comprobado experimentalmente como residuos involucrados con la activación del receptor CCR2 [5].

No existen por el momento otros estudios sobre esta quimiocina o la secuencia de CDIP-2, otros grupos solo han reportado que las MMPs, como la MMP-12 inactivan a las quimiocinas CCL2, CCL7, CCL8 y CCL13 eliminando mediante proteólisis, los primeros 4 y 5 aminoácidos de las quimiocinas. En modelos *in vivo* de inflamación se demostró que los animales deficientes en MMP-12 presentan inflamación exacerbada lo cual podría estar relacionado con la falta de regulación en la actividad de las quimiocinas [95].

## 19-KISLQRLKSYVITTSRCPQ-37



**Figura 1.8** Secuencia del péptido CDIP-2 y su potencial electrostático. El péptido CDIP-2 proviene de la secuencia de la quimiocina CCL13 del aminoácido 19 al 37, posee 4 aminoácidos cargados positivamente (en rojo) y una carga neta de 4 a pH 7, en las figuras se representa el potencial electrostático del péptido, donde la escala en azul indica mayor potencial positivo, también se muestra el esqueleto del péptido en la parte derecha de la figura, con la estructura secundaria que posee dentro de la secuencia de CCL13. Modelo realizado con el software UCSF Chimera

### 1.11. Mecanismos de los fármacos contra receptores de quimiocinas

Los receptores de quimiocinas y otros GPCRs, son un blanco importante para la creación de nuevos fármacos; sin embargo, existen muchos retos en ésta área de investigación, debido a la falta de conocimiento sobre la estructura de la mayoría de receptores, no se conoce exactamente el tipo de respuestas que se producen con los diferentes ligandos en diferentes contextos celulares [32].

Los antagonistas de receptores de quimiocinas y de otros GPCRs pueden impedir la unión de los ligandos naturales, mediante la unión a sitios ortostéricos del receptor, es decir sitios en el receptor que normalmente son ocupados por el ligando, produciendo en este caso una competencia directa con el o los ligandos naturales. El otro caso, es la unión de los antagonistas a sitios alostéricos en el receptores, es decir a sitios diferentes o a los que normalmente se une el ligando. La unión de moléculas a sitios alostéricos de GPCRs induce cambios conformacionales en el receptor que impide que el ligando se una a los sitios ortostéricos por impedimentos conformacionales [28].

En el caso de los receptores de quimiocina, se ha descrito que la mayoría de moléculas orgánicas son moduladores alostéricos, siendo en muchos casos descrito que las moléculas con grupos de amidas cargadas positivamente y flanqueadas por residuos aromáticos, que se unen

al residuo de glutamina conservado en el 74% de los receptores de quimiocina presente en la séptima asa extracelular.

Los sitios ortostéricos de los receptores de quimiocina se encuentran en el dominio amino terminal del receptor y en aminoácidos expuestos en las primeras tres aspas extracelulares, en contraste con los sitios ortostéricos que se localizan en sitios mas internos de las aspas extracelulares [28].

Diversos trabajos sustentan que los moduladores alostéricos representan estrategias más eficaces que las presentadas por los antagonistas ortostéricos que requieren un a alta afinidad por los receptores, y mantener una concentración constante en el sistema para competir eficazmente con los ligandos naturales [4].

Los moduladores alostéricos en los receptores de quimiocina pueden producir efectos diferenciales en las vías de señalización de los receptores, provocando activación no similar a la producida por los ligandos, pudiendo ser agonistas, antagonistas parciales, antagonistas o agonistas inversos [28]. En el caso de los receptores de quimiocina, existen diversos ejemplos de moléculas con actividad de moduladores alostéricos, algunos ejemplos son para CXCR1, CXCR2 (Repertaxin), para CCR5 (Trichosanthin, AK602, AK530, TAK779, SCH 351125, 873140), CXCR4 (RSVM, ASLW, Trichosanthin) y para CCR1, CCR3 (UCB35625) [28].

## 2 Justificación

En las últimas décadas la prevalencia de las enfermedades inflamatorias y crónico degenerativas ha incrementado; convirtiéndose esto en un problema de salud pública, debido a los altos costos de los tratamientos y la pérdida en la calidad de vida de los pacientes. Un ejemplo de este tipo de padecimientos, es el asma; caracterizada por la inflamación crónica de las vías respiratorias, que provoca daño progresivo en la función pulmonar. Actualmente se estima, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) que existen mas de 300 millones de asmáticos en el mundo; mientras que en México la prevalencia se calcula entre el 2.5-5% [112, 3].

La terapia farmacológica para tratar el asma, esta basada principalmente en el uso antiinflamatorios como los corticosteroides sistémicos, broncodilatadores y bloqueadores de receptores de leucotrienos; sin embargo, aproximadamente del 5-10% de los pacientes son resistentes a los tratamientos típicos, además de que estos tratamientos no resuelven la inflamación de forma eficiente en todos los casos [3, 50].

Las quimiocinas y sus receptores representan un blanco importante para el estudio de los fenómenos que acontecen durante el proceso de inflamación en el asma, ya que éstas moléculas son los principales quimioatrayentes, mediadores de la eosinofilia y reclutamiento de linfocitos que favorecen el desarrollo y progresión de las respuesta inflamatoria en las vías respiratorias [2]. Las quimiocinas inducen proliferación de células estructurales como músculo liso y epitelio, fenómeno que está estrechamente ligado en el asma con la remodelación pulmonar. La investigación en esta área resulta de interés para la generación de moléculas o estrategias biotecnológicas enfocadas a reducir la actividad de las quimiocinas en patologías como el asma [13].

Los esfuerzos para crear antagonistas de receptores de quimiocinas, no han sido exitosos, principalmente por la característica de unirse a más de un receptor con diferente afinidad que presentan las proteínas de esta familia; por lo que la creación de antagonistas multifuncionales, es decir con actividad en varios receptores de quimiocinas podría ser una estrategia coadyuvante a los tratamientos clásicos del asma [97].

CCL13 es una quimiocina humana, descrita como uno de los principales quimioatrayentes de eosinófilos en humanos; se une a los receptores CCR3, CCR2 y CCR1; presentes en diversos tipos celulares como macrófagos, células cebadas y células estructurales [36, 37, 113]. Esta quimiocina se encuentra elevada en fluidos broncoalveolares de pacientes asmáticos, biopsias de tejido pulmonar y se ha propuesto como biomarcador en asma por algunos autores [89]. A

diferencia de otras MCPs para las que se conoce que aminoácidos resultan importantes para la activación de sus receptores; hasta ahora para CCL13, solo se conoce que la modificación al extremo amino terminal, reduce la actividad biológica, desconociéndose por el momento qué aminoácidos de la región central participan en la activación de los receptores; conocimiento que resulta crucial para la creación de antagonistas más eficaces, basados en el conocimiento de las interacciones ligando-receptor [36, 42].

En este trabajo proponemos el estudio de péptidos derivados de la quimiocina CCL13 y su posible actividad como antiinflamatorios. En específico se estudió una secuencia del aminoácido 19-37 de CCL13, denominada CDIP-2 la cual no se ha estudiado previamente.

La secuencia de CDIP-2, podría representar un segmento importante de la quimiocina en cuanto a la activación de los receptores CCR1, CCR2 y CCR3, ya que conserva algunos aminoácidos descritos en otras secuencias cruciales para la activación de receptores de quimiocina.

El estudio básico de las interacciones del péptido CDIP-2 con los receptores de quimiocina, así como la modulación diferencial en las respuestas de activación celular mediadas por los receptores, podrían resultar de utilidad para conocer de forma mas clara la modulación de los diferentes ligandos en receptores como CCR3.



## 3 Hipótesis y Objetivos

### 3.1. Hipótesis

Si el péptido CDIP-2 interacciona con los receptores CCR1, CCR2 y CCR3 induciendo internalización y reduciendo la activación mediada por los ligandos; entonces el efecto antiinflamatorio del péptido en el modelo murino de inflamación alérgica pulmonar se debe a la disminución en la activación de los receptores de quimiocina mencionados.

### 3.2. Objetivos

#### 3.2.1. Objetivo general

Analizar el efecto del tratamiento con el péptido CDIP-2 en la respuesta inmune asociada con la inflamación de las vías respiratorias *in vivo* y los posibles mecanismos por los cuales el péptido reduce la migración celular producida por ligandos de los receptores de quimiocina CCR1, CCR2 y CCR3.

#### 3.2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tratamiento con el péptido CDIP-2 sobre la respuesta alérgica, utilizando el modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.

1.1 Cuantificar y caracterizar el infiltrado celular inflamatorio obtenido de lavados broncoalveolares, en los diferentes grupos experimentales.

1.2 Cuantificar el infiltrado celular en el tejido pulmonar, alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos en los diferentes grupos experimentales.

1.3 Medir la concentración de citocinas: IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  e IL-10, en el fluido del lavado broncoalveolar obtenido.

1.4 Medir la cantidad de ARN mensajero en el tejido pulmonar de citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocina, relacionados con la respuesta alérgica.

**2.**Diferenciar *in vitro* eosinófilos murinos a partir de médula ósea y caracterizarlos por citometría de flujo.

**2.1** Estudiar el efecto de CDIP-2 sobre la quimiotaxis inducida por las quimiocinas CCL11, CCL3, CCL5 y CCL24.

**2.2** Evaluar si el péptido CDIP-2 internaliza al receptor CCR3 en eosinófilos murinos.

**2.3** Determinar el efecto del péptido CDIP-2 en la expresión del ARN mensajero de citoquinas y receptores de quimiocinas relacionados con la activación de los eosinófilos murinos.

**2.4** Cuantificar la secreción de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular producida por quimiocinas como CCL11 y determinar si el péptido CDIP-2 modifica la magnitud de la señal obtenida con los agonistas.

**2.5** Investigar si el péptido CDIP-2 induce la fosforilación de las cinasas Erk1/2 y p38 y si la fosforilación debida a la activación de CCR3 puede ser modulada por el péptido.

**3.**Caracterizar la actividad de CDIP-2 sobre el receptor humano CCR3.

**3.1** Evaluar el efecto de CDIP-2 sobre la quimiotaxis inducida por las quimiocinas CCL11 y CCL13.

**3.2** Cuantificar la asociación de GTP a proteínas G, debida a la activación del receptor CCR3 en presencia de los agonistas del receptor y el péptido.

**3.3** Medir la modificación de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular producida por quimiocinas como CCL11 y determinar si el péptido CDIP-2 modifica la magnitud de la señal obtenida con los agonistas.

**3.4** Evaluar si el péptido CDIP-2 internaliza al receptor hCCR3.

**4.**Caracterizar la actividad de CDIP-2 sobre los receptores humanos CCR1 y CCR2. **4.1**

Evaluar el efecto de CDIP-2 sobre la quimiotaxis inducida por diferentes ligandos de CCR1 y CCR2, utilizando células mononucleares de sangre periférica humana.

**4.2** Determinar si el péptido CDIP-2 internaliza a los receptores CCR1 y CCR2 en monocitos humanos THP-1.

**4.3** Medir la secreción de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular producida por agonistas de CCR1 y CCR2.

## 4 Metodología experimental

### 4.1. Células

#### THP-1 (ATCC TIB-202)

Las células THP-1 son una línea celular de monocitos humanos que crecen en suspensión (ATCC TIB-202). Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con 0.05mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol, 1mM de Piruvato de Sodio, Penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 $\mu$ g/ml), 1mM HEPES y 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFB). Las células se mantuvieron a una densidad entre 2-9x10<sup>5</sup> cells/ml a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup>.

#### CHO (ATCC CCL-61)

Las células CHO-K1, son una línea celular tipo epitelial derivada de una subclona parental de una biopsia de ovario realizada a un hámster chino (*Cricetulus griseus*) en 1957. Estas células se cultivaron en medio DMEM complementado con 0.05mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol, 1mM de Piruvato de Sodio, Penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 $\mu$ g/ml), 1mM HEPES y 10 % de suero fetal bovino inactivado. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en cajas Petri de cultivo 100mm X 20mm y se despegaron de la superficie plástica utilizando una solución de PBS/EDTA (Apéndice).

#### 4.1.1. Separación de células mononucleares de sangre periférica humana

Para la separación de las células mononucleares de sangre total, se colocaron 10mL de Histopaque 1.077 (*Sigma*), en un tubo Falcon de 50mL colocado verticalmente y se dispensaron cuidadosamente 10mL de sangre periférica humana. El tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min a 20°C. Después de la centrifugación, se separó la fase superior opaca y se colocó en un tubo nuevo con 10mL de PBS 1X pH 7.4, este lavado se realizó dos veces. El botón celular obtenido se resuspendió en PBS 1X y las células se contaron en un hemocitómetro. Todos los procedimientos con sangre humana se realizaron con pacientes sanos y los protocolos fueron aprobados por el comité de investigación bioética en humanos del IIB, UNAM.

### 4.2. Animales

En el presente estudio se utilizaron ratones de 6-8 semanas de edad de la cepa BALB/c, hembras, del bioterio de barrera del IIB, con alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedi-

mientos se realizaron de acuerdo con los estatutos de bioética aprobados por la comisión del IIB, UNAM.

### 4.3. Experimentos *in vivo*

#### 4.3.1. Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar (IAP)

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad libres de patógenos. Los animales se dividieron en tres grupos (3-5 animales por grupo en cada experimento).

##### Modelo severo

Este protocolo experimental, se ejemplifica en la **Fig 4.1**:

**Día 1:** Se administró por vía i.p. 10  $\mu\text{g}$  de OVA grado V (*Sigma*), emulsificados en 1mg de Imject Alum (Pierce) como adyuvante (Formulación de Hidróxido de Aluminio e Hidróxido de Magnesio), llevándose la solución a un volumen final de 100 $\mu\text{L}$  con Solución Salina Isotónica calidad inyectable (SS), al grupo de animales control se les inyectó únicamente SS.

**Día 5:** Se repitió el procedimiento descrito para el día uno.

**Día 12:** Se administró por vía Intratraqueal (i.t.) un volumen total de 100 $\mu\text{L}$ , de una solución de OVA al 0.75% en SS a los ratones inmunizados con OVA, mientras que a los animales control únicamente se les administró SS.

**Día 22:** Se repitió el procedimiento descrito para el día 12.

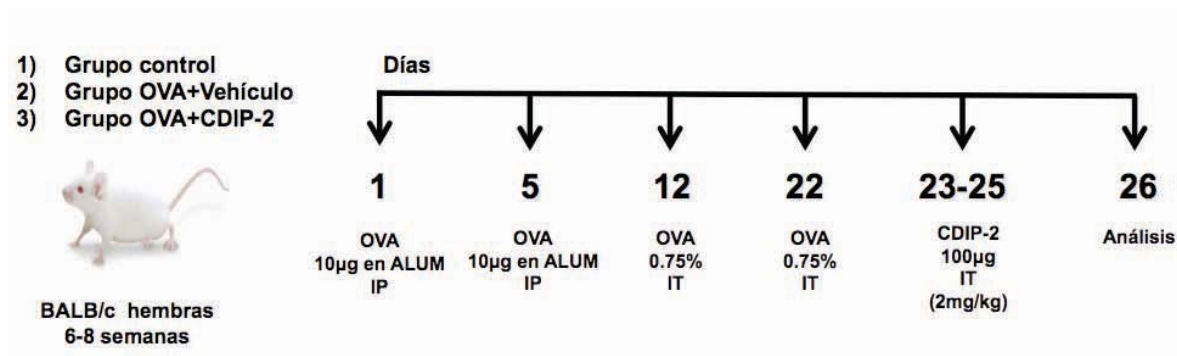
**Días 23-25:** Se administró a un grupo de animales por vía i.t. CDIP-2 (2mg/kg) en un volumen total de 100 $\mu\text{L}$ , se utilizó SS como vehículo, al resto de los animales control se les administró SS.

**Día 26:** Los animales se sacrificaron para el análisis, obteniendo el tejido pulmonar, LBA, suero y ganglios linfáticos.

### 4.4. Procesamiento de las muestras

#### 4.4.1. Análisis por citometría de flujo de las células obtenidas del LBA

El LBA se obtuvo con PBS 1X, mediante la canulación de la tráquea, de cada espécimen se recolectó un volumen aproximado de 4mL de LBA. El primer mililitro obtenido se centrifugó 5 min (1500 rpm 4°C), el sobrenadante se almacenó a -70°C para su posterior análisis. Las células obtenidas del LBA se contaron utilizando un hemocitómetro.



**Figura 4.1 Protocolo experimental seguido en el modelo severo de IAP.** La figura indica el esquema utilizado en el modelo de IAP inducido con OVA, los ratones recibieron 2 retos por vía i.t. de OVA el día 12 y 22 del protocolo experimental y el tratamiento con CDIP-2 del día 23 al 25 [114].

Las células del LBA se marcaron con anticuerpos que reconocen moléculas de superficie que permiten identificar por citometría de flujo las diferentes poblaciones celulares: F480/Cy5, GR1/Pe-Cy7 (Ly-6G/ Ly-6C), SiglecF/Pe, CD3 $\epsilon$ /Pe, CD4 /APC, CCR3/Pe, CCR1, CCR2, CD11b/FITC, CD11c/Pe (Ver detalles en apéndice A).

Las muestras teñidas se analizaron utilizando el equipo FACscalibur (*BD*) y los datos fueron procesados utilizando el software FlowJo (*Tree Star*) para diferenciar las poblaciones de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), eosinófilos SiglecF<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>) y linfocitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) presentes en las muestras de LBA de los diferentes grupos experimentales.

#### 4.4.2. Procesamiento del tejido pulmonar

Los pulmones se fijaron en etanol absoluto para el procesamiento histológico. De los bloques de parafina, se realizaron cortes histológicos finos (10-50 $\mu$ m), los cuales se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), para analizar el proceso inflamatorio. Mientras que otro grupo de tejidos se congeló a -70°C para la posterior extracción del Ácido Ribonucleico (ARN).

La microscopía y análisis morfométrico de los cortes histológicos se realizaron en un microscopio Olympus, BX-40; el infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquial se cuantificó utilizando el software Image-Pro Plus (*Media Cybernetics*).

#### 4.4.3. Extracción de ARN del tejido pulmonar

Utilizando el reactivo TRIzol (*Life Technologies*), se extrajo el ARN total del tejido pulmonar. El ARN obtenido se analizó en geles de agarosa al 1.5%, el ácido nucleico se cuantificó en  $\mu$ g/ $\mu$ L utilizando un espectrofotómetro.

#### 4.4.4. Síntesis del ADN complementario

Para la síntesis del ADN complementario (cADN), se utilizaron 5 $\mu$ g de ARN y el protocolo indicado para la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (MMLV-RT), Buffer Firts Strand 5X: 250 mM Tris-HCL (pH8.3 a temperatura ambiente), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT 0.1M., Oligo (dT) (500mg/ml) y mezcla de dinucleotidos trifosfatados (dNTPs) 10mM (10mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, stock 100mM, todo en agua libre de endonucleasas (ver apéndice ).

### 4.5. Experimentos *in vitro*

#### 4.5.1. RT-PCR en tiempo real

Con el cADN obtenido, se realizaron reacciones de RT-PCR en tiempo real utilizando Sybergreen como reportero fluorescente. Para la identificación de los transcritos de los diversos genes, se utilizaron secuencias de oligonucleotidos específicas (ver apéndice), como gen de control interno se utilizaron oligonucleotidos para amplificar el transcrito del gen de  $\beta$ -actina.

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

El valor de  $\Delta\Delta CT$  se obtiene a partir de la ecuación:

$$\Delta\Delta CT = (CT \beta\text{-Actina} - CT_{\text{Gen analizado}})_{OVAoOVA+CDIP-2} - (CT \beta\text{-Actina} - CT_{\text{Gen analizado}})_{ControlSS}$$

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

#### 4.5.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para IgE, IgG1 anti OVA

Las placas para ELISA de 96 pozos se fijaron adicionando 100 $\mu$ L por pozo de una solución de 20 $\mu$ g de OVA disuelta en NHCO<sub>3</sub> 0.1M pH 8.3 y se incubaron toda la noche a 4° C. Después se lavaron 4 veces con 250 $\mu$ L de solución de lavado (Apéndice), posteriormente las placas se bloquearon adicionando a cada pozo 200 $\mu$ L de solución de ensayo y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente las placas se lavaron 3 veces con 250 $\mu$ L de solución de lavado se le adicionaron 100 $\mu$ L de las muestras de suero diluidas 1:10 en solución de trabajo, se incubaron durante 1 hora a 37°C. Al término de la incubación las placas se lavaron 5 veces con 250 $\mu$ L de solución de lavado y posteriormente se agregaron a cada pozo 100 $\mu$ L de la solución de anticuerpo (anticuerpo de detección biotinilado para el caso de IgE o anticuerpo conjugado con HRP para el caso de IgG1 y IgG2a) y se incubaron durante 1 hora a 37°C.

Para la detección de IgE anti-OVA: al término de la incubación con el anticuerpo biotinilado, las placas se lavaron 5 veces con 250 $\mu$ L de solución de lavado y se adicionó el reactivo Avidina-Peroxidasa de rabano (HRP) diluido 1:250 en solución de trabajo (Apéndice), incubando durante 30 min a 37°C. Para el caso de la IgG1 e IgG2a después de la incubación con el anticuerpo conjugado con HRP y en el caso de la determinación de IgE después de la incubación con el reactivo Avidina-HRP, las placas se lavaron 7 veces con 250 $\mu$ L de solución de lavado y se adicionaron 100 $\mu$ L de solución de TMB, incubando durante 30 min en oscuridad. Para detener la reacción se agregó a cada pozo 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y posteriormente se determinó la densidad óptica en el lector para placas de 96 pozos.

#### 4.5.3. ELISA para determinar citocinas en LBA

Los ensayos de ELISA para cuantificar citocinas en LBA, se realizaron utilizando kits de la marca BioLegend y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Cada muestra de LBA se probó por duplicado al igual que el estándar con citocina recombinante.

#### 4.5.4. Estimulación con OVA de células extraídas de ganglio mediastinal.

De los ratones inmunizados con OVA, se tomaron los ganglios mediastinales se disgregaron y se lisaron los eritrocitos. Utilizando 1 millón de células por tratamiento, se estimularon con 50 $\mu$ g de OVA por 4 días, otras muestras se estimularon con 50 $\mu$ g de OVA+CDIP-2 (100 $\mu$ g/ml) o solo CDIP-2 (100 $\mu$ g/ml) o medio de cultivo RPMI adicionado con 1 % de SFB. Cada tratamiento se probó por triplicado y transcurridos los 4 días se recolectó el sobrenadante, donde se determinó por ELISA la concentración de citocinas.

### 4.6. Activación de receptores de quimiocina

#### 4.6.1. Determinación de Ca<sup>2+</sup> intracelular

Este protocolo se utilizó para células de las líneas THP-1, CHO y eosinófilos murinos derivados de médula. Las células 10E6/mL se tiñeron con los colorantes Fura-red y Fluo-3 (Invitrogen, Molecular Probes) como se indica a continuación: Se pesaron 0.0250g de ácido plúronico, el cual se diluyó en 5mL de DMEM suplementado al 2% con SFB, de la solución de colorantes resuspendidos en DMSO, se añadieron 30 $\mu$ L de Fluo3 (6 $\mu$ g/mL) y 50 $\mu$ L de Fura red (10 $\mu$ g/mL).

Se mezcló 1mL de la suspensión celular con 1mL del colorante preparado, lo cual se incubó por 45 min a 37°C en un rotor protegido de la luz. Posteriormente se centrifugó a 1500rpm, 5 min y se lavó el pellet celular 2 veces con medio RPMI o DMEM suplementado con 2% SFB. Posteriormente las células se resuspendieron en 1mL de medio de cultivo sin SFB y se incubaron 45min a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Se repitió el ciclo de lavado y se resuspendió el botón celular en 1mL de DMEM o RPMI sin SFB, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su análisis en el citómetro.

Para el análisis en el citómetro se colocaron 600 $\mu$ L de medio sin suero fetal, adicionando 100 $\mu$ L de la suspensión celular por tubo. Las muestras se mantuvieron a 37°C hasta su análisis en el citómetro. Los estímulos se colocaron después de 200 segundos de adquisición. Como

control positivo de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó ionomicina (1mg/mL). Los datos se reportan como la razón de las fluorescencias obtenidas de los canales FL1/FL3 utilizando el software FlowJo.

#### 4.6.2. Internalización de receptores de quimiocina por citometría de flujo

Para estos ensayos se utilizaron células de la línea celular THP-1,  $2 \times 10^5$  células por muestra fueron resuspendidas en  $100 \mu\text{L}$  de medio RPMI sin SFB, adicionando un estímulo de quimiocinas CCL13, CCL7, CCL2, CCL15 y CXCL12 como control negativo (100ng/mL) o de CDIP-2 ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ); después del estímulo la placa se incubó durante 45 min a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente la placa se lavó 2 veces con una solución a pH 3 (Apéndice), en otro protocolo paralelo se lavó con PBS frío y se incubó una placa control a  $4^\circ\text{C}$ . Después se agregó el anticuerpo anti CCR1, CCR2 para ser detectado por citometría de flujo, se incubaron 20 min a  $4^\circ\text{C}$  y se lavó dos veces con buffer para citometría (PBS1X+SFB %2), como reactivo secundario se utilizó estreptavidina marcada con FITC o Pe según la disponibilidad.

Cada concentración de quimiocina y péptido probado se analizó por duplicado en cada experimento. Se utilizó el citómetro FACS Calibur y las muestras se analizaron con el software FlowJo, de donde se obtuvieron las medias de fluorescencia requeridas para calcular la expresión del receptor en superficie como:

$$\% \text{ expresión} = \frac{(\text{MF}_{\text{experimental}} - \text{MF}_{\text{muestra sin teñir}})}{(\text{MF}_{\text{muestra sin tratamiento}} - \text{MF}_{\text{muestra sin teñir}})} * 100$$

Para el análisis del receptor CCR3, se realizó el mismo procedimiento, pero en este caso se usaron células transfectadas establemente con el receptor humano CCR3 de la línea celular CHO; se utilizaron las quimiocinas CCL11 y CCL13 como control positivo de internalización.

Para el caso del receptor CCR3 murino se utilizaron eosinófilos murinos derivados de médula ósea, utilizando mCCL11 y CDIP-2. Para detectar al receptor, se utilizó un anticuerpo anti mCCR3/Pe.

#### 4.6.3. Asociación de $\gamma$ -GTP

Se obtuvieron extractos de membranas de las células CHO, establemente transfectadas con los receptores de quimiocina, utilizando un método de disgregación física. Posteriormente se determinó el contenido de proteínas totales en el disgregado celular; se congelaron alícuotas en una solución de sacarosa 1mM a  $-70^\circ\text{C}$ , hasta su utilización. De las preparaciones de membranas celulares, se tomaron  $125 \mu\text{g}$  de proteína por reacción de  $500 \mu\text{L}$ . En los tubos donde se midió la asociación de  $\gamma$ -GTPS<sup>35</sup> se adicionó: GTPS<sup>35</sup> 0.05nM ( $10 \mu\text{L}$ ), GDP  $10 \mu\text{M}$  ( $5 \mu\text{L}$ ), agonista a probar en la solución de trabajo (TRIS-HCl (50mM), TRIS base: 0.97 g,  $\text{MgCl}_2$ : 0.6099 g (3mM), EGTA: 0.380 g (0.2mM, pH 7.4). Las reacciones se incubaron a  $30^\circ\text{C}$ , 90 min en agitación.



El volúmen de reacción se colocó sobre el filtro y se lavó 3 veces con la solución de trabajo, adicionado con Albúmina sérica Bovina (BSA) 0.5 %. Los filtros se colocaron en viales con 10mL de líquido de centelleo, se llevaron al contador donde se determinaron las cuentas por minuto en cada muestra. En el caso de los ensayos con CDIP-2 los extractos celulares fueron preincubados durante 60 min a 30°C previo a la adición de las quimiocinas. Los datos se normalizaron tomando como 1 las cuentas por minuto obtenidas en las muestras sin quimiocina.

## 4.7. Transfección de células

### 4.7.1. Transfección de células CHO por electroporación

Se cultivaron células CHO en confluencia; para la transfección se utilizaron  $10 \times 10^7$  células por mL de medio sin suero fetal, se colocaron 800 $\mu$ L de la suspensión celular en celdas para electroporación y se agregó 1 $\mu$ g de ADN plasmídico (Ver detalles de los vectores en apéndice), por cada millón de células. Las celdas se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se dio un pulso de 370V, 960 $\mu$ F utilizando un electroporador.

Posteriormente las celdas se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, se colocó el contenido de la celda en placas de cultivo y se agregó medio DMEM suplementado con 10 % de SBF. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo para retirar las células muertas. Después de dos días las células se despegaron con una solución de PBS/EDTA (Apéndice) y se sembraron en placas de 96 pozos realizando diluciones seriadas para seleccionar las clonas transfectadas exitosamente.

Se cultivaron las colonias positivas y se revisó la expresión del gen por PCR y citometría de flujo. Para la selección de las clonas se utilizó 1mg/mL del antibiótico. Las células CHO transfectadas con hCCR2 y hCCR3 presentaron resistencia a la geneticina, mientras las células CHO transfectadas con hCCR1 presentaron resistencia a la higromicina. Para la expansión y mantenimiento del cultivo se utilizaron 0.5mg/mL de ambos antibióticos.

## 4.8. Ensayos de quimiotaxis

Para los ensayos de quimiotaxis se utilizaron cámaras de 46 pozos (*Neuro Probes*) y membranas de policarbonato de 25X80mm con poros de 5 u 8 $\mu$ m, del mismo fabricante. El tiempo de incubación y el tamaño del poro de la membrana se modificaron dependiendo del tipo celular. En cada pozo de la cámara de quimiotaxis se colocaron 30 $\mu$ L de la quimiocina a probar diluida en una solución Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) complementado con 0.05 % de BSA (Ver apéndice de soluciones), cada concentración se probó por triplicado. Las células se tiñeron con Calceína AM (1mg/mL) durante 15 min, en una solución de HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  adicionada con 0.05 % de BSA. Después, las células se lavaron para eliminar el exceso de colorante y se resuspendieron en la solución HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  adicionada con 0.05 % de BSA a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por mL de solución.

En la cámara de quimiotaxis se colocaron 50 $\mu$ L de la suspensión celular en cada pozo, para los experimentos de antagonismo las células teñidas fueron incubadas con CDIP-2 (1-100 $\mu$ g/mL) (0.45-45 $\mu$ M), 15 min a 37°C, antes de ser colocadas en la cámara. Posterior a la incubación las membranas se lavaron con PBS pH 7.4 (cara superior), para eliminar las células adheridas, las membranas se secaron al aire y se leyeron en el equipo FX (*BioRad*); para cuantificar la intensidad de fluorescencia en cada pozo, parámetro que se utilizó para cuantificar la quimiotaxis expresada gráficamente como índice de migración con respecto al control sin quimioatrayente. El índice de migración se calculó dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células que migraron en respuesta a las diferentes quimiocinas entre la intensidad de fluorescencia obtenida por la migración espontánea en los pozos sin quimioatrayentes.

#### 4.9. Derivación de eosinófilos

Células de médula ósea se obtuvieron del fémur y tibias de ratones BALB/c, hembras de 6-8 semanas de edad, los eritrocitos se lisaron con buffer NH<sub>4</sub>Cl al 0.8% estéril por 2 min, posteriormente la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm 5 min a 4°C. Las células se resuspendieron en medio RPMI, se contaron en el hemocitómetro y se cultivaron a una densidad de 10<sup>6</sup> cells/mL en medio RPMI, suplementado con 20% de SFB, 100IU/mL penicilina, 10mg/mL de estreptomicina, 2mM de glutamina, 25mM de HEPES, 1X de aminoácidos no esenciales, 1mM de piruvato de Sodio [115].

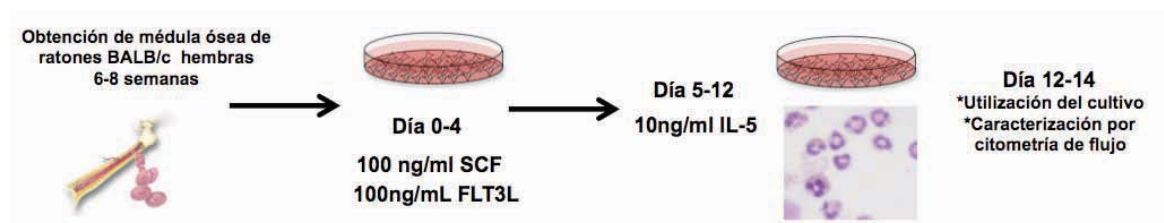


Figura 4.2 Protocolo para la diferenciación de eosinófilos de médula ósea.

Del día cero al día 4, el cultivo se suplementó con 100ng/mL de mSCF (*PreproTech*) y 100ng/mL de mFLT3-L (*PreproTech*). El día 5 el medio de cultivo se reemplazó por uno suplementado con 10ng/mL de IL-5 murina (*PreproTech*).

Al día 8 las células se cambiaron a cajas nuevas y medio fresco con IL-5 (10ng/mL), posterior a este día se agregó solo medio de cultivo, ajustando el número de células a 10<sup>6</sup>cells/mL. Apartir del día 12 se realizaron los ensayos y tinciones de citometría para detectar CCR3, Siglec-F y GR1, así como citopreparaciones para corroborar la morfología clásica de los eosinófilos (**Fig 4.2**).

#### 4.9.1. Caracterización de eosinófilos murinos de médula ósea por citometría de flujo

Se tiñeron  $5.0 \times 10^5$  células con el anticuerpo anti mCCR3 y anti Siglec-F, se incubaron durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ , posteriormente se lavó dos veces con PBS 1X pH 7.4. Como reactivo secundario se utilizó un anticuerpo anti rata/Pe y estreptavidina Pe/Cy5, se incubaron durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ , posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS 1X pH 7.4 y se resuspendieron en PBS con formaldehído al 2%.

#### 4.9.2. Western blot

Eosinófilos derivados de médula ósea ( $1.0 \times 10^6$  por muestra), fueron incubados con CDIP-2 (1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 15 min, posteriormente algunas muestras fueron estimuladas con CCL11 (100ng/mL) y CCL3 (100ng/mL) por 5 min. Después de los estímulos las células se lisaron con una solución Laemmli (*BioRad*). Las muestras se analizaron en geles desnaturante de poliacrilamida al 10%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se bloquearon durante 1 hora en una solución de TBS/leche 5% y se utilizaron anticuerpos: Fosfo p42/p44 (Erk1/2), Fosfo p38 (Santa Cruz) y anti  $\alpha$ -Actina (Santa Cruz) como control de carga. Los resultados fueron cuantificados por densitometría utilizando el programa ImageJ.

#### 4.9.3. Estadística

Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con el software Prism (GraphPad). Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando  $P < 0.05$ . En las graficas de los resultados presentados las barras representan corresponden al error estándar y en el texto de los resultados los numeros presentados corresponden al +/- error estándar.

## 5 Resultados

### 5.1. Evaluación del efecto *in vivo* del tratamiento con CDIP-2 en un modelo murino de IAP inducido con OVA

Con base en antecedentes obtenidos en el grupo de trabajo, los cuales mostraron que el péptido CDIP-2 causaba decremento en la quimiotaxis inducida por quimiocinas CC en la línea THP-1 de monocitos humanos [110]; se decidió investigar con mas detalle, los mecanismos involucrados en la actividad de éste péptido.

Para estudiar el fenómeno alérgico, se utilizó un modelo murino previamente validado por otro grupo, pudiendo así evaluar diversos parámetros de la respuesta inflamatoria (**Fig 5.1**)[114].

#### 5.1.1. Análisis por citometría de flujo de células del LBA obtenidas de ratones tratados y no tratados con CDIP-2

Las células obtenidas del LBA, representan al infiltrado inflamatorio del lumen pulmonar, por lo que la celularidad de esta muestra biológica tiene importante correlación con el tipo de inflamación presente en el tejido pulmonar. Las células obtenidas del LBA, se contaron en un hemocitómetro para determinar el número total de células en cada muestra.

Como resultado, se obtuvo menor celularidad en los ratones del grupo tratado solo con el vehículo ( $1.3 \times 10^5$ , +/- 68037 células), con respecto a los ratados con el alergen OVA y tratados con vehículo ( $1.0 \times 10^6$ , +/-  $1.4 \times 10^5$  células), mientras que los animales del grupo ratado con OVA y tratado con CDIP-2 presentaron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el número total de células en LBA ( $4.9 \times 10^5$ , +/-  $1.2 \times 10^5$  células) en comparación con los ratones del grupo OVA tratados con vehículo. Este resultado mostró que el tratamiento con el péptido CDIP-2 tuvo un efecto *in vivo*, sobre el infiltrado inflamatorio.

Con el objetivo de analizar las principales poblaciones celulares del LBA, se realizaron marcajes, utilizando anticuerpos específicos contra moléculas que permiter diferenciar linajes celulares. Se utilizó el citómetro de flujo, para cuantificar a los eosinófilos, macrófagos y linfocitos obntenidos del LBA.

Los eosinófilos, se identificaron utilizando anticuerpos contra los marcadores CCR3 y SiglecF. En la figura **Fig 5.1B** se muestra en grafica de barras el número de células dobles

positivas CCR3<sup>+</sup>, Siglec-F<sup>+</sup> obteniendo, en el grupo retado con OVA y tratados con SS (3.4X10<sup>5</sup>, +/- 88791), mientras que los animales tratados con CDIP-2 después del reto con OVA, se encontraron menos células positivas para estos marcadores (9.0X10<sup>4</sup>, +/-2.4X10<sup>4</sup>), este resultado muestra que el tratamiento con CDIP-2 repercutió directamente en la población de eosinófilos del LBA (p<0.05).

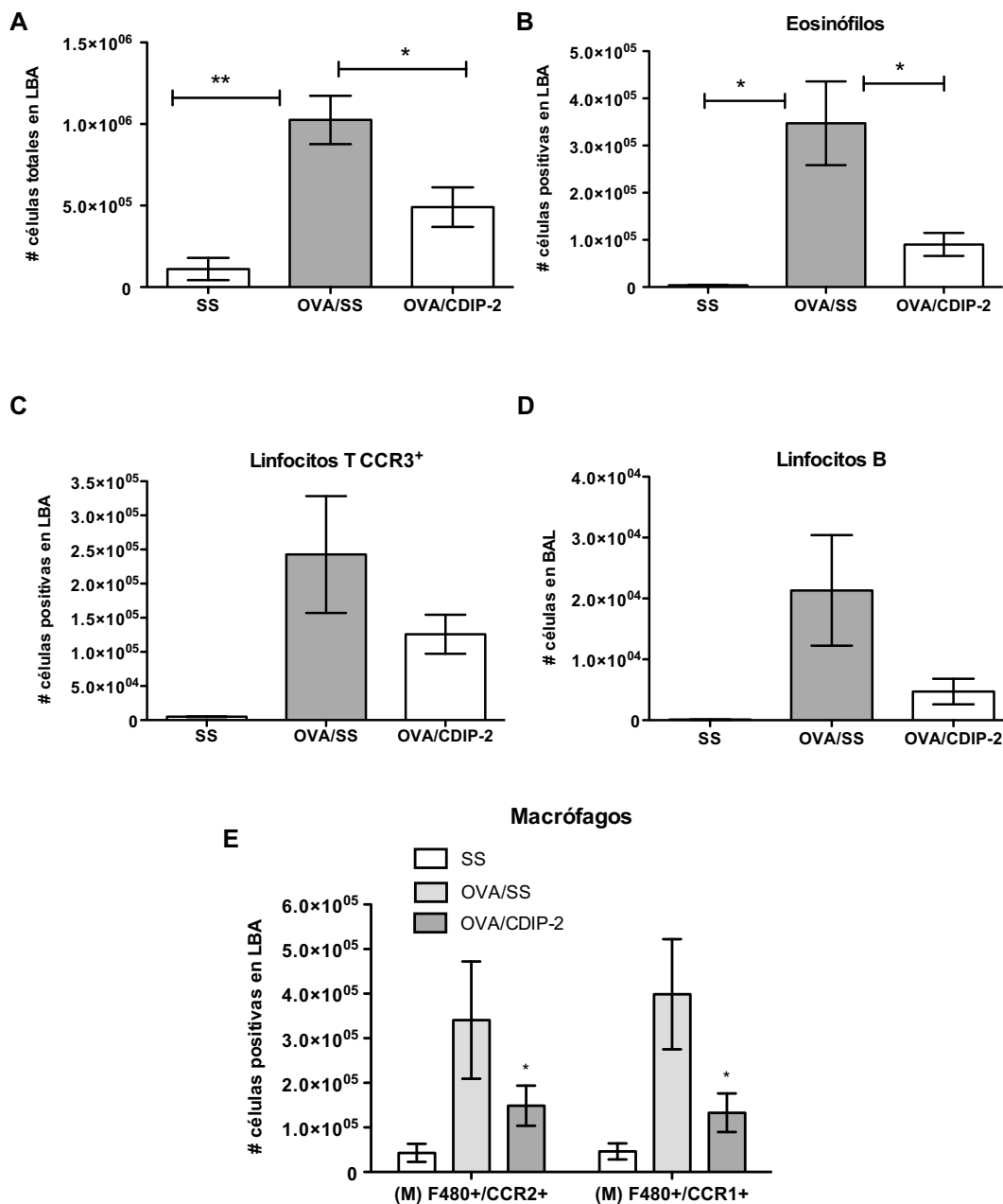
Para la identificación de los macrófagos, se utilizan marcadores como F4/80; sin embargo, además de ese marcador, se utilizaron a los receptores CCR1 y CCR2 que se expresan en estas células, principalmente durante el proceso inflamatorio.

Utilizando los marcadores F4/80<sup>+</sup>/CCR1<sup>+</sup> se encontró mayor número de macrófagos en el grupo inmunizado con OVA y tratados con SS (3.9X10<sup>5</sup>, +/-1.2X10<sup>5</sup>) con respecto al grupo inmunizado y tratado con CDIP-2 (1.3X10<sup>5</sup>, +/- 4.3X10<sup>4</sup>). Para el caso de las células F4/80<sup>+</sup>/CCR2<sup>+</sup> los datos fueron similares, obteniendo en el grupo inmunizado con OVA y tratados con SS (3.4X10<sup>5</sup>, +/-1.3X10<sup>5</sup>) (**Fig 5.1C**), con respecto al grupo inmunizado y tratado con CDIP-2 (1.4X10<sup>5</sup>, +/-4.4X10<sup>4</sup>). Por otro lado, en las mismas muestras de LBA, no se encontraron diferencias significativas entre el número de linfocitos T (**Fig 5.1D**) o linfocitos B (**Fig 5.1E**).

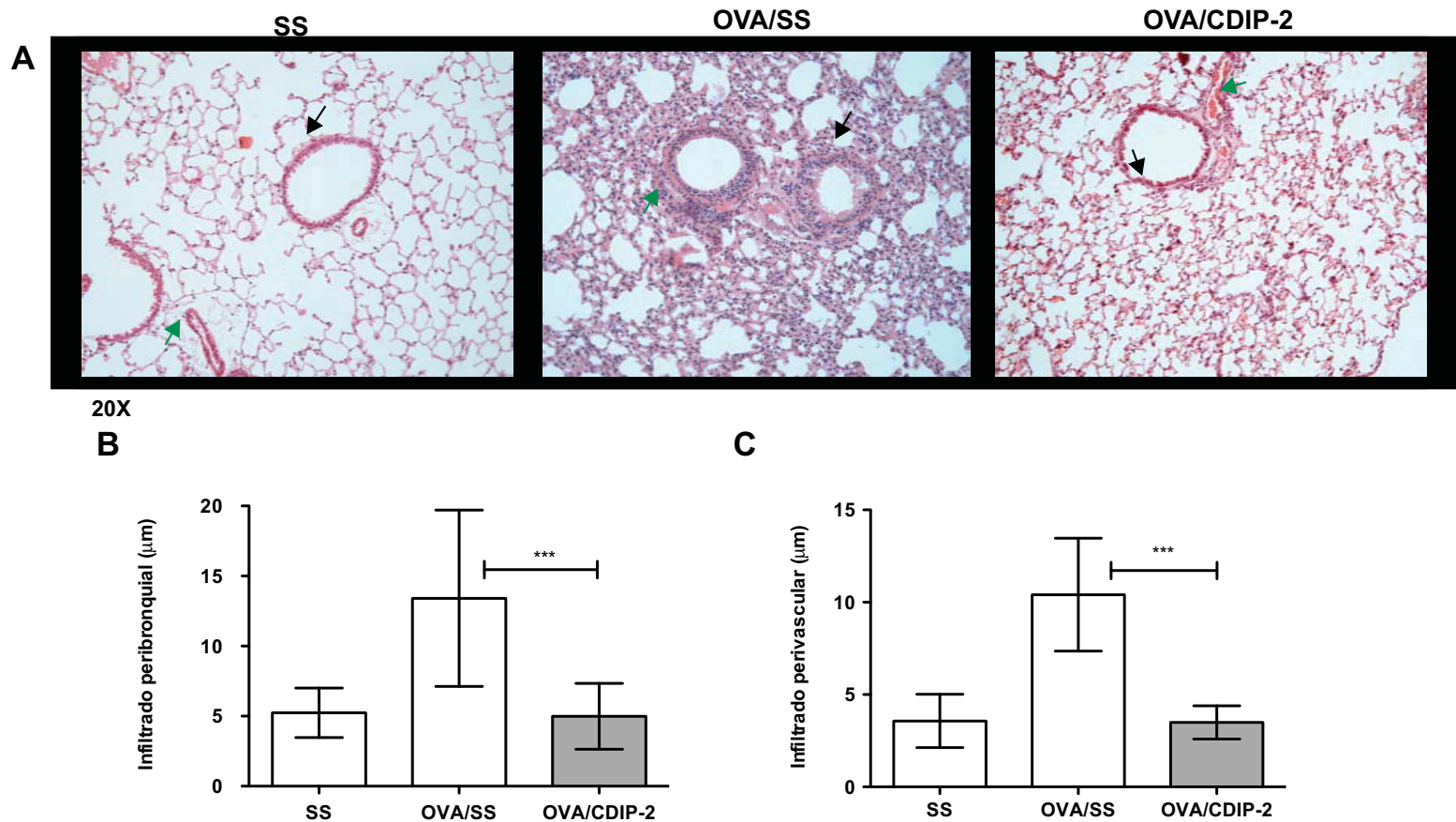
Los resultados obtenidos del análisis por citometría del LBA, sugieren que el efecto del tratamiento con el péptido fue mayor en eosinófilos que en macrófagos u otras poblaciones celulares analizadas; esto resulta importante debido al efecto de los eosinófilos en el proceso del asma.

### 5.1.2. Evaluación del infiltrado inflamatorio en pulmón

Con la finalidad de estudiar la acumulación de infiltrado inflamatorio, se realizaron cortes histológicos de los pulmones y se tiñeron con la técnica de HE, se tomaron fotografías (20x) (**Fig 5.2**). Se determinó la medida del infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquial en micrómetros. De estas determinaciones morfométricas, se concluyó que el grupo de ratones tratados con el péptido tuvieron menos infiltrado perivascular y peribronquial al día 26 del protocolo experimental (4.9, +/- 0.2μm), comparado con tejidos de los ratones tratados solo con SS (13.4, +/-0.7μm) (**Fig 5.2**).



**Figura 5.1** Análisis de las células presentes en el LBA. **A.** Células totales presentes en LBA analizadas al día 26 del protocolo experimental, de los diferentes grupos de ratones tratados y no tratados con el péptido CDIP-2. Análisis por citometría de flujo de las células obtenidas del BAL, se muestra el número total de células positivas (eosinófilos): **B.** CCR3<sup>+</sup>/SiglecF<sup>+</sup>, al igual que para **E.** F4/80<sup>+</sup>/CCR1<sup>+</sup> y F4/80<sup>+</sup>/CCR2<sup>+</sup> que corresponden a macrófagos. **C.** Linfocitos T: CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> **D.** Linfocitos B: CD19<sup>+</sup> **D.** Los datos se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey n=8. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\* p<0.001\* p<0.05.



**Figura 5.2 Evaluación del infiltrado inflamatorio en pulmón.** A. Microfotografías de los cortes de pulmones teñidos con HE de ratones tratados y no tratados con CDIP-2 (20X). Con flechas negras se señalan los bronquiolos y con flechas verdes los vasos sanguíneos. Análisis morfométrico de cortes de pulmones teñidos con HE. B. peribronquial, C. perivascular. Se determinó en micrómetros la distancia del infiltrado inflamatorio. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey n=38. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\*\*p<0.0001.



### 5.1.3. Evaluación de citocinas en LBA y tejido pulmonar en ratones tratados con CDIP-2 por las técnicas de ELISA y RT-PCR

Investigamos en los diferentes grupos experimentales, la presencia de algunas citocinas catalogadas como importantes en el proceso de inflamación alérgica pulmonar.

Se cuantificó con la técnica de ELISA, la concentración de IL-10, IL-4, IL-5 y TNF- $\alpha$  en el fluido del LBA y por RT-PCR en tiempo real en tejido pulmonar, la cantidad de ARN mensajero producto de los genes que codifican para las citocinas IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ , CCL11 y el receptor CCR3.

Utilizando el tejido pulmonar, se extrajo el ARN total y se sintetizó el cADN para realizar ensayos de RT-PCR en tiempo real. En estos ensayos, se comparó la expresión relativa del gen en estudio con respecto a la amplificación del gen de  $\beta$ -actina, analizando la posible diferencia entre los grupos experimentales. Los datos obtenidos mostraron que los animales inmunizados con OVA, presentaron mayor cantidad del ARN mensajero de los genes analizados; por ejemplo para IL-4 (**Fig 5.3A**) los ratones del grupo OVA/SS (2.0, +/-0.6) tuvieron aumento en la cantidad de ARN mensajero de este gen con respecto a los controles sanos, y el tratamiento con CDIP-2 modificó la expresión del gen de IL-4 (1.1, +/-0.4) de forma no significativa comparada con el grupo no tratado.

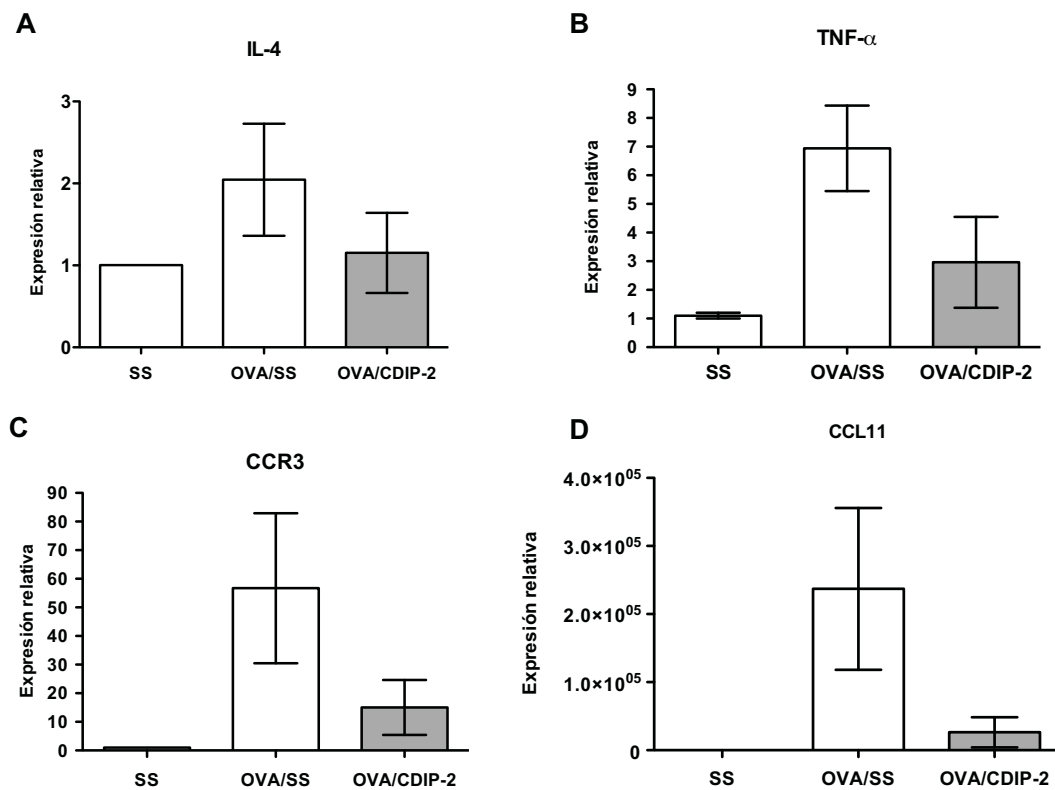
Para TNF- $\alpha$ , se encontró que el gen de esta citocina en el grupo OVA/SS (6.9, +/-1.4) se redujo en comparación con el grupo OVA/CDIP-2 (2.9, +/-1.5), sin existir diferencias significativas entre ambos al realizar la prueba ANOVA de una vía (**Fig 5.3B**); estos mismos resultados se obtuvieron en los experimentos de RT-PCR, de CCL11 y CCR3; como se muestra en la **Fig 5.3**.

Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real, se decidió medir en el fluido del LBA la concentración de las proteínas, utilizando la técnica de ELISA de las citocinas IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  e IL-10.

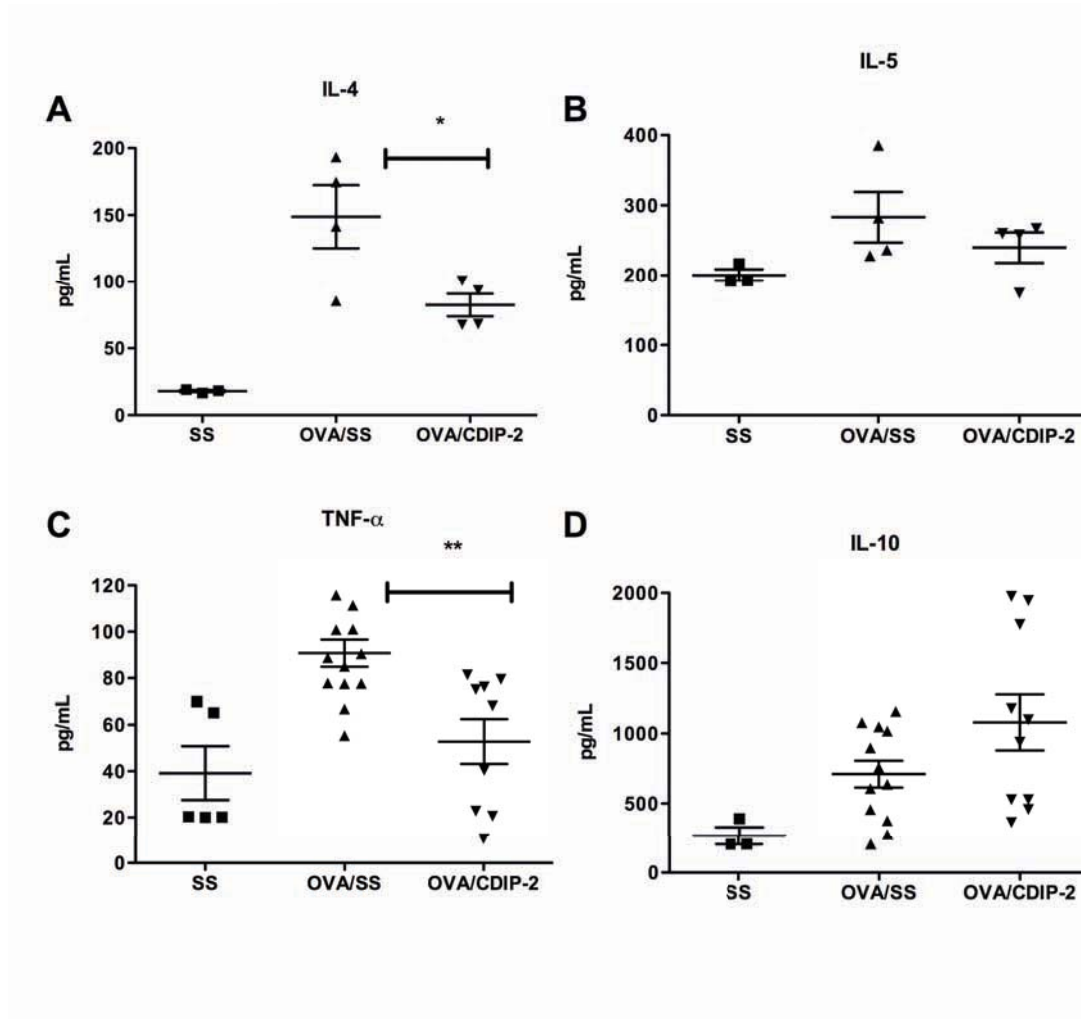
De las citocinas cuantificadas (IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  e IL-10), se encontró mayor concentración en los LBA provenientes de ratones alergenizados con OVA, comparados con los ratones control, lo que se relaciona con la respuesta inflamatoria de tipo alérgica (**Fig 5.4**). En el grupo de SS/OVA la IL-4 se elevó con respecto a los controles sanos (148.8, +/-23.6pg/mL), comparado con el grupo OVA/CDIP-2, donde se redujo la concentración de IL-4 con el tratamiento del péptido (82.4, +/-8.5pg/mL), como se muestra en la **Fig 5.4**.

De la cuantificación de las citocinas IL-5 e IL-10, no se obtuvieron diferencias estadísticas entre grupos experimentales tratados y no tratados con el péptido. Para el caso del TNF- $\alpha$ , se midió menor concentración, en el grupo OVA/CDIP-2 (52.6, +/-9.6pg/mL) con respecto al tratado con el vehículo (90.8, +/-5.8pg/mL) (**Fig 5.4C**).





**Figura 5.3** Estudio de la expresión relativa de genes relacionados con el proceso alérgico.. Del tejido pulmonar se extrajo el ARN total, se sintetizó el cADN con secuencias complementaria específicas para cada gen (ver apéndice) y se amplificaron por RT-PCR. Las gráficas muestran la expresión relativa del gen en estudio con respecto a la amplificación del gen de  $\beta$ -actina. No se muestra estadística ya que no hubo diferencias significativas, n=6.



**Figura 5.4 Cuantificación de citocinas en LBA** Se cuantificó la concentración de las citocinas **A.** IL-4, **B.** IL-5, **C.** TNF- $\alpha$ , **D.** IL-10. Los datos se reportan en pg/mL. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al  $\pm$  error estándar \*\*  $p < 0.001$  y \*  $p < 0.05$ .

#### 5.1.4. Estudio del efecto de CDIP-2 en la secreción de citocinas $T_H2$ *in vitro*

Con el objetivo de estudiar el efecto de CDIP-2 en la respuesta específica contra el antígeno OVA *in vitro*, se cultivaron células extraídas de los ganglios mediastinales de ratones alergenizados con OVA y se estimularon  $1 \times 10^6$  células *in vitro* con  $40 \mu\text{g}/\text{mL}$  de OVA durante cuatro días. Las células se trataron en cultivo con  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  de CDIP-2,  $500 \text{ng}/\text{mL}$  de CCL13 o sCDIP-2 ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), péptido con los mismos aminoácidos que CDIP-2, pero en diferente orden, cada 24 horas. Después de 4 días las células se separaron del sobrenadante, el cual se congeló, para determinar la concentración de citocinas por la técnica de ELISA.

Los sobrenadantes de las células estimuladas con OVA, aumentaron significativamente con respecto a las células sin estímulo, la concentración de IL-4 ( $19.9, \pm 1.1 \text{pg}/\text{mL}$ ), IL-5 ( $510.3, \pm 71.7 \text{ng}/\text{mL}$ ), IL-10 ( $4760, \pm 533.4 \text{pg}/\text{mL}$ ) y TNF- $\alpha$  ( $54.3, \pm 5.6 \text{pg}/\text{mL}$ ) demostrando con esto que las células respondieron positivamente al estímulo del antígeno *in vitro*. En los sobrenadantes de las células estimuladas con OVA y CDIP-2, se cuantificó un decremento significativo en la concentración de las citocinas, comparando con los sobrenadantes de las células estimuladas con OVA y tratadas con el vehículo, para IL-4 ( $8.1, \pm 0.10 \text{pg}/\text{mL}$ ) e IL-5 ( $211.4, \pm 9.4 \text{ng}/\text{mL}$ ) respectivamente.

En los sobrenadantes de las células estimuladas con la quimiocina CCL13, no se encontraron diferencias estadísticas con respecto a los pozos tratados con OVA (**Fig 5.5**).

#### 5.1.5. Determinación de inmunoglobulinas específicas anti OVA en LBA

Con el objetivo de comprobar la correcta inmunización de los animales utilizados, se midió la respuesta humoral específica contra la OVA.

Utilizando el fluido libre de células del LBA, se realizaron ELISAS para determinar la presencia de inmunoglobulinas de la clase IgE e IgG1 específicas contra OVA. Estos anticuerpos, reconocen directamente al alérgeno favoreciendo la activación de células cebadas y otras células que expresan los receptores Fc favoreciendo la liberación de mediadores inflamatorios en el pulmón. Los resultados indicaron, la presencia de respuesta específica anti OVA del tipo IgE ( $0.09, \pm 0.008$  A  $450 \text{nm}$ ) entre el grupo no alergenizado y el alergenizados con OVA ( $0.2, \pm 0.03$  A  $450 \text{nm}$ ); no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo alérgico tratado con el vehículo y el tratado con CDIP-2, estos resultados se muestran en la **Fig 5.6**. El mismo resultado se tuvo para la IgG1 específica **Fig 5.6A**.

Este dato muestra que los animales inmunizados con OVA, generaron respuestas específicas para el antígeno utilizado y que la respuesta inflamatoria observada en pulmón estuvo directamente relacionada con el reto de OVA. Por otro lado, este dato indica, que la reducción del infiltrado inflamatorio y citocinas en los animales tratados con CDIP-2, no se relacionan con la cantidad de inmunoglobulinas anti OVA.

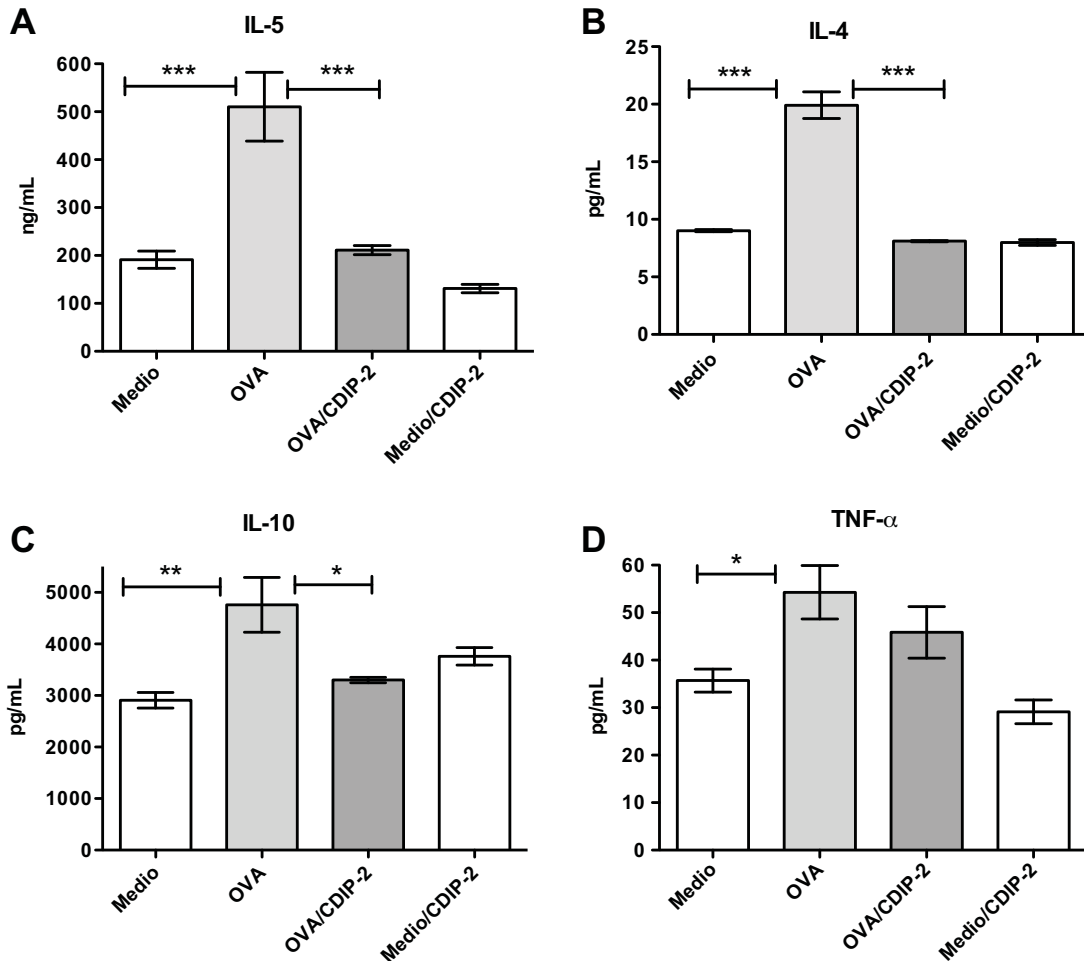
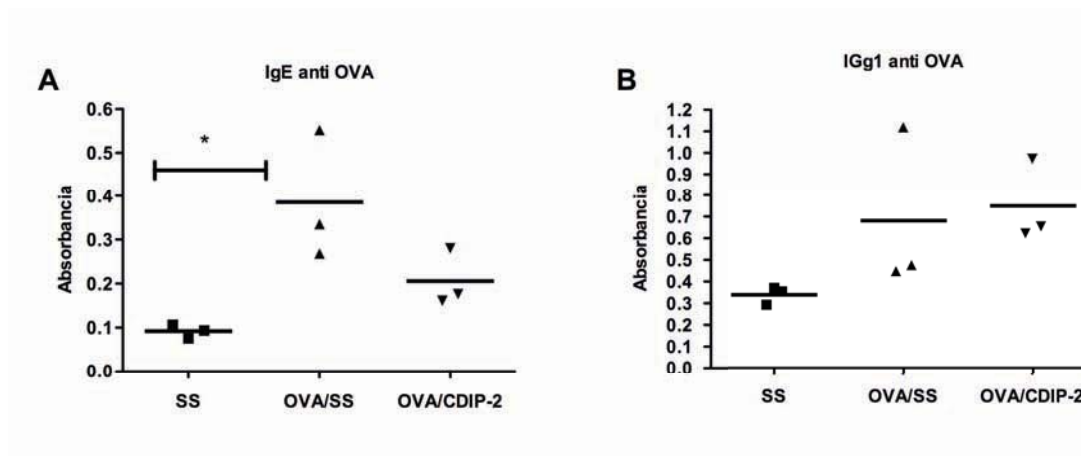


Figura 5.5 Evaluación del efecto de CDIP-2 en la secreción de citocinas en células de ganglios mediastinales estimuladas *in vitro* con OVA. Células de ganglios mediastinales de ratones alergenizados con OVA (40 $\mu$ g/mL), fueron estimuladas *in vitro* con 100 $\mu$ g/mL de CDIP-2, 500ng/mL de CCL13 y se determinaron por el método de ELISA las citocinas indicadas en el sobrenadante. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\*\* p<0.0001, \*\* p<0.001\*, p<0.05, n=4.



**Figura 5.6 Determinación de IgE e IgG1 específicas anti OVA en LBA.** Se determinó en el fluido del LBA, la presencia de IgE e IgG1 específicas contra OVA. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al  $\pm$  error estándar \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .

## 5.2. Efecto de CDIP-2 en eosinófilos

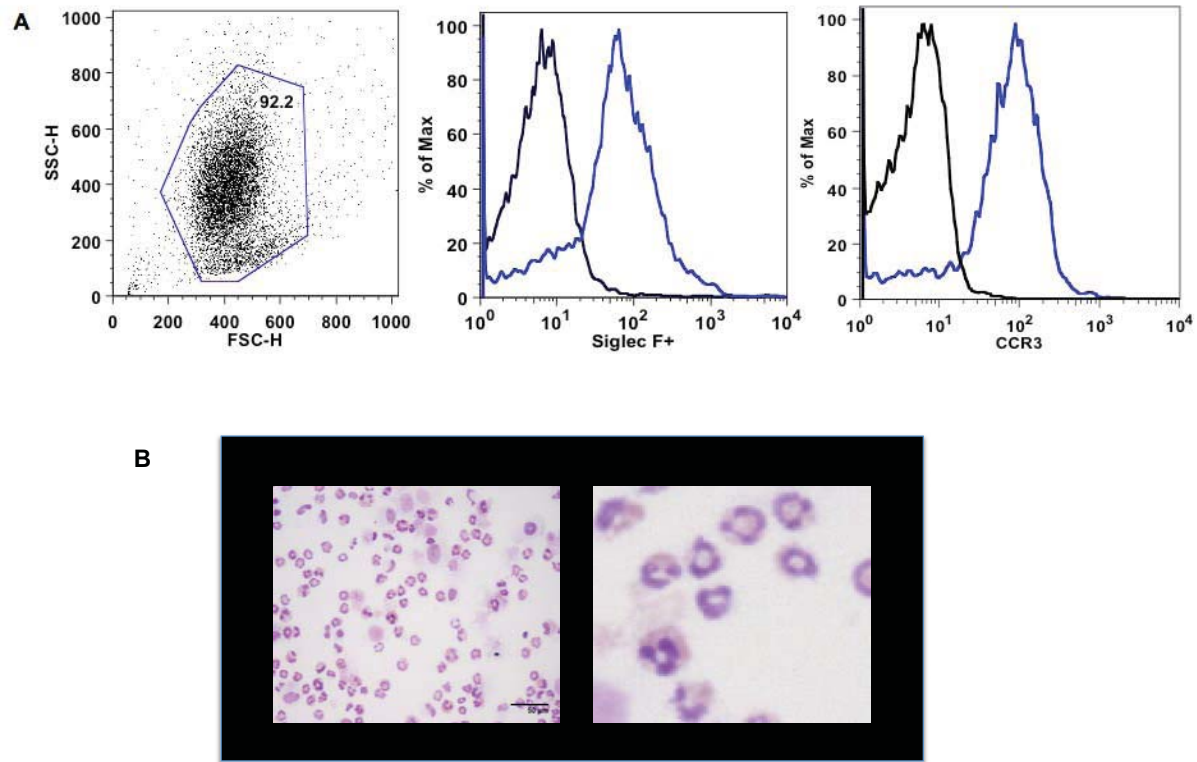
Los datos previos indicaron reducción en la eosinofilia *in vivo*, por lo que se decidió analizar el efecto del péptido CDIP-2 en eosinófilos aislados. Clásicamente en los modelos de IAP, al igual que en pacientes asmáticos, la eosinofilia representa una de las principales causas de la inflamación exacerbada y remodelación en pulmón[50]. Adicionalmente, estas células expresan receptores de quimiocina CCR3 y CCR1 que son importantes mediadores de la respuesta inflamatoria en asma [62].

### 5.2.1. Derivación y caracterización de eosinófilos murinos de médula ósea

Con el objetivo estudiar la actividad de CDIP-2 en eosinófilos, se utilizaron eosinófilos murinos derivados de médula ósea, usando un protocolo de derivación previamente validado por otros grupos [115].

La caracterización se realizó desde el día 12 de cultivo, por citometría de flujo, con los marcadores CCR3 y SiglecF (lectina de la familia de las inmunoglobulinas, específicamente expresada en eosinófilos murinos); adicionalmente se realizaron citopreparaciones y se tiñeron con colorante de Wright para observar la morfología clásica de estas células (núcleo bilobulado azulado y granulos teñidos con eósina), microfotografías representativas de las células utilizadas se muestran en la **Fig 5.7B**.

Por citometría de flujo se observó que entre un 75-80% de las células expresan SiglecF<sup>+</sup> de las cuales un porcentaje entre 50-60% expresa el receptor CCR3<sup>+</sup> (**Fig 5.7A**). En la gráfica se muestra la población total y la región utilizada para el análisis, en los histogramas, se muestra la expresión de SiglecF y CCR3 de un lote de células representativo.



**Figura 5.7** Caracterización de los eosinófilos derivados de médula ósea por citometría de flujo y morfología. **A.** Análisis representativo hecho por citometría de flujo. En la grafica de puntos se muestra la población total obtenida y en los histogramas y la expresión de SiglecF y CCR3 (en azul y en negro el control secundario), en eosinófilos derivados de médula ósea, a partir del día 12 de cultivo. **B.** Microfotografías de preparaciones teñidas con Wright, donde se observa, la morfología clásica de los eosinófilos.

### 5.2.2. Quimiotaxis inducida por ligandos de CCR3 y CCR1 en eosinófilos murinos en presencia del péptido CDIP-2

En el modelo de IAP, se observó decremento en el número de eosinófilos en LBA, por lo que se decidió investigar el efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis evocada por ligandos de CCR1 y CCR3; los principales receptores de quimiocinas expresados en estas células. En este caso se utilizaron los eosinófilos derivados de médula ósea.

Para estos ensayos, las células se incubaron durante 15 min con  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $4.5\mu\text{M}$ ) de CDIP-2 y posteriormente se realizó el ensayo de quimiotaxis tal y como se describió en métodos. Mediante estos experimentos se concluyó que la incubación de los eosinófilos murinos con CDIP-2, redujó la migración en respuesta a  $100\text{ng}/\text{mL}$  ( $55\text{nM}$ ) de las quimiocinas, teniendo que para CCL11 el índice de migración fue de  $(1.6, \pm 0.05)$ , comparando con el obtenido con las células preincubadas con CDIP-2  $(1.1, \pm 0.06)$  **Fig 5.8**. Para el caso de CCL3  $(1.3, \pm 0.05)$  y con el tratamiento de CDIP-2  $(1.0, \pm 0.04)$ , **Fig 5.8B**, para CCL5  $(1.4, \pm 0.05)$  y con CDIP-2 la migración obtenida fue de  $(1.3, \pm 0.07)$  **Fig 5.8C**. Con la quimiocina CCL24 ( $100\text{ng}/\text{mL}$ ), no se encontraron diferencias significativas **Fig 6.8D**.

Con este mismo tipo de ensayos, se analizó si CDIP-2 presentaba actividad quimioatrayente a diferentes concentraciones ( $1-100\mu\text{g}/\text{mL}$ ), de estos experimentos se concluyó que CDIP-2 no presentó actividad quimioatrayente en eosinófilos murinos derivados de médula ósea a las concentraciones probadas **Fig 5.8E**.

### 5.2.3. Efecto de CDIP-2 en la internalización del receptor CCR3 en eosinófilos

Basados en los resultados obtenidos en los ensayos de quimiotaxis, se indagó por citometría de flujo, si el péptido CDIP-2 internalizaba al receptor CCR3.

En este caso, se utilizaron eosinófilos murinos derivados de médula ósea y mediante citometría de flujo se determinó la internalización de CCR3. Para este ensayo  $2.5 \times 10^5$  células fueron incubadas con CDIP-2 ( $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $45\mu\text{M}$ ) o quimiocinas ( $100\text{ng}/\text{mL}$ ) ( $55\text{nM}$ ) durante 45 min a  $37^\circ\text{C}$ , y se determinó la expresión del receptor en superficie utilizando la intensidad media de fluorescencia (**Fig 5.9**) como medida. Con este método, se encontró que después de la incubación con CCL11 ( $100\text{ng}/\text{mL}$ ) solo el  $(25.6\%, \pm 2.0\%)$  de CCR3 se detectó en la superficie de los eosinófilos, comparado con el  $(56.1\%, \pm 8.3\%)$  del receptor detectado después de la incubación con CDIP-2 ( $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $45\mu\text{M}$ ).

### 5.2.4. Efecto de CDIP-2 en la expresión el gen de CCR3 y $\text{TNF-}\alpha$ , en eosinófilos murinos

Los datos de internalización del receptor CCR3, indican que CDIP-2 tiene actividad de agonista parcial no relacionada con quimiotaxis, liberación de intracelular o forforilación de MAP cinasas, por lo que se decidió investigar la posible regulación de la expresión del ARN mensajero de CCR3, después de la estimulación con CCL11 ( $100\text{ng}/\text{mL}$ ), durante 18 horas en

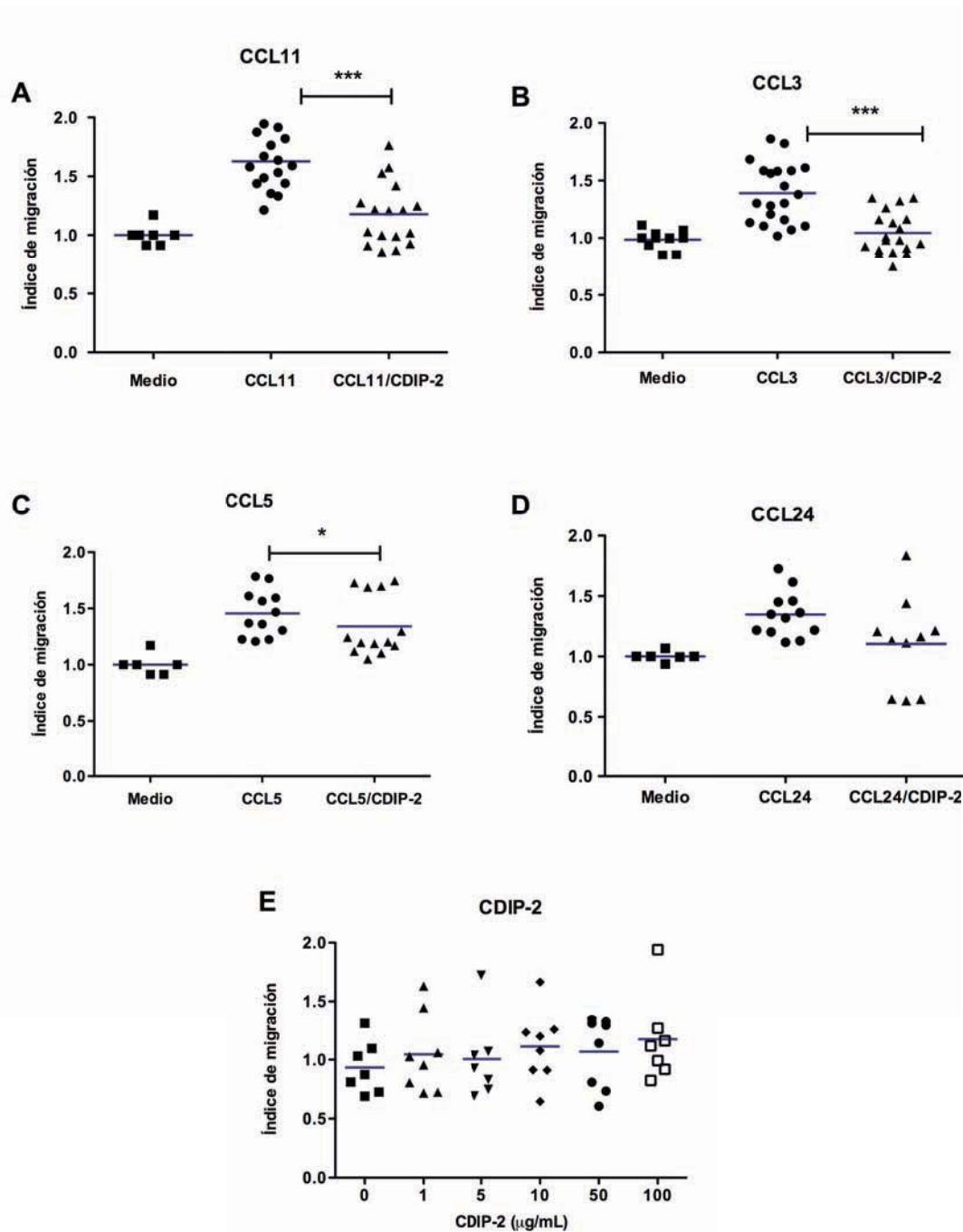
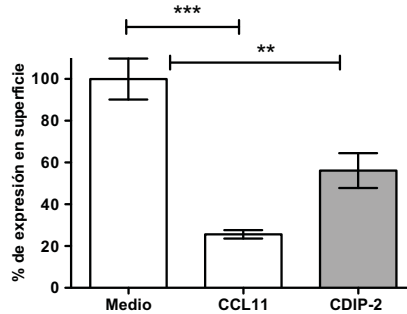


Figura 5.8 Evaluación del efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis inducida por ligandos de CCR3 y CCR1. Eosinófilos murinos derivados de médula ósea se utilizaron en ensayos de quimiotaxis. CDIP-2 (10µg/mL)(4.5µM) reduce significativamente la quimiotaxis inducida por CCL11 (100ng/mL)(55nM) **A**, CCL3 **B**, CCL5 **C**, y no de CCL24 **D**. Diferentes concentraciones de CDIP-2 no inducen quimiotaxis **E**. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\*\*  $p < 0.0001$  y \*  $p < 0.05$ .





**Figura 5.9 Efecto de CDIP-2 en la internalización del receptor CCR3, en eosinófilos murinos.** Eosinófilos derivados de médula ósea, se incubaron durante 45 min con CCL11 (100ng/ml=55nM), CDIP-2 (100µg/mL= 45µM) y se midió por citometría de flujo la intensidad media de fluorescencia dada por el reconocimiento de CCR3. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\*\* p<0.0001 y \*\* p<0.001, n=4.

presencia o ausencia de CDIP-2 (10µg/mL). (**Fig 5.9**). Los datos indican que la presencia de CDIP-2 en el medio, redujo significativamente la expresión del ARN mensajero de CCR3 y TNF-α (**Fig 5.10**). Estos datos indican que la actividad del péptido sobre el receptor CCR3 reguló negativamente la expresión del ARN mensajero del receptor.

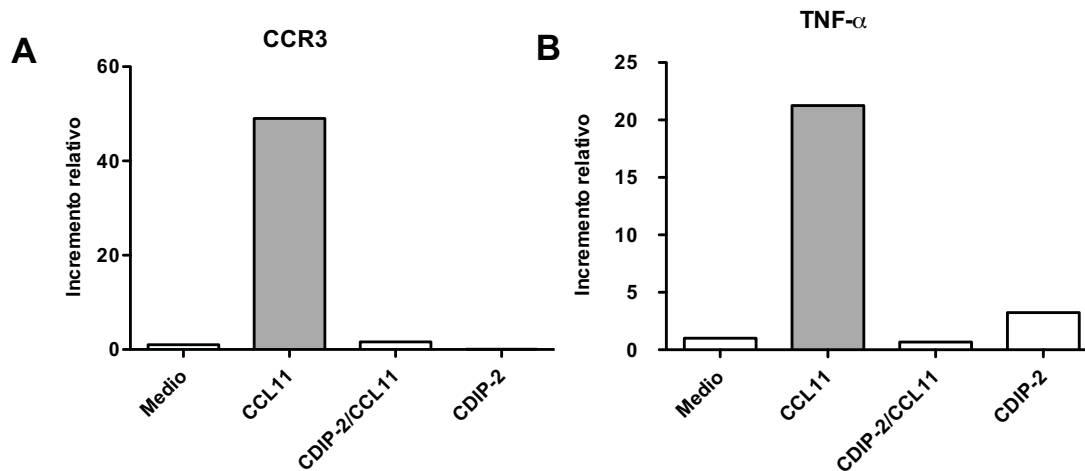
### 5.2.5. Evaluación de la liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> en eosinófilos murinos

El proceso de internalización de CCR3 que se observó con CDIP-2 pudiera relacionarse con la activación del receptor de quimiocina, por lo que se investigó si el péptido inducía la liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> o modificaba la liberación de este segundo mensajero. En este ensayo los cambios de Ca<sup>2+</sup> intracelular se midieron por citometría de flujo y el dato se presenta como la relación de fluorescencia obtenida de los canales FL1H/FL3H del citómetro de flujo.

Los eosinófilos se tiñeron con los colorantes intracelulares, tal como se indicó en métodos. Se probaron estímulos con CCL11(100ng/mL) y diversas concentraciones de CDIP-2 (1-100 µg/mL)(**Fig 5.11**).

Los agonistas como CCL11 aumentaron significativamente la liberación de Ca<sup>2+</sup> de 1.7, +/-0.1, mientras que las células estimuladas con CDIP-2(100 µg/mL) previo a un estímulo de CCL11(100ng/mL) 1.4, +/- 0.07 (**Fig 5.11**) lo que representó un decremento significativo en la señal medida en presencia de CDIP-2.

También, se probó si CDIP-2 (100µg/mL) presentaba actividad agonista relacionada con liberación de Ca<sup>2+</sup>. El resultado mostró que CDIP-2 no modificó significativamente la señal basal del segundo mensajero (1.3, +/- 0.07).



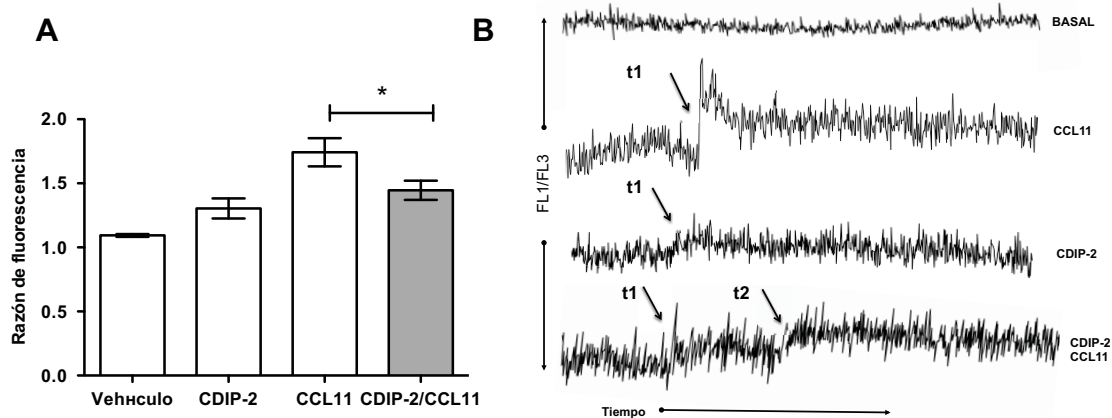
**Figura 5.10** evaluación del ARN mensajero de CCR3 y TNF- $\alpha$  en eosinófilos. Un millón de células fueron estimuladas en presencia o ausencia de CDIP-2 (10 $\mu$ g/mL) y CCL11 (100ng/mL) durante 18 horas en medio RPMI sin suero, posterior a este tiempo se analizó la expresión del ARN mensajero de CCR3 por RT-PCR y el de TNF- $\alpha$  en relación con el ARN de actina. Se muestra un experimento representativo de una n=4.

### 5.2.6. Fosforilación de las MAP cinasas: Erk y p38, en eosinófilos murinos incubados con CDIP-2

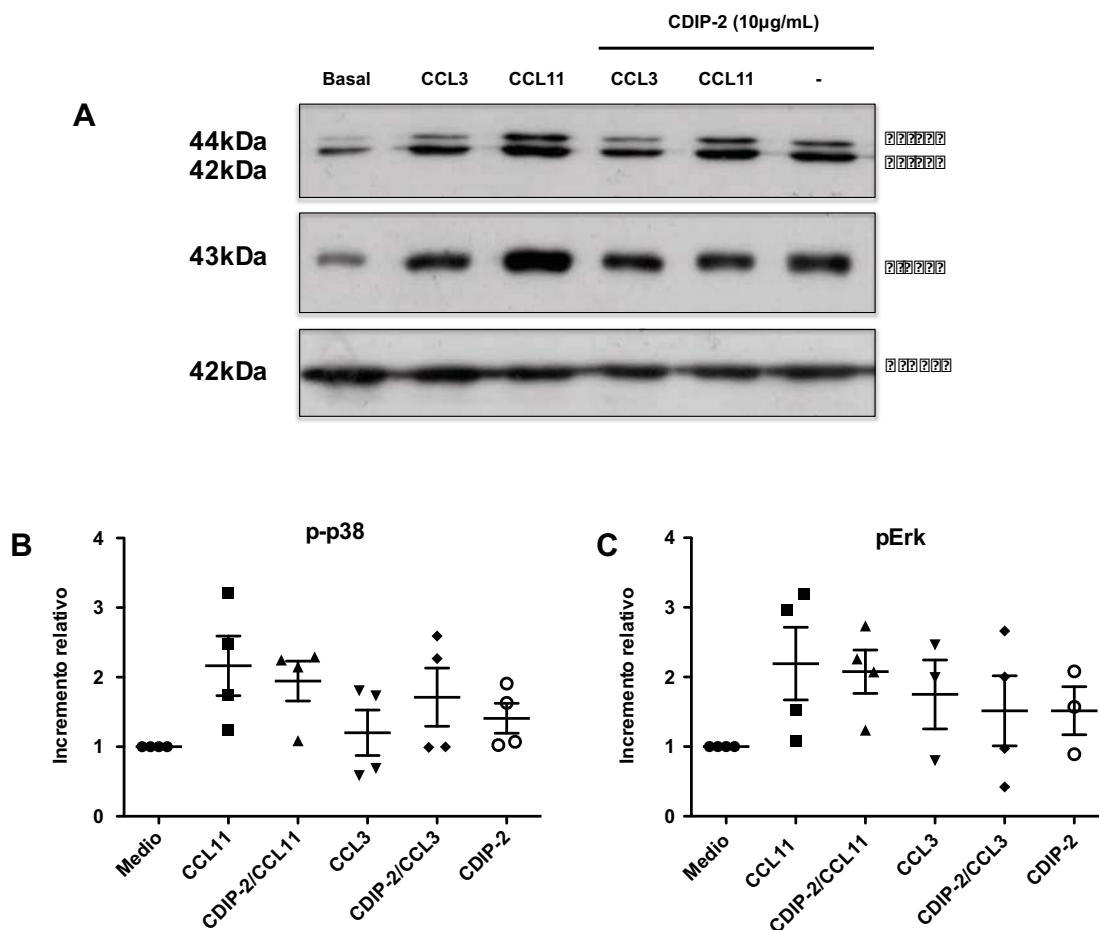
Con la finalidad de investigar si CDIP-2 podía modular la fosforilación de algunas MAP cinasa ligadas a los procesos de migración celular dependientes de CCL11, se evaluó por WB la fosforilación de las cinasas Erk1/2 y p38 en lisados totales obtenidos de eosinófilos murinos estimulados en diferentes condiciones.

Para los ensayos de WB, los eosinófilos se estimularon con CCL11, CCL3 (100ng/mL) o CDIP-2 (10 $\mu$ g/mL), otras muestras fueron incubadas con el péptido CDIP-2 (10 $\mu$ g/mL) previo al estímulo con alguna de las quimiocinas mencionadas (**Fig 5.12**).

Los datos mostraron que el péptido no indujo la fosforilación de las MAP cinasas analizadas y tampoco disminuyó la fosforilación inducida por 100ng/mL de CCL11 o CCL3, estos datos indicaron que la reducción en la quimiotaxis en presencia de CDIP-2 en estas células, es independiente de la activación de proteínas como Erk1/2 y p38. Aunque se observa una tendencia a la activación, no clara debida a la dispersión de los datos



**Figura 5.11 Evaluación de la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en eosinófilos.** Eosinófilos murinos de médula ósea se tiñeron con Fluo-3 y Fura-red para determinar los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, representado como la razón de la fluorescencia obtenidas de FL1H/FL3H. Los datos se analizaron con la plataforma kinetics del software FlowJo 8.7. **A.** CDIP-2 ( $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no induce cambios significativos en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pero reduce el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular liberado por un estímulo de  $100\text{ng}/\text{mL}$  de CCL11. **B.** Figura representativas de las graficas obtenidas del análisis, ( $t_1=200\text{s}$ ,  $t_2=400\text{s}$ ). Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $n=5$ . Las barras corresponden al  $\pm$  el error estándar  $*p<0.05$ .



**Figura 5.12 Estudio de la fosforilación de Erk1/2 y p38.** Eosinófilos murinos derivados de médula ósea ( $1 \times 10^6$ ) se estimularon 5 minutos con 100ng/mL de CCL11 o CCL13, 10µg/mL de CDIP-2 o se incubaron previo al estímulo con la quimiocina con 10µg/mL de CDIP-2, las células se lisaron y los extractos de proteína total se analizaron en geles desnaturalizantes de acrilamida al 10%. **A.** Fotografía representativa del WB obtenido. **B.** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los diversos experimentos, utilizando las bandas de beta actina, como control de carga para normalizar.

### 5.3. Evaluación del efecto de CDIP-2 en el receptor hCCR3

Con el objetivo de estudiar el efecto del péptido CDIP-2, en el receptor humano CCR3, se utilizaron células CHO transfectadas establemente con este receptor; aunque en los eosinófilos murinos se observó un efecto claro sobre CCR3, estas células también expresan otros receptores de quimiocina como CCR1, por lo que el sistema de células transfectadas que no expresan de forma endógena receptores de quimiocina, nos permitió estudiar el efecto de CDIP-2 en el receptor hCCR3 de forma aislada.

Para la transfección se utilizó un plásmido como vector (Apéndice). Las clonas transfectadas con mayor expresión, se separaron en el citómetro Facs Aria. Con estas células se realizaron diversos ensayos, y se verificó en cada experimento la expresión del receptor por citometría de flujo (**Fig 5.13C**).

#### 5.3.1. Evaluación del efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis mediada por el receptor hCCR3

Los experimentos realizados para probar el efecto de CDIP-2, en la quimiotaxis producidas por hCCL11 y CCL13, demostraron que al igual que en el receptor murino, CDIP-2 ( $10\mu\text{g/mL}$ ) redujo la quimiotaxis inducida por CCL11 y CCL13 ( $100\text{ng/mL}$ ), este dato se muestra en la **Fig 5.13**, como porcentaje de inhibición en la quimiotaxis con respecto a la migración obtenida con el agonista; teniendo para CCL13 ( $36.6, \pm 4.7\%$ ) y para CCL11 ( $54.8, \pm 5.462\%$ ) como porcentaje de inhibición.

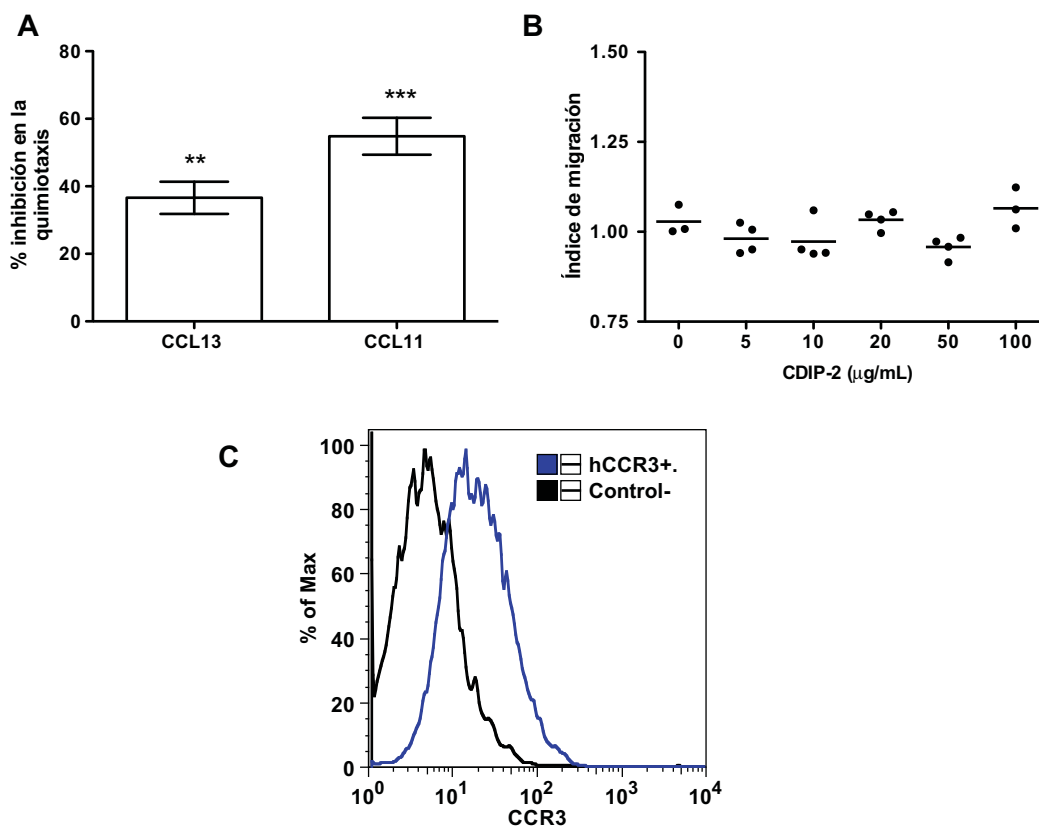
Para el caso de CCL13, datos previos publicados indicaron que CDIP-2 disminuyó la quimiotaxis provocada por CCL13 en monocitos humanos THP-1 [110], por lo que este dato es la primera evidencia experimental del efecto del péptido CDIP-2 sobre la quimiotaxis debida a CCL13 através del receptor CCR3.

Adicionalmente, se determinó si el péptido CDIP-2 presentaba efecto agonista sobre la quimiotaxis en el receptor CCR3 (**Fig 5.13B**), los resultados indicaron que CDIP-2 no produjo quimiotaxis en las células CHO transfectadas con el receptor humano ( $5\text{-}100\mu\text{g/mL}$ ).

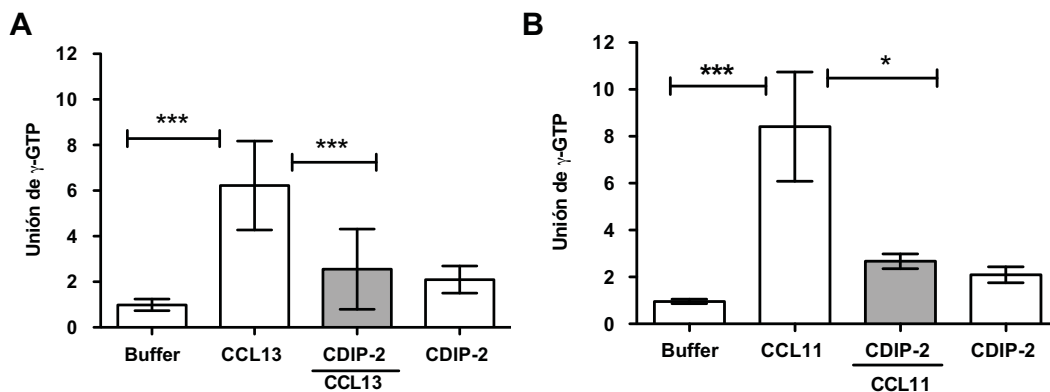
#### 5.3.2. Evaluación de la disociación de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ,

Para estudiar otro efecto ligado a la activación del receptor de quimiocina, se cuantificó la asociación de la molécula  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , que es un análogo no hidrolizable del guanosín trifosfato (GTP). Este método nos indica la asociación del GTP a la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G. Para este ensayo se purificaron las membranas de células CHO transfectadas con hCCR3 y sin transfectar (como se indicó en métodos). Se determinó la unión de  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  a los complejos de membrana en respuesta a los estímulos de quimiocinas y péptidos derivados de CCL13.

Se realizaron curvas dosis-respuesta de quimiocinas y péptido; concluyendo que las células no transfectadas no respondieron al estímulo de ninguna de las dos quimiocinas (CCL11 y



**Figura 5.13 Evaluación del efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis dada por la activación de CCR3** **A.** Inhibición en la quimiotaxis a través de hCCR3, producida por CDIP-2 (10 μg/mL) en células CHO transfectadas establemente con el receptor hCCR3. **B.** CDIP-2 (5-100 μg/mL) no posee efectos quimioatrayentes vía el receptor humano CCR3. **C.** Expresión del receptor humano CCR3 en células CHO establemente transfectadas. Determinación por citometría de flujo de la expresión del receptor hCCR3, se muestra una gráfica de puntos representativa y un histograma de las células teñidas (histograma azul), comparado con las células sin tinción (histograma negro) para el receptor CCR3. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\*p<0.001,\*\*\*p<0.0001 comparadas con el control sin péptido, n=4.



**Figura 5.14 Evaluación de la asociación de  $GTP\gamma S$  en el receptor hCCR3.** Membranas extraídas de células CHO transfectadas con CCR3 se sometieron a diferentes estímulos para determinar la asociación del análogo del GTP producida por **A.** CCL13 (10ng/mL) y **B.** CCL11 (10ng/mL). Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al  $\pm$  error estándar \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

CCL13) o CDIP-2, ya que no se observó asociación de  $GTP\gamma S$  a las concentraciones probadas (10-150 $\mu g/mL$ ).

En otra serie de ensayos, que tuvieron como fin evaluar el efecto de CDIP-2 en la asociación de  $GTP\gamma S$  a través de CCR3, se incubaron los extractos de membranas con diferentes concentraciones de CDIP-2 previo al estímulo con las quimiocinas, en la **Fig 5.14** solo se muestra la concentración de 100 $\mu g/mL$  de CDIP-2 la cual redujo significativamente la unión de  $GTP\gamma S$  debida a CCL13 (10ng/mL) (6.2,  $\pm$  0.6), CCL13/CDIP-2 (2.5,  $\pm$  0.6), mientras que para CCL11 (10ng/mL) (8.4,  $\pm$  2.3), CCL11/CDIP-2 (2.6,  $\pm$  0.3). Los datos se representan como unión de  $GTP\gamma S$ , índice que se determinó mediante la normalización de los datos de las cuentas por minuto obtenidas.

Adicionalmente, se estudió si CDIP-2 presentaba efectos agonistas en la asociación de  $GTP\gamma S$  (2.0,  $\pm$  0.3) en el receptor humano CCR3 (**Fig 5.14**). Los datos encontrados con los experimentos de unión de  $GTP\gamma S$ , resultan una evidencia clara sobre el efecto directo del péptido CDIP-2 en el receptor de quimiocina CCR3 y la interferencia que este produce en las señales dadas por los ligandos naturales CCL13 y CCL11.

### 5.3.3. Efecto de CDIP-2 en la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular debida a la activación del receptor hCCR3

Una vez determinado el efecto de CDIP-2 sobre la activación de proteínas G, se midió el posible efecto en la activación de otras señales intracelulares como la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este segundo mensajero se libera de forma intracelular, después de la disociación del heterotrímero de proteínas G.

La determinación de cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  en las células CHO transfectadas se determinó por citometría de flujo. En estos ensayos se probaron estímulos de quimiocinas como CCL11 (500ng/mL), CCL13 (500ng/mL) y diversas concentraciones de CDIP-2 (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Todas las quimiocinas mencionadas produjeron aumento significativos en la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Fig 5.15**). En otra serie de experimentos, donde las células fueron primero estimuladas con CDIP-2 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) al tiempo de 200s en el citómetro y posteriormente se adicionó el estímulo de la quimiocina a los 400s; se determinó el efecto de CDIP-2 sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado en respuesta a las quimiocinas. Los datos se representaron graficamente, como la razón de fluorescencias (FL1H/FL3H) obtenidas en el citómetro de flujo. Para el caso de CCL11, la razón fue de (1.4, +/- 0.07), mientras que para las células tratadas con CDIP-2 y posteriormente estimuladas con CCL11 (1.0, +/- 0.05) lo cual resultó estadísticamente significativo, mientras que para CCL13 (1.3,+/- 0.03) no se observó diferencia en presencia de CDIP-2 (1.2, +/- 0.04).

Con los ensayos descritos, también se probó que CDIP-2 no activó la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el receptor CCR3 (1.1, +/- 0.02) con respecto a la señal basal (1.0, +/- 0.02); aunque este péptido interfirió directamente con la activación de proteínas G, quimiotaxis o  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por los principales ligandos, de CCR3.

### 5.3.4. Efecto de CDIP-2 en la internalización del receptor CCR3

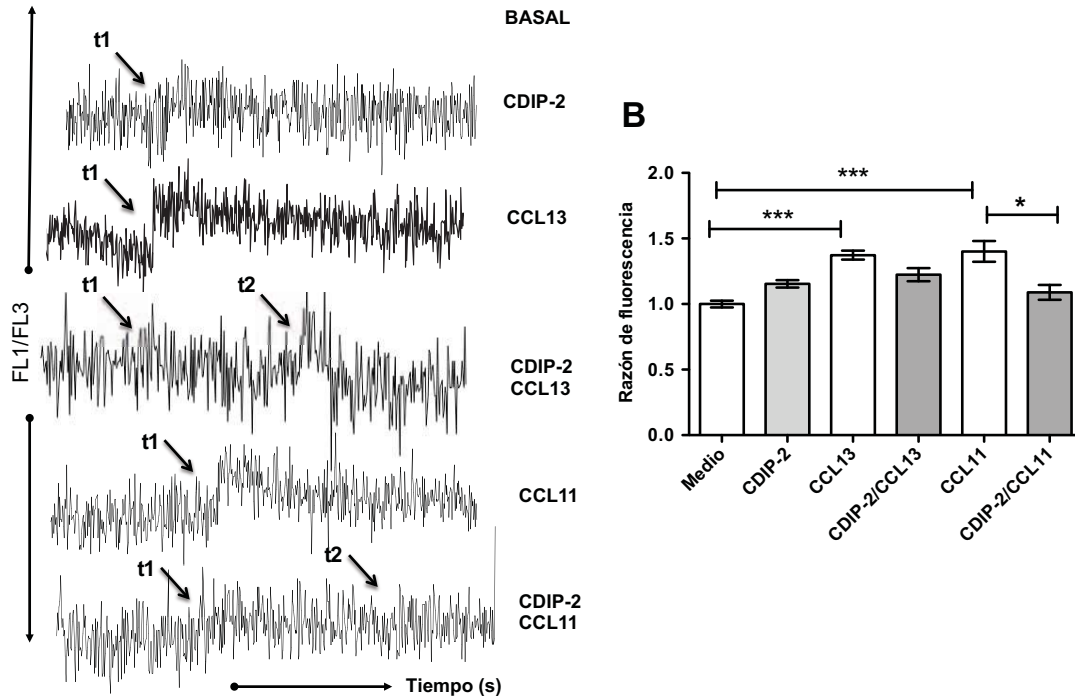
Retomando los resultados observados con los eosinófilos murinos, se estudió la posible internalización del receptor humano CCR3, utilizando el sistema de células transfectadas.

Por citometría de flujo, se determinó que las células incubadas con CDIP-2 reducian la expresión extracelular del receptor CCR3 (77.1, +/-3.6 %), mientras que las células incubadas con CCL13 la expresión fue (65.0, +/- 8.2 %), este resultado mostró que el péptido internalizó al receptor humano CCR3 (**Fig 5.15**).

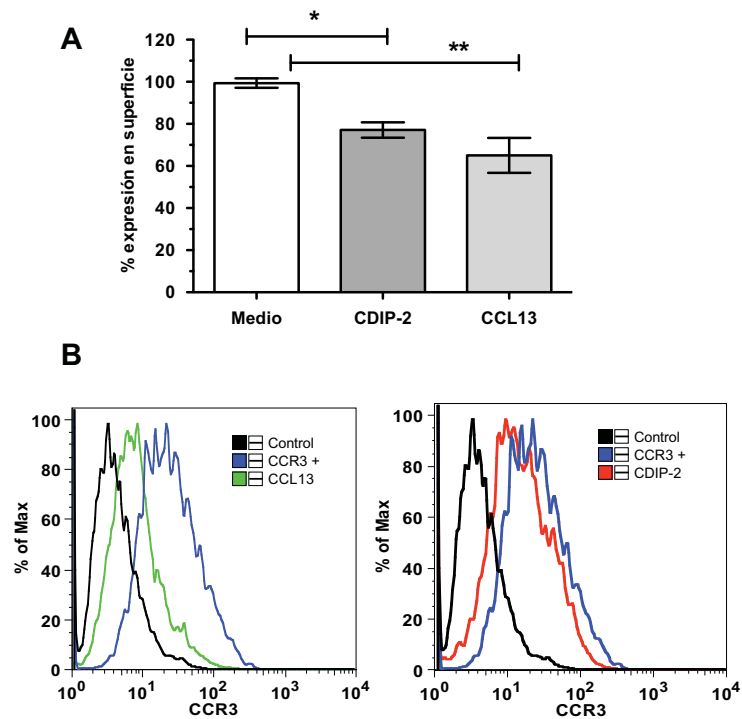
## CDIP-2 en la activación de los receptores humanos CCR1 y CCR2

Se estudió el posible efecto modulador de CDIP-2, en la activación de los receptores CCR1 y CCR2. Estos receptores se activan por quimiocinas como CCL13 y como se describió anteriormente CDIP-2 modula la quimiotaxis inducida por esa quimiocina [110].





**Figura 5.15 Evaluación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el receptor hCCR3.** Células se tiñeron con Fluo-3 y Fura-red para determinar los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular representado como la razón entre las fluorescencias obtenidas en el canal FL1H y FL3H analizadas con la plataforma kinetics del software FlowJo. **A.** CDIP-2 ( $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no induce cambios significativos en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pero reduce el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular liberado inducido por  $500\text{ng}/\text{mL}$  de CCL13. **B.** Figura representativa del análisis de citometría de flujo, donde las flechas indican el momento en el cual se agregó el estímulo ( $t_1=200\text{s}$ ,  $t_2=400\text{s}$  aproximadamente). Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al  $\pm$  el error estándar \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.0001$ .



**Figura 5.16 Estudio de la internalización del receptor CCR3.** **A.** Células CHO transfectadas con hCCR3, se incubaron 45 min con CCL11 y CCL13 (100ng/ml), CDIP-2 (100 $\mu$ g/mL) o medio DMEM sin suero, posteriormente las células se lavaron 2 veces y se determinó por citometría de flujo la intensidad media de fluorescencia dada por el reconocimiento de CCR3. **B.** Histogramas representativos de los experimentos realizados. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al  $\pm$  error estándar \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ,  $n = 5$ .

### 5.3.5. Internalización de CCR1 y CCR2 producida por CDIP-2

Para evaluar la internalización de los receptores hCCR1 y hCCR2, se realizaron ensayos con células THP-1. Las células se incubaron con diferentes concentraciones del péptido (10-100 $\mu$ g/mL) y se midió el % de receptor internalizado después de 45 min de incubación, por citometría de flujo. En la gráfica de la **Fig 5.17** se muestra la concentración de 100 $\mu$ g/mL de CDIP-2 y de 100ng/mL de las quimiocinas CCL13, CCL5, CCL2 utilizadas como controles positivos de internalización mientras que CXCL12 y su receptor hCXCR4 como controles negativos.

Los datos mostraron que la incubación con el péptido modificó significativamente la detección del receptor, siendo este efecto mas marcado para hCCR1 donde después de la incubación con CCL13 solo el (53.1, +/- 7.5 %) de receptor se detectó, mientras que en las células incubadas con CDIP-2 (8.6, +/- 2.8 %), este resultado demostró el efecto directo sobre el receptor hCCR1, ya que el péptido al igual que las quimiocinas, redujo el receptor de la superficie celular de los monocitos.

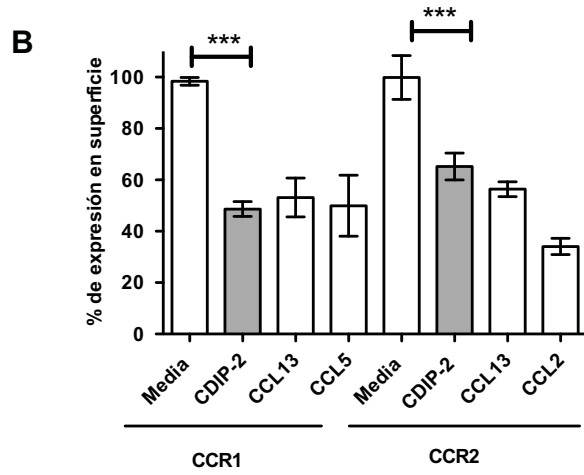
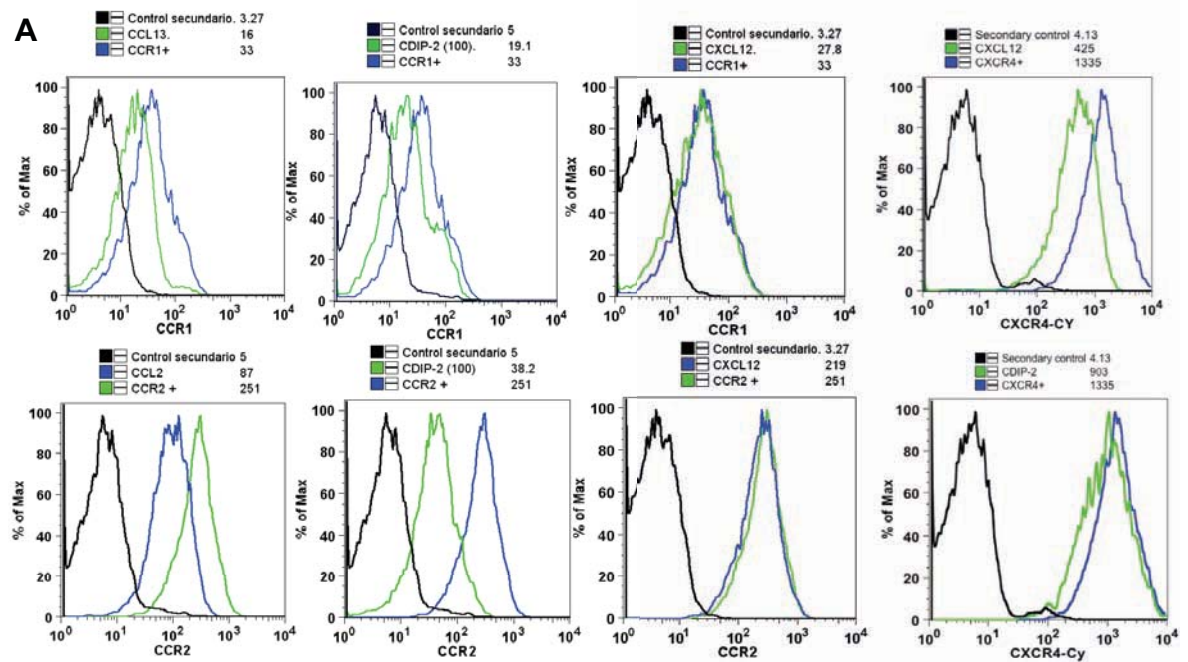
Para el caso de hCCR2 se obtuvo una expresión de (65.2, +/- 5.2%) mientras que los ligandos del receptor CCL2 (34.0, +/-3.172 %) y para CCL13 (56.3, +/-2.9%) después del tiempo de incubación, los resultados mostraron que ambas quimiocinas y CDIP-2 modifican la detección extracelular del receptor CCR2, teniendo el mayor efecto con CCL2, principal ligando de ese receptor.

## 5.4. Efecto de CDIP-2 sobre la quimiotaxis inducida por ligandos de hCCR1 y hCCR2.

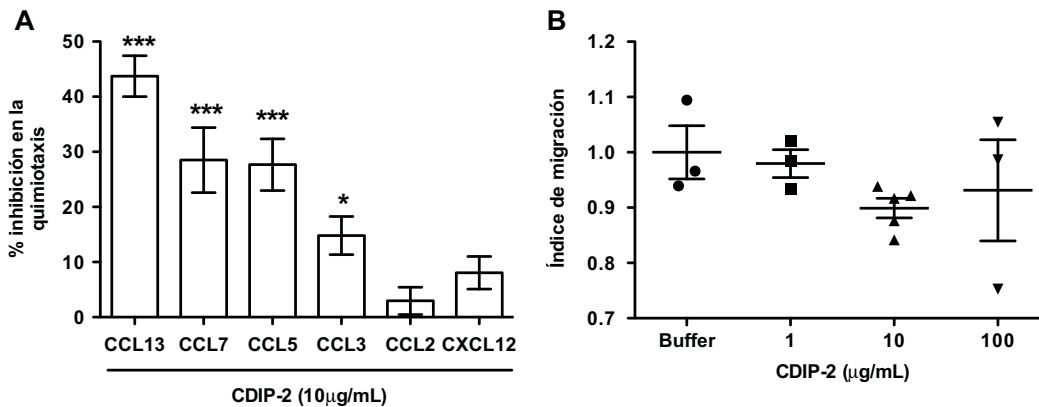
Previamente se describió que el péptido CDIP-2 redujó la quimiotaxis producida por CCL13 en células THP-1 [110]; sin embargo, no se encontraron efectos en la quimiotaxis producida por CCL2 y otras quimiocinas como CCL7. Con el mismo objetivo, se utilizaron ensayos de quimiotaxis con células mononucleares de sangre periférica humana; para medir la actividad del péptido. Para los ensayos, un grupo de células se incubó con CDIP-2 antes de ser colocadas en las cámaras de quimiotaxis; donde se adicionaron los estímulos de los quimioatrayentes ligandos de CCR1( CCL13, CCL3) y de CCR2 (CCL2, CCL7 y CCL13) (**Fig 5.18**).

Al igual que lo observado con las células THP-1, CDIP-2(10 $\mu$ g/mL) moduló la quimiotaxis producida por 100ng/mL de CCL13 (43.7, +/- 3.7%), para CCL7 (28.5,+/- 5.8%), para CCL5 (27.6,+/- 4.6 %), para (14.8, +/- 3.4%) con respecto al índice de migración dado por los agonistas. No se observaron cambios significativos en la quimiotaxis provocada por CCL2 o CXCL12 (100ng/mL).

Adicionalmente, se indagó si CDIP-2 tenia efectos de quimioatrayente en células mononucleares humanas, pero no se encontró efecto agonista en la migración a las diferentes concentraciones probadas (**Fig 5.18B**).



**Figura 5.17** Estudio de la internalización de los receptores CCR2 y CCR1.. Células THP-1, se incubaron 45 min con CCL13, CCL2, CXCL12 (100ng/ml), medio o CDIP-2 (100µg/mL), posteriormente las células se lavaron 2 veces y se determinó por citometría de flujo la intensidad media de fluorescencia dada por el reconocimiento de los receptores CCR1 y CCR2. **A**. Histogramas representativos de los experimentos realizados. **B**. En la gráfica se muestra el resumen de los experimentos. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\*\* p<0.0001.



**Figura 5.18 Evaluación del efecto del péptido CDIP-2 en la quimiotaxis dada por ligandos de los receptores CCR1 y CCR2** **A.** Células mononucleares aisladas de pacientes sanos se separaron de sangre periférica con un gradiente de Ficoll y se preincubaron con CDIP-2 (10µg/mL) antes de ser colocadas en la cámara de quimiotaxis sobre los estímulos de las diversas quimiocinas (100ng/mL). **B.** CDIP-2 no induce quimiotaxis en PBMCs. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden a la medida del +/- error estándar \*\*\* p<0.0001, \*\* p<0.001 y \*p<0.05, con respecto al 100 % dado por el agonista.

#### 5.4.1. Actividad del péptido CDIP-2 en el receptor humano CCR1

Con el objetivo de estudiar en un sistema aislado el efecto del péptido CDIP-2, se transfectaron células CHO con un vector plasmídico que contiene el inserto del gen humano de CCR1, teniendo en consideración que CCR1 es uno de los principales receptores junto con CCR3 relacionados con la respuesta eosinófilica en el asma.

#### 5.4.2. CDIP-2 induce asociación de GTP en el receptor CCR1

Con las células CHO transfectadas con CCR1 se realizaron ensayos para medir la activación del receptor de quimiocina. Para este ensayo, se purificaron las membranas de células CHO transfectadas con hCCR1 y sin transfectar. De los extractos se colocó la misma cantidad de proteína en cada pozo y se siguió el protocolo para determinar la asociación de GTPγS a los complejos de membrana en respuesta a los estímulos de quimiocinas y péptidos derivados de CCL13.

Se realizaron curvas dosis respuesta con los ligandos y el péptido; concluyendo que las células sin transfectar no respondieron al estímulo de CCL3 y CCL13, para el caso de CDIP-2 no se midió asociación significativa de GTP a las concentraciones probadas (10-150µg/mL).

En otra serie de ensayos, se incubaron los extractos de membranas con diferentes concentraciones de CDIP-2 previo al estímulo con las quimiocinas (como se indica en métodos), con

la finalidad de estudiar si la presencia del péptido podría modificar la asociación del GTP $\gamma$ S.

En la gráfica solo se muestra la concentración de 100 $\mu$ g/mL, concentración a la cual se observó reducción significativa de la unión de GTP $\gamma$ S dada por CCL13 (10ng/mL) (4.3,+/-0.5) (**Fig 5.19A**) y no para los otros ligandos de CCR1 probados (**Fig 5.19**).

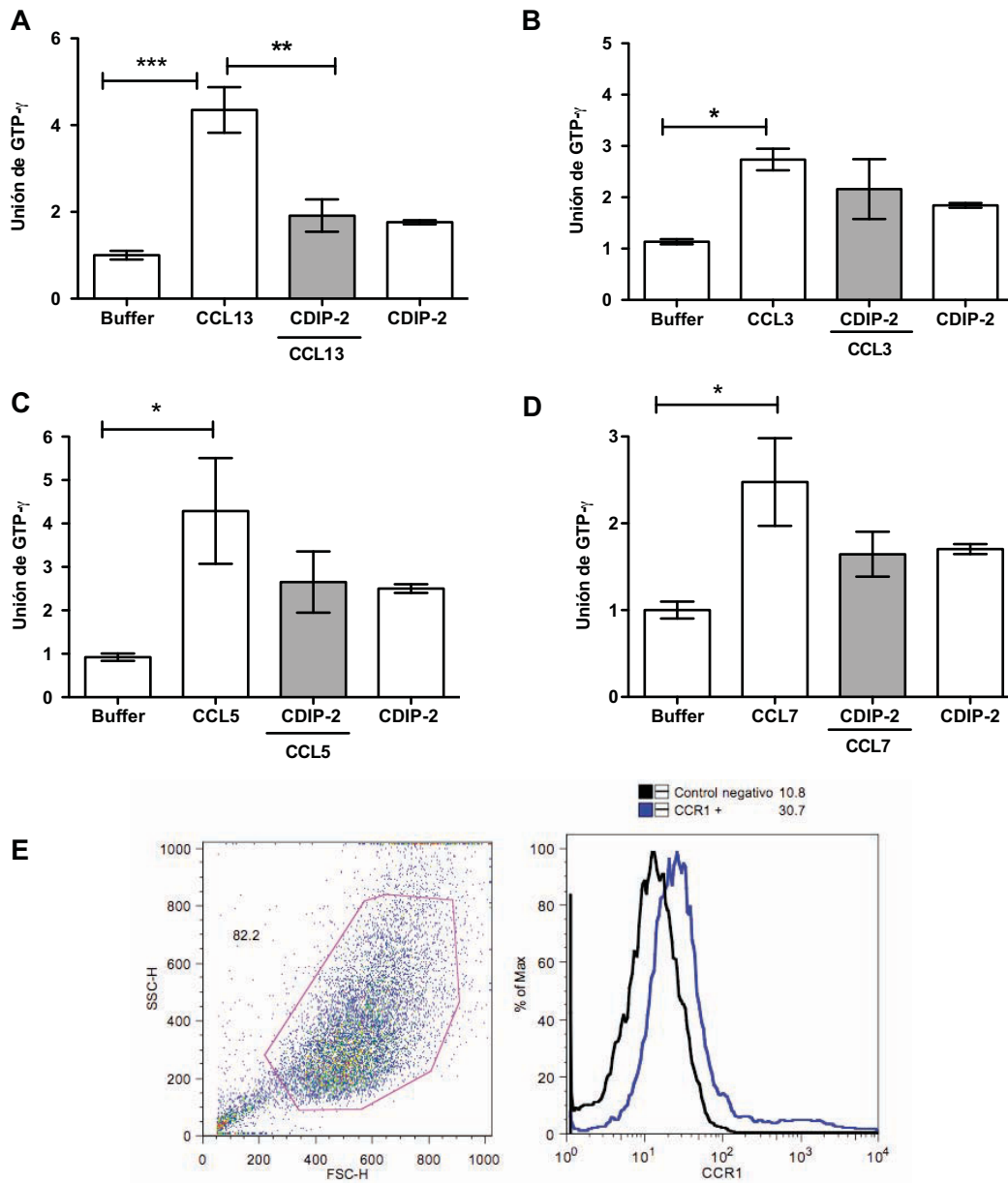
#### **5.4.3. Efecto del péptido CDIP-2 en la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular debida a la activación de CCR1**

Adicionalmente al estudio de la disociación de las proteínas G, se investigó la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular en las células CHO transfectadas con el receptor hCCR1. Se probaron estímulos de quimiocinas como CCL3 (500ng/mL), CCL13 (500ng/mL) y diversas concentraciones de CDIP-2 (1-100 $\mu$ g/mL). Todas las quimiocinas mencionadas produjeron aumento significativo en la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular. En otra serie de experimentos, se determinó el efecto de CDIP-2 sobre el Ca<sup>2+</sup> liberado en respuesta a las quimiocinas; las células fueron primero estimuladas con CDIP-2 (100 $\mu$ g/mL) al tiempo de 200s de captura en el citómetro y posteriormente se adicionó el estímulo de la quimiocina a los 400s, (**Fig 5.28**). En este caso no se observó diferencia significativa en las muestras preincubadas con CDIP-2 comparadas con las respuestas obtenidas con los ligandos. Sin embargo, el péptido por si solo aumento la incorporación basal de Ca<sup>2+</sup>, pero esta activación no pareció estar relacionada con inducción de la migración vía CCR1 como se demostró en las células THP-1 [110] y PBMCs.

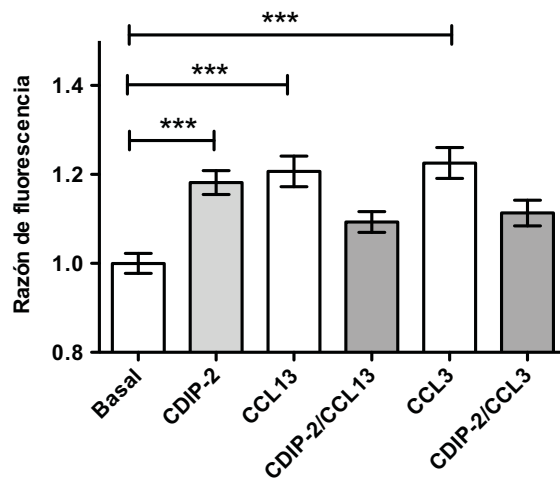
#### **5.4.4. Ensayos realizados con el receptor CCR2**

Como se describió anteriormente, el péptido CDIP-2 no redujo la quimiotaxis producida por el principal ligando de CCR2; CCL2 (100ng/mL) en monocitos THP-1[110] o en PBMCs, pero si la quimiotaxis inducida por CCL13, ligando de CCR2; sin embargo, en los sistemas celulares mencionados CCL13 puede activar diversos receptores de quimiocina entre los que destacan CCR1 y CCR2, por lo que con esos sistemas no fue posible disectar si la reducción en la quimiotaxis por CDIP-2 era debida por alguno de los receptores o ambos.

Para investigar el mismo fenómeno, pero de forma aislada, se realizaron ensayos con células CHO establemete transfectadas con el receptor humano CCR2 utilizando como vector un plásmido (Apéndice).

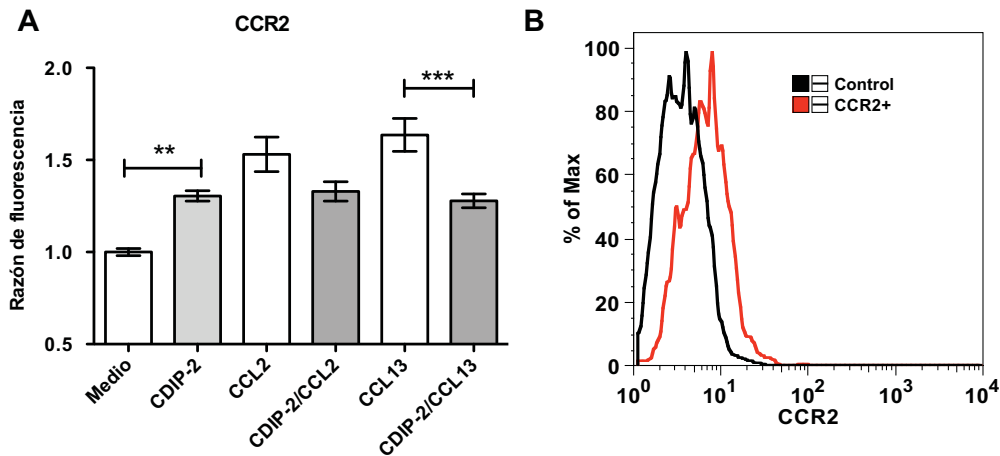


**Figura 5.19** Efecto del péptido CDIP-2 en la asociación de GTP $\gamma$ S producida por ligandos de CCR1. Membranas extraídas de células CHO transfectadas con CCR1 se sometieron a diferentes estímulos para determinar la incorporación del análogo del GTP $\gamma$ S. **A.** CCL13, **B.** CCL3, **C.** CCL5 y **D.** CCL7. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **E.** Expresión del receptor hCCR1 en células CHO establemente transfectadas. Las barras corresponden al +/- error estándar \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .



**Figura 5.20 Efecto de CDIP-2 en la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en el receptor hCCR1.** Las células CHO se tiñeron con Fluo-3 y Fura-red para determinar los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  representado como la proporción entre las fluorescencias obtenidas en el canal FL1H y FL3H analizadas con la plataforma kinetics del software Flowjo. CDIP-2 ( $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no induce cambios significativos en el  $\text{Ca}^{2+}$ , pero reduce el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por  $500\text{ng}/\text{mL}$  de las quimiocinas. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al +/- error estándar \*\*\*  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.05$





**Figura 5.21** Efecto de CDIP-2 en la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en el receptor hCCR2. Las células se tiñeron con Fluo-3 y Fura-red para determinar los cambios de intracelular representado como la razón entre de las fluorescencias obtenidas en el canal FL1H y FL3H analizadas con la plataforma Kinetics del software FlowJo. **A.** CDIP-2 ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), reduce el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado, inducido por  $500\text{ng}/\text{mL}$  de CCL13 y aumentó la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$ . **B.** Expresión del receptor en las células CHO transfectadas. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las barras corresponden al  $\pm$  error estándar \*\*\*  $p < 0.0001$  y \*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ .

#### 5.4.5. Efecto de CDIP-2 en la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ en el receptor CCR2

La determinación de cambios en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , en las células CHO transfectadas con CCR2, se midió por citometría de flujo. Se probaron estímulos de quimiocinas como CCL2 ( $500\text{ng}/\text{mL}$ ), CCL13 ( $500\text{ng}/\text{mL}$ ) y diversas concentraciones de CDIP-2 ( $1-100\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las quimiocinas mencionadas aumentaron significativamente la liberación intracelular del segundo mensajero. En otra serie de experimentos las células fueron primero estimuladas con CDIP-2 ( $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) al tiempo de 200s de adquisición en el citómetro y posteriormente se adicionó el estímulo de la quimiocina a los 400s y se determinó el efecto de CDIP-2 sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado en respuesta a las quimiocinas. Los datos indican que CDIP-2 modificó la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células transfectas con el receptor humano CCR2 ( $1.3$ ,  $\pm 0.02$ ) con respecto a las células sin estímulo ( $1.0$ ,  $\pm 0.01$ ). Adicionalmente se encontró diferencia entre los grupos estimulados con CCL13 ( $1.6$ ,  $\pm 0.08$ ) con respecto a la respuesta obtenida con CCL13, cuando las células fueron estimuladas previamente con CDIP-2 ( $1.2$ ,  $\pm 0.03$ ). Los datos se aprecian en la **Fig 5.21**.

## 6 Discusión

El estudio internacional de asma y alergia (ISAAC) reportó para México una prevalencia de 6.6 % de asma en el 2009 [112]. Por entidad federativa, los estados de Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Tamaulipas, presentan la tasas mas altas de asma desde 1998. El asma se posiciona en México dentro de las 20 principales patologías causantes de morbilidad, su posición fluctúa entre el sitio 10-14, siendo los mas afectados los niños menores de 4 años y las personas mayores de 65 años [112].

En este trabajo se estudio, como el péptido CDIP-2 derivado de la quimiocina CCL13, regula la respuesta inflamatoria, reduciendo el infiltrado celular y la disminución de la liberación de algunos mediadores relacionados con la respuesta alérgica utilizando un modelo murino de IAP. También se investigó el efecto del péptido sobre la activación de los receptores CCR1, CCR2 y CCR3.

Los péptidos presentan varios obstáculos en cuanto a su uso como fármacos, como la degradación enzimática, una vida plasmática corta e inestabilidad fisicoquímica que puede hacerlos susceptibles a degradación [116]. La estabilidad de los péptidos mejora cuando estos se dimerizan o ciclizan, por ejemplo péptidos que se unen a los receptores CXCR4 y CCR2 [117]. Los péptidos también son suceptibles a la unión inespecífica a proteínas plasmáticas, por lo que en el caso de péptidos como CDIP-2 la vía de administración resulta una estrategia importante para aumentar la disponibilidad, en este sentido las vías pulmonar y transdermica parecen ser las más adecuadas para aumentar la biodisponibilidad de fármacos peptídicos [116]. En este trabajo solo se exploró el efecto del péptido por vía intratraqueal aunque algunos estudios realizados indican que la vida media del péptido en circulación no supera los 15 minutos (dato no mostrado), por lo que sería importante mejorar la estabilidad de este péptido, mediante la generación de reto-enantiómeros (péptidos con D aminoácidos), la ciclización o la utilización de vehículos que aumenten la vida media del péptido en circulación.

Aunque en el presente trabajo, no se estudiaron las propiedades físico químicas o el análisis de la estructura del péptido CDIP-2, es importante discutir algunos puntos con respecto a las características de la secuencia y su posible relación con la actividad biológica mostrada.

Los péptidos tienen ventajas como la especificidad de unión a receptores y la capacidad de adquirir varias estructuras terciarias [118]. En el caso de las quimiocinas, los péptidos pueden unirse a diversos receptores y tener actividades diferenciales de agonistas parciales o antagonistas en diversos sistemas celulares, lo que les confiere un espectro mas amplio de acción comparado con antagonistas específicos en procesos complejos como el asma.

El péptido CDIP-2 posee 19 aminoácidos, correspondientes a la sección del aminoácido 19-37 de la secuencia de la proteína CCL13 madura (19-*KISLQRLKSYVITTSRCPQ*-37); esta sección de la proteína tiene una carga neta de 4<sup>+</sup> a pH 7.4, dada por los aminoácidos K19, R24, K26 y R34 algunos de los cuales se conservan en las quimiocinas MCP y CCL11 en humano y ratón como es el caso de la R24 la cual se ha descrito como un aminoácido crucial en CCL2 para la activación de CCR2 al igual que la K35 y K38 [21]. En CCL13, la R34 y K26 representa a los aminoácidos cargados en esta sección y están presentes en la secuencia de CDIP-2, lo que podría compararse a lo encontrado en la quimiocina CCL2; donde dichos aminoácidos se requieren para la activación de su receptor CCR2. Sin embargo, existen pruebas experimentales con CCL13 que pudieran reforzar la importancia de esos aminoácidos positivos para activar algún receptor de quimiocina. En CXCR4, por ejemplo, diversos péptidos antagonistas, utilizados principalmente para reducir la infección de VIH; se ha probado que la cationicidad es fundamental para su actividad [117].

CDIP-2 tiene aminoácidos hidrofóbicos como I20, L22, L25, V19, I30, C35y P36 en su secuencia. Estos residuos, confieren al péptido una alta hidrofobicidad, relaciona con la formación de interfases con proteínas. Para conocer si estos residuos pudieran estar relacionados con la unión a algún receptor sería necesario investigar mediante cálculos teóricos el cambio en la energía libre, cuando los aminoácidos hidrofóbicos son sustituidos por alaninas, identificando cambios en la estabilidad del péptido [119]. Lo que puede llevar a dos posibilidades: una en la que toda la secuencia de CDIP-2 contribuya con energía para formar interfases (distribución uniforme de la energía) u otra donde solo algunos de los residuos sean responsables de la formación de interfases con los receptores [118].

En otro orden de ideas, el péptido CDIP-2 no presentó actividad como quimioatrayente en los sistemas celulares utilizados (células THP-1, PBMCs, eosinófilos murinos derivados de médula ósea y células CHO transfectadas con los receptores de quimiocina humanos CCR1, CCR2 y CCR3), esto resulta importante ya que otros péptidos derivados de quimiocinas como de CXCL8 se han reportado con mayor actividad quimioatrayente que la quimiocina completa [99, 110].

Los primeros resultados obtenidos con CDIP-2 se realizaron con monocitos humanos THP-1, que principalmente expresan los receptores CCR2 y CCR1 [110], posteriormente decidimos estudiar mas a detalle los receptores CCR1 y CCR3. Los monocitos, responden al estímulo de diversas quimiocinas CC, siendo las mas importantes quimiocinas de la familia MCP como CCL2 y CCL13. Por lo que estudiamos el efecto de CDIP-2 en la quimiotaxis inducida por algunos ligandos de CCR1 y CCR2 utilizando monocitos THP-1 y PBMCs. Como se ha reportado las células THP-1, migran en respuesta a CCL13, lo cual es mediado por los receptores CCR1 y CCR2. Los resultados demostraron por primera ocasión que CDIP-2 disminuyó la quimiotaxis inducida por CCL13 cuando las células se incubaron con el péptido, por lo que se hipotetizó la posible interacción de CDIP-2 con los receptores CCR1 y/o CCR2; sin poder hasta ese punto identificar un blanco específico, debido a la promiscuidad del ligando por los receptores de quimiocina expresados en esas células [110].

Las quimiocinas CC, en especial las quimiocinas de la familia MCP, se caracterizan, por activar a los mismos receptores de quimiocina, pero la respuesta inducida en estas células

es variable; por ejemplo, un grupo de monocitos expresan constitutivamente CCR2; sin embargo, la expresión disminuye en presencia de LPS o citocinas como IFN $\gamma$ , lo que trae como consecuencia que en los ensayos de quimiotaxis *in vitro* cada tipo celular responda a concentraciones de quimiocina diferentes de acuerdo a su estado de activación o diferenciación [5, 37].

CCL13 comparte homología entre el 56-61 % con las MCPs y 63 % de identidad en aminoácidos con CCL11 (Eotaxina) y aunque la afinidad por los receptores, es diferente, se ha descrito por ejemplo que CCL2 desensibiliza a los monocitos de una posterior respuesta inducida por CCL13, indicando la competencia por CCR2 e internalización [41].

Utilizando PBMCs, se determinó que la incubación con CDIP-2 modificaba la quimiotaxis debida a CCL13 en mas del 40 % ; pero, a diferencia de lo observado con las células THP-1, donde el péptido CDIP-2 no modificó significativamente la quimiotaxis debida a CCL7 (100ng/mL) en las PBMC la presencia del péptido disminuyó significativamente la quimiotaxis inducida por dicha quimiocina [110]. Esta discrepancia entre resultados, con respecto a CCL7, podría deberse a la expresión diferencial de los receptores CCR1 y CCR2, ya que las PBMC expresan CCR2 en menor proporción que las THP-1 y esta quimiocina tiene mayor afinidad por este receptor de lo que tendría CCL13 que solo reduce de forma parcial las funciones inducidas por CCL7 en monocitos. Esto se publicó en los trabajos donde se describió la función efectora de CCL13 en diversos sistemas celulares, comparándola con otras MCPs como CCL7 y CCL2, en esos trabajos se mostró que CCL13 inhibe la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducido por CCL7 en eosinófilos y no en monocitos. Este antecedente apoya nuestros resultados, pensando que CDIP-2 podría mantener en parte la afinidad que posee CCL13 por CCR1 y CCR2, ya que los eosinófilos expresan CCR1 y CCL13 es capaz de desensibilizar a un estímulo posterior de CCL7, lo que no se observó en el sentido inverso y en monocitos donde se expresa preferencialmente CCR2 y la estimulación con CCL13 no modificó la respuesta inducida por CCL7 [38, 36].

Otros agonistas de CCR1 como CCL3 y CCL5, ligandos de alta y mediana afinidad de estos receptores, también se probaron en los ensayos de quimiotaxis, obteniendo disminución en la quimiotaxis de ligandos específicos de CCR1 y no para otras quimiocinas como CXCL12 que se une a CXCR4 en presencia del péptido CDIP-2, lo que sugirió que la actividad de CDIP-2 es específica para receptores CC. En este contexto la inhibición de las respuestas inflamatorias inducidas por la activación de CCR1 son de gran interés en diversas patologías como el asma.

Por otro lado, investigamos la actividad de CDIP-2, contra la quimiotaxis inducida por CCL2 (ligando de alta afinidad del receptor CCR2), donde no se observó diferencia en la migración, en presencia del péptido en los diversos modelos celulares probados, dato que nos indicó que a diferencia de lo observado con CCL13, CDIP-2 no cambió la respuesta inducida por CCL2, ligando de alta afinidad de CCR2 (**Fig 5.18**) [110].

Comparado CCL13 con CCL2; CCL13 resulta un ligando de menor afinidad, ya que CCL2 induce quimiotaxis en monocitos desde la concentración de 0.1mM mientras que se requiere de al menos 3mM de CCL13, para observar el mismo efecto. Estos reportes se relacionan con los resultados obtenidos con CDIP-2 en donde se encontró que la reducción en la quimiotaxis en presencia de este péptido varía de acuerdo con la quimiocina utilizada, observando mayor efecto en la reducción cuando el quimioatrayente es CCL13, tanto en PBMCs como en monocitos THP-1 [5].

Adicionalmente, se estudió el efecto de CDIP-2 en el receptor CCR3, principal receptor de quimiocina expresado en células inflamatorias durante el proceso alérgico[81]. CCR3 une varias quimiocinas como CCL11, CCL24, CCL26 y CCL13 con alta afinidad, y a CCL5 y CCL7 con menor afinidad. Los ligandos de CCR3 son producidos por una gran variedad de células durante el proceso de inflamación, incluyendo los fibroblastos, células epiteliales, células del endotelio vascular, músculo liso, macrófagos, células cebadas y eosinófilos [5].

Se encontró que el péptido CDIP-2 tiene actividad específica en el receptor CCR3, ya que redujo la quimiotaxis inducida por CCL13 y CCL11 en el caso del receptor humano (**Fig 5.13**). En eosinófilos murinos, CDIP-2 redujo la quimiotaxis debida a mCCL11 (**Fig 5.8**). Estos datos indican que el péptido CDIP-2 tiene actividad tanto en receptores humanos como murinos, tal como sucede con quimiocinas como CCL13 u otras MCPs [10]. La explicación de la reducción de la quimiotaxis observada en presencia de CDIP-2 podría deberse a la competencia directa con sitios de unión por los ligandos, lo que impediría que quimiocinas como CCL13 activaran de forma efectiva a los receptores; sin embargo, nuestros resultados no proveen de los datos requeridos para hacer estas aseveraciones, aunque adicionalmente se ha descrito que muchos antagonistas de receptores de quimiocina y otros GPCRs también pueden actuar como moduladores alostéricos u ortostéricos (como se mencionó en los antecedentes), es decir impedir la unión de los ligandos debido a la inducción de cambios conformacionales en el receptor que impiden la unión del ligando endógeno mas que la competencia por sitios de unión [28].

Para conocer como CDIP-2 interfiere con la actividad mediada por las quimiocinas, es necesarios realizar ensayos de competencia farmacológica con ligandos marcados radioactivamente o ensayos de bioinformatica (*docking molecular*), que permitan conocer en cada receptor que aminoácidos se verían involucrados en la respuesta adjudicada al péptido. En este sentido, para receptores como CCR3 se ha documentado que los aminoácidos Y41, Y113 y E287 son relevantes para la activación de CCR3 por CCL11 y algunos antagonistas, en estos estudios *in silico* se sugiere que aminoácidos cargados en CCL11 forman puentes salinos con residuos como E287 en el receptor, sin embargo para CCL13 no contamos con este tipo de información en la literatura [120].

Los resultados obtenidos en este trabajo, permiten plantear conclusiones con respecto a la actividad de CDIP-2 sobre los receptores de quimiocina estudiados. Por ejemplo, CDIP-2 indujo la internalización de CCR1, CCR2 y CCR3 en células THP-1, células CHO transfectadas con el receptor CCR3 y eosinófilos murinos de médula ósea (**Fig 5.9, 5.16, 5.17**).

La internalización de receptores de quimiocina es un proceso dinámico que ocurre aun en ausencia de los ligandos, pero en procesos de activación celular, representa un mecanismo de regulación de la activación de las células por las quimiocinas [32]. La internalización de los receptores de quimiocina, es mediada principalmente por las proteínas GRKs. Apoyando nuestros resultados en donde se observó que CDIP-2 induce la internalización y no quimiotaxis, se ha reportado que el tratamiento con toxina pertusis, solo inhibe parcialmente el reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas en CCR2, por lo que en este caso el reclutamiento de estas proteínas tendría una vía independiente a la clásica. La fosforilación del receptor además de GRKS puede darse en sitios consenso para cinasas como PKA, PKC [34, 121].

Está reportado que el receptor CCR1 no se recicla después de ser internalizado por CCL5, caso contrario de lo que sucede con CCR5 que se recicla casi al 100 % en superficie, después de 90 minutos, mientras que CCR3 se recicla parcialmente. En la literatura, podemos encontrar ejemplos donde se describe como los receptores de quimiocina pueden fosforilarse e internalizarse, produciendo efectos diferenciales comparados con los agonistas naturales en cuanto a la dinámica de reciclaje del receptor, ya que quimiocinas modificadas como AOP-RANTES internalizan a CCR5 sin ser reciclado a membrana, en contraste de lo que ocurre con CCL5 (RANTES). Adicionalmente se sabe que en receptores como CXCR7 la respuesta es independiente de la activación de proteínas G y que la internalización del receptor es mediada por arrestinas, que inducen la activación de vías de señalización como las MAPKs [122, 101].

Además, se han descrito casos de antagonismo para CCR2 por CCL11 donde la unión de la CCL11 al receptor produce señales diferentes a las conocidas para los agonistas, favoreciendo la activación de isoformas a las normalmente activadas vía CCR2 de la proteína PI3K, fenómeno que se relaciona directamente con la actividad de CCL11 en este receptor a pesar de no inducir activación de proteínas G o quimiotaxis [123].

Otros resultados que refuerzan la hipótesis de CDIP-2 como agonista parcial, fueron los obtenidos en los experimentos de disociación de GTP. La presencia de CDIP-2 en el sistema utilizado para determinar la asociación de GTP no modificó en ningún caso la respuesta basal, pero el péptido redujo la asociación de GTP inducida por las quimiocinas CCL11 y CCL13 (**Fig 5.14**), esto indicó que el péptido CDIP-2 interactúa directamente con los receptores de quimiocina.

Los resultados obtenidos con los ensayos de GTP, nos permitieron inferir que la internalización del receptor CCR1 y CCR3 inducida por CDIP-2 es independiente de la activación de proteínas G aunque no se descarta la posibilidad de que CDIP-2 induzca la fosforilación de los receptores, fenómeno que es necesario para la internalización de GPCRs por algunas vías, por lo que sería importante analizar este punto. Esta descrito en receptores como CCR2, que la mutación de los residuos del extremo carboxilo requeridos para la internalización, no impiden la inducción de la quimiotaxis, por lo que el proceso de internalización de los receptores y las funciones agonistas como la quimiotaxis no se regulan por las mismas vías de señalización, apesar de que algunos modelos reportan que la fosforilación de los receptores es requerida para la internalización que es un proceso posterior a la disociación de proteínas G generado por los cambios conformacionales del receptor de quimiocina [121].

Por otro lado, la medida de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ha sido una de las herramientas más utilizadas para determinar la activación de receptores de quimiocina y la inhibición de los mismos por antagonistas. En el ámbito que concierne a este trabajo, el  $\text{Ca}^{2+}$  es requerido para la quimiotaxis en algunos receptores, por ejemplo en neutrófilos la activación de PLC es requerida para la migración vía IL-8, por lo que la reducción de la liberación de este segundo mensajero se relaciona con la reducción en la quimiotaxis ya que este ión se vincula con la activación de factores requeridos para la adquisición del fenotipo migratorio y la movilización del citoesqueleto [23].

El péptido CDIP-2 disminuyó la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la quimiocina CCL13 debida a la activación de los receptores CCR1 y CCR3 (**Fig 5.20-5.21**). Sin observar cambios en las respuestas del segundo mensajero; cuando las células se estimularon con CCL3 para CCR1 o CCL2 para CCR2, este patrón de resultados se comparte con lo reportado con CCL13, ya que esta quimiocina no inhibe el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  causado por las quimiocinas mencionadas, ya que por ejemplo se requiere en monocitos de una concentración mínima reportada de 5mM, como concentración efectiva para producir una respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que para CCL13, la concentración mínima efectiva es de 10nM. El mismo caso se reporta para CCL3 donde 50nM de esta quimiocina inducen una respuesta en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  que no puede ser reducida eficientemente por 50nM de CCL13 [37].

CDIP-2 provocó una señal positiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en los receptores CCR1 y CCR2, sin embargo esta señal parece no ser suficiente para inducir migración, como lo demuestran los resultados en monocitos THP-1 y PBMC. Estos datos indican el efecto de agonista parcial de este péptido, ya que además del aumento en  $\text{Ca}^{2+}$  se describió la internalización de estos receptores en presencia del péptido [5].

En el caso del receptor CCR3, la señal dada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CCL13, no se modificó en presencia del péptido CDIP-2 y la mediada por CCL11 (**Fig 5.15**) se redujo en presencia de CDIP-2; en este sentido es interesante mencionar que la concentración mínima inductora de  $\text{Ca}^{2+}$  en eosinófilos para CCL13 es de 0.3nM en eosinófilos, mientras que para CCL11 se reporta una concentración mayor a 1nM por lo que CCL13 podría inducir una señal más alta de  $\text{Ca}^{2+}$  que CCL11; sin embargo, no existen muchos datos que indiquen estas diferencias en la literatura, por otro lado, el péptido no provocó respuesta agonista con respecto a la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  [5, 36]. En eosinófilos derivados de médula ósea se observó disminución en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por mCCL11 en presencia del péptido CDIP-2, lo que prueba la actividad del péptido en el receptor CCR3 humano y murino (**Fig 5.11**).

Aunque la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se utiliza como medida de la activación de los receptores de quimiocina, esta respuesta resulta variable de acuerdo al tipo celular [23].

Otra forma de investigar el efecto de agonistas en receptores de quimiocina y la actividad de posibles antagonistas en los GPCRs es la unión de GTP, que se relaciona directamente con la disociación del heterotrímero de proteínas G. Los resultados, mostraron que el péptido CDIP-2 no produjo la unión de GTP en los receptores CCR1 y CCR3, lo que indica de una forma clara que el péptido no activó la disociación de proteínas G; sin embargo, modificó la respuesta producida por CCL13 y CCL11, mediada por CCR1 y CCR3 respectivamente, mien-



tras que para otros ligandos de CCR1, como CCL7, CCL5 y CCL3, el péptido no modificó de forma significativa la disociación del heterotrímero de proteínas G (**Fig 5.19**). Posiblemente, como se explicó anteriormente este efecto diferencial observado con las quimiocinas CC probadas, se debe a la diferente afinidad que presentan por los receptores, aunque también podría relacionarse con sitios diferenciales de unión a CCR1 por ejemplo, lo que explicaría la actividad de CDIP-2 sobre este receptor.

Los datos obtenidos de los experimentos *in vitro*, nos permitieron relacionar la actividad *in vivo* de agonista parcial de CDIP-2, con el efecto observado en el modelo de IAP.

En el modelo de IAP, se demostró que la administración intratraqueal de CDIP-2 (2mg/kg) disminuyó el número de células en el LBA y pulmón, en particular las poblaciones de macrófagos y eosinófilos, los resultados de los ensayos *in vitro* sustentan que CDIP-2 interactúa directamente con CCR3, por lo que esto podría estar ligado con la actividad antiinflamatoria *in vivo* (**Fig 5.1-5.2**).

La inflamación en asma es un proceso complejo donde participan diversos factores solubles y células que producen daño constante al tejido, el infiltrado celular obtenido del LBA indica en gran medida el tipo de inflamación presente en el pulmón. Nuestros resultados con el modelo murino utilizado de IAP mostró eosinofilia después del reto con OVA. Los resultados, muestran que los ratones tratados con CDIP-2 tuvieron menor eosinofilia en LBA determinada por citometría de flujo con los marcadores CCR3 y SiglecF. La eosinofilia en pulmón, es regulada por la secreción de diversas citocinas y quimiocinas como IL-5 y CCL11 que favorecen la migración y la sobrevivencia de las células en el tejido, en el caso de antagonistas de receptores de quimiocina la reducción de la eosinofilia también se relaciona con una migración reducida de células por la desensibilización de receptores como CCR3 [61].

Los mecanismos biológicos de resolución del proceso inflamatorio que llevan a la normalización de las funciones y reparación del tejido dañado, son muy complejas y poco comprendidas. En el caso de los modelos murinos como el utilizado en este trabajo, donde se emplean antagonistas de receptores de quimiocina o antiinflamatorios, la rápida eliminación de los eosinófilos, se da por la migración al lumen de las vías respiratorias de estas células, la migración a los ganglios linfáticos y apoptosis [124]. La reducción del número total de eosinófilos observada en ratones tratados con CDIP-2, podría estar vinculado con los fenómenos descritos ya que la activación del receptor CCR3 también se relaciona con el incremento en la sobrevivencia de estas células. CCL11 promueve la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl2, aunque se desconocen por el momento las moléculas involucradas en los procesos específicos de resolución de la inflamación relacionados con el egreso de células del pulmón [62, 124, 125].

La activación de CCR3 en eosinófilos, induce la desgranulación en estas células por lo que la disminución de la activación puede estar relacionada tanto con regulación de la secreción de mediadores inflamatorios o por la susceptibilidad a la apoptosis. Existen reportes que indican que en el caso de los eosinófilos, se produce la eliminación por un incremento en la apoptosis, posterior al tratamiento con glucocorticoides *in vitro*, en este caso los eosinófilos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos y células epiteliales pulmonares; sin embargo, estos datos no se han comprobado del todo [124].



Los resultados de este trabajo muestran que la adición del péptido CDIP-2 a eosinófilos murinos derivados de médula ósea, induce la internalización del receptor CCR3 y por RT-PCR la expresión del ARN mensajero del receptor, (**Fig 5.9-5.10**) por lo que la disminución de la eosinofilia *in vivo*, puede explicarse con esos resultados. Cuando los eosinófilos se activan en respuesta a un estímulo migran al tejido inflamado, por quimiocinas como CCL11, 24, 26, 13 y 5 que son producidas por células de las vías respiratorias y para llegar al tejido respiratorio los eosinófilos se adhieren al endotelio vascular mediante moléculas de adhesión, facilitando la unión y la trasmigración al tejido inflamado donde liberan el contenido de sus gránulos.

El bloqueo farmacológico de CCR3 no ha dado resultados del todo exitosos, ya que aunque en modelos animales inhibir la activación de este receptor reduce la eosinofilia considerablemente, otras características importantes en procesos alérgicos aún en ausencia de eosinófilos, de hecho anticuerpos contra citocinas como IL-5 (TRFK-5) que también inhiben la eosinofilia, no presentan efecto sobre la hiperreactividad bronquial [126].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, es importante mencionar que CDIP-2 redujo la quimiotaxis mediada por CCL3 (**Fig 5.8**), principal ligando de CCR1, receptor que es expresado de forma importante en algunos grupos de eosinófilos activados en las vías respiratorias [127]. Siguiendo esta idea se han reportado antagonistas que se unen tanto a CCR3 y CCR1, receptores que tienen más del 50% de homología entre sus secuencias de aminoácidos; como posibles antagonistas para procesos alérgicos, estos presentan mayor eficacia, con respecto a los antagonistas específicos de CCR3 o CCR1 [128].

En el modelo experimental presentado en este trabajo, también encontramos disminución en el número de macrófagos CCR1<sup>+</sup> (**Fig 5.1**) en LBA de los ratones tratados con CDIP-2, comparado con los no tratados con el péptido. La acumulación de macrófagos en el asma, es un proceso poco estudiado, se sabe que la presencia de estas células favorece a la resolución del proceso inflamatorio, aunque la estimulación con citocinas como IL-4 favorecen un fenotipo activado M2 y secreción de factores profibróticos; en algunos modelos animales, se ha descrito que la presencia de macrófagos M1 también es importante y de hecho esta población aumenta en el asma severa lo que se asocia con la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  [129, 130].

Nosotros observamos, reducción en el número total de macrófagos como resultado del tratamiento con CDIP-2 lo cual se sugiere como una relación con la reducción de citocinas inflamatorias como IL-4 o TNF- $\alpha$ , que favorecerían la disminución en la activación de los macrófagos M2 y M1 respectivamente. Por otro lado en modelos de peritonitis con caldo tioglicolato, se ha probado que los macrófagos durante el proceso de resolución de la inflamación egresan del tejido inflamado y migran a los ganglios linfáticos periféricos, por lo que sugerimos que el número disminuido de macrófagos en LBA podría relacionarse con la salida de estas células del pulmón una vez que fagocitaron células apoptóticas como los eosinófilos [124].

En el LBA, encontramos células F4/80<sup>+</sup> que además expresaban a los receptores CCR1 y CCR2 (**Fig 5.7**), las cuales se redujeron después del tratamiento con el péptido CDIP-2 lo cual tiene una relación con la actividad de CDIP-2 encontrada *in vitro* con los receptores de quimiocina CCR1 y CCR2. En este caso las poblaciones de macrófagos en LBA no expresan un patrón de receptores de quimiocina definido, por lo que sugerimos que la reducción en

el número de macrófagos es producto de la disminución de citocinas como  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-4}$  y la actividad sobre los receptores de quimiocina  $\text{CCR1}$  y  $\text{CCR2}$ , sin dejar de lado que otros receptores que no fueron blanco de estudio en nuestro trabajo como  $\text{CCR4}$  se han vinculado con la presencia de macrófagos en pulmón.

$\text{CDIP-2}$  disminuyó la cantidad de  $\text{IL-4}$  en LBA lo que se asocia con la disminución en la eosinofilia, ya que la reducción de  $\text{IL-4}$  implica la reducción en la migración de eosinófilos a las vías respiratorias, debido a la disminución de  $\text{VCAM-1}$  y  $\text{VLA-1}$  requeridas para la transmigración de eosinófilos [126]. La reducción en la concentración de esta citocina, también implica menor activación de macrófagos por la vía  $\text{M2}$  y linfocitos T. La  $\text{IL-4}$  es importante para la producción del gradiente de quimiocinas en el caso de humanos. La producción de  $\text{CCL13}$  en células circulantes es inhibida por  $\text{IL-4}$ , mientras que en células epiteliales pulmonares la  $\text{IL-4}$  favorece la expresión de  $\text{CCL13}$ , lo que favorece el establecimiento de un gradiente quimiotáctico en el tejido inflamado [43].

En otros experimentos analizamos si el péptido  $\text{CDIP-2}$  modificaba la expresión de algunas citocinas *in vitro*, en células de ganglios mediastinales de ratones inmunizados con OVA, en estos ensayos las células se estimularon con OVA y se colocó estímulo de  $\text{CDIP-2}$  (**Fig 5.5**). En el sobrenadante recolectado, se determinó una menor concentración de  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-5}$  en las muestras donde se colocó el péptido, lo que nos indica que la actividad del péptido sobre los receptores de quimiocina, modula la secreción de citocinas. Para el  $\text{TNF-}\alpha$  no se observaron diferencias significativas entre grupos, probablemente por el tipo de células presentes en la muestra ya que en su mayoría son linfocitos, los cuales no producen esa citocina en cantidades considerables como lo hacen los macrófagos en pulmón.

Como lo muestran los resultados, la administración de  $\text{CDIP-2}$  moduló la secreción de  $\text{TNF-}\alpha$  (**Fig 5.4**). Aunque el asma era considerada una patología con una respuesta predominante del tipo  $\text{T}_H2$ , hoy sabemos que citocinas como el  $\text{TNF}\alpha$  producida principalmente por células cebadas y macrófagos es un importante regulador positivo de la respuesta inflamatoria en pulmón [58]. La reducción en la cantidad secretada de  $\text{IL-4}$  y  $\text{TNF-}\alpha$  en los ratones tratados con  $\text{CDIP-2}$  sugerimos que se debe al efecto del péptido sobre los receptores de quimiocina, ya que la activación de estos en células tanto estructurales como inmunes activan a factores de transcripción como  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , el cual regula la transcripción de diversos genes como es el caso del  $\text{TNF-}\alpha$ .

El factor de transcripción  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , se transloca al núcleo después de la activación de receptores de quimiocina, favoreciendo así la transcripción de diversos genes relacionados con inflamación. En este sentido la activación de la vía del  $\text{NF}\kappa\text{B}$  en receptores de quimiocina, se relaciona con la activación de proteínas como  $\text{PKC}$  y la disminución de AMP cíclico, también existen reportes que muestran que la inhibición con toxina pertusis no bloquee la activación de la vía  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , en este caso la respuesta podría estar dada por otras proteínas G diferentes a las  $\alpha_i$ , o por vías independientes de proteínas G mediadas por arrestinas que activan proteínas como  $\text{Rac-1}$  que se ha reportado como activador de la vía  $\text{NF}\kappa\text{B}$  [131].

En este contexto el péptido  $\text{CDIP-2}$ , que modifica la respuesta mediada por quimiocinas en los receptores  $\text{CCR1}$ ,  $\text{CCR2}$  y  $\text{CCR3}$ , podría estar modulando la activación de la vía del  $\text{NF}\kappa\text{B}$

, ya que por ejemplo la activación de PKC que participa en la activación de NF $\kappa$ B requiere el aumento del Ca<sup>2+</sup>, señal que disminuyó en presencia de CDIP-2 después del estímulo con quimiocinas como CCL11 o CCL13 en CCR3. Adicionalmente la activación de proteínas G es necesaria para la activación del NF $\kappa$ B y nuestros resultados de los ensayos de unión de GTP, mostraron que el péptido CDIP-2 reduce la disociación del complejo de proteínas G en respuesta a CCL13 y CCL11, por lo que sugerimos que la vía del NF $\kappa$ B podría estar disminuida después del tratamiento con CDIP-2 como consecuencia de la disminución de segundos mensajeros como el Ca<sup>2+</sup> y proteínas como PKC.

La reducción de la actividad de NF $\kappa$ B trae como consecuencia reducción en la expresión de diversas moléculas proinflamatorias, entre las que destacan citocinas y quimiocinas que favorecen la homeostasis en el tejido, sin embargo citocinas como IL-13 importante mediador de la respuesta inflamatoria en asma, no se regula por esta vía [131]. Los resultados de RT-PCR de pulmón, para las citocinas como IL-4 y TNF- $\alpha$  indicaron que el tratamiento con CDIP-2, no modificó significativamente la expresión del ARNm de los genes de esas citocinas, pero como se explicó la proteína determinada por ELISA disminuyó (**Fig 5.3**) después del tratamiento con el péptido; esta discrepancia de resultados, entre las dos técnicas se puede explicar sabiendo que durante el proceso inflamatorio la liberación de mediadores inflamatorios y expresión de receptores, es regulado en diversos niveles, siendo la degradación del mRNA uno de los mas importantes ya que este punto de regulación postrascriptional impide de forma eficaz la traducción a proteínas, modulando el proceso inflamatorio [132]. Como el ARNm de

receptores como CCR2 puede ser regulado de forma postraduccional después de estímulos como LPS [133]. Enfocándonos a la inflamación en asma, se sabe que IL-4 y TNF- $\alpha$  favorecen la estabilidad del mRNA de CCL11 en células epiteliales pulmonares y que esto es mediado por el aumento en la proteína HuR, de hecho estos reportes indican que el efecto de las citocinas es sinérgico [134]. La acción sinérgica de estas citocinas en epitelio también se ha mostrado a nivel de proteína con quimiocinas como CCL13 [36].

El ARN mensajero de citocinas como IL-4 y TNF- $\alpha$ , se regulan postraduccionalmente, de hecho se sabe que para el caso de TNF- $\alpha$ , otras vías como la de las MAPKs son importantes, por ejemplo los ratones deficientes en la proteína Mk2 son resistentes a la muerte por shock endotóxico inducido por LPS debido a la reducción en la producción de TNF- $\alpha$ , interesantemente se describió que la reducción en los niveles de TNF- $\alpha$  en los ratones Mk2 KO se relaciona con la inhibición del transporte de mRNA del TNF- $\alpha$  del núcleo al citoplasma [59]. El mismo efecto en la producción de TNF- $\alpha$  se ha reportado utilizando inhibidores específicos de ERK como PD98059. En el caso de asma en modelos murinos se ha demostrado que la inhibición de MAPKs; ERK y p38, reducen la eosinofilia la secreción de moco y la hiperreactividad bronquial frente al reto con el alergeno [135].

Adicionalmente, los resultados con eosinófilos murinos derivados de médula ósea, mostraron, que CDIP-2 regula la migración de este tipo celular crucial en asma, además de disminuir el ARNm de CCR3 y TNF- $\alpha$  (**Fig 5.10**). Por lo que nuestros resultados sugieren, que moléculas como CDIP-2 poseen un importante efecto sobre algunas características de la inflamación alérgica que resultan deletéreas para la función del tejido, como lo es la eosinofilia y la secreción de citocinas proinflamatorias.

Diferentes trabajos han demostrado, que las MAPKs son importantes para el proceso de migración. Existen trabajos realizados en eosinófilos humanos, donde se ha descrito que las proteínas Erk y p38 son necesarias para la quimiotaxis y desgranulación, sin embargo no se conoce exactamente como es que estas MAPKs cinasas son requeridas para el proceso intracelular que promueve la quimiotaxis [135, 136]. En base a esos antecedentes, decidimos determinar si el péptido CDIP-2 reducía la fosforilación de Erk1/2 y p38 en respuesta a las quimiocinas CCL11 y CCL3, ya que el péptido reduce la quimiotaxis inducida por estas quimiocinas y alguno de los posibles mecanismos de acción podría estar relacionado con la regulación de las señales intracelulares, ya que aunque el péptido no indujo quimiotaxis, activación de proteínas G o liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , se observó la internalización del receptor y el fenómeno de internalización dependiente de  $\beta$ -arrestinas se ha descrito como un importante activador de Erk, independiente de las señales dadas por la disociación de las proteínas G [35].

Nuestros datos indicaron que el péptido CDIP-2 ( $1-100\mu\text{g}/\text{mL}$ ), no aumentó la fosforilación basal de las cinasas Erk1/2 o p38 en eosinófilos murinos de médula ósea y tampoco redujo la fosforilación inducida por las quimiocinas CCL11 y CCL3, ligandos de CCR3 y CCR1 respectivamente. El trabajo demostró que en presencia de inhibidores de Erk, la quimiotaxis inducida por CCL11 se abate; sin embargo, p38 solo es necesaria para el proceso de desgranulación, esto se probó con un inhibidor específico de p38 (**Fig 6.12**) [135].

Se sabe que CCL11 es un agonista parcial de CCR2, pero el mecanismo de acción en este caso está relacionado con la activación de vías de señalización diferentes a las activadas por CCL2, entre éstas respuestas destaca la activación de Erk1/2, aunque en este sistema CCL11 no induce quimiotaxis, disociación de proteínas G y no reduce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por CCL2 la activación de Erk1/2 y PI3K son requeridos para la actividad de antagonista ejercida por CCL11 [123].

Los antecedentes de la activación de Erk como modulador positivos de la migración celular y desgranulación para el caso de p38 y los antecedentes de la activación de Erk como modulador requerido en la respuesta de agonista inversos observado con CCL11 en CCR2 nos indican que los diversos ligandos e intensidades de las respuestas producida puede generar respuestas opuestas; sin embargo, en el caso de CDIP-2 en el sistema estudiado, no se encontró regulación en la vía de las MAP cinasas estudiadas, aunque resta conocer la respuestas en el receptor CCR2.

Adicionalmente, se estudió en el LBA la presencia de linfocitos T y B (**Fig 5.1**). En este sentido, la inflamación alérgica se caracteriza por la presencia de linfocitos T  $\text{CD4}^+$  con fenotipo  $\text{T}_H2$ , los cuales son suficientes para inducir la inflamación y promueven la cronicidad en modelos animales de asma, aunque esto depende en gran medida del momento de la respuesta alérgica y el tipo de alérgeno [51]. En nuestro modelo, estudiamos en LBA la presencia de linfocitos T  $\text{CCR3}^+$ , los resultados mostraron que la administración de CDIP-2, no modificó el número de linfocitos T, lo cual podría explicarse, debido a que éstas células además del receptor CCR3, expresan receptores de quimiocina como CCR4 y CCR8, siendo estos receptores mas importantes en el reclutamiento al pulmón de algunas subpoblaciones de linfocitos T que CCR3, cuya expresión es muy controvertida en linfocitos  $\text{T}_H2$  humanos [69].

Con respecto a los linfocitos B, no se modificó la cantidad de estas células después del tratamiento con CDIP-2, esto se identificó por citometría de flujo con los marcadores CD19, en este sentido se sabe que en modelos de IAP, la presencia de linfocitos B, se relaciona con la concentración de anticuerpos en el fluido del LBA, además para los linfocitos B y células plasmáticas CCR10 es el principal receptor de quimiocina relacionado con la acumulación de estas células en la mucosa respiratoria [137]. En nuestro modelo, los animales alergenizados con OVA desarrollaron una respuesta humoral caracterizada por la producción de IgE específica anti OVA, esto fue determinado por ELISA en el suero. Los niveles de IgE detectados en los animales tratados con CDIP-2 no disminuyeron con respecto a los animales no tratados, aunque la disminución de citocinas como IL-4 traería consigo una disminución en la producción de IgE a nivel local (pulmonar). Este efecto no es apreciable posiblemente debido a la vida media de los anticuerpos en circulación y el tiempo de duración del modelo experimental utilizado. El anticuerpo IgE tiene una vida media de tres días en circulación sino es secuestrada en algún tejido o mucosa, a diferencia de IgG que puede permanecer más de 20 días en circulación.

Finalmente, podemos sugerir que el efecto de agonista parcial del péptido CDIP-2 en un proceso inflamatorio con características alérgicas, produjo reducción de la eosinofilia y del acúmulo del infiltrado inflamatorio en pulmón. Los mecanismos relacionados con la actividad de CDIP-2 se relacionan con su función de agonista parcial en los receptores CCR1, CCR2 y CCR3, modulando así la actividad de las quimiocinas mediante la internalización del receptor, disminución de la activación de las proteínas G, reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado y la quimiotaxis, lo cual se vincula posteriormente con la reducción en la secreción de citocinas proinflamatorias.

El trabajo presentado aporta conocimientos en el área de las quimiocinas, lo cual podría servir para generar moléculas con actividad antiinflamatoria en base a los conocimientos de las diferentes respuestas obtenidas en los receptores CCR1, CCR2 y CCR3, así como en lo importante que resulta conocer a fondo la actividad diferencial de quimiocinas como CCL13 en los receptores, ya que a pesar de ser una molécula claramente caracterizada como importante mediador en procesos inflamatorios, se desconoce a nivel molecular al igual que para la mayoría de las MCPs los sitios de unión importantes para la activación de los receptores, además de los residuos del amino terminal clásicamente estudiados.

## 7 Conclusiones

Con base en los resultados presentados, podemos concluir:

1. El péptido CDIP-2, tiene actividad de agonista parcial en los receptores de quimiocina CCR1, CCR2 y CCR3.
2. El péptido CDIP-2, reduce la quimiotaxis inducida por algunas de las quimiocinas involucradas en el proceso de inflamación en asma como CCL11 y CCL13 ligandos de CCR3 y CCL3 y CCL5 ligandos de CCR1.
3. El péptido CDIP-2 induce la internalización de los receptores CCR1, CCR2 y CCR3.
4. En el modelo de IAP la actividad de agonista parcial del péptido CDIP-2 moduló la respuesta inflamatoria debida al alergen, reduciendo el número de eosinófilos y macrófagos en LBA, así como el infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquial en pulmón.
5. La administración del péptido CDIP-2 en el modelo *in vivo*, disminuyó la concentración de TNF- $\alpha$ , misma respuesta que se observó en eosinófilos tratados *in vitro* con el péptido.

## 8 Perspectivas

1. Analizar con detalle el proceso de internalización de los receptores de quimiocina mediado por CDIP-2, con la finalidad de conocer si el péptido favorece la fosforilación de receptores, induce el reciclaje del receptor o degradación.
2. Analizar el efecto del péptido CDIP-2, en la modulación de las vías de señalización que involucran la activación del factor de transcripción  $\text{NF}\kappa\text{B}$ ; para conocer si la disminución de citocinas proinflamatorias se regula mediante esta vía. Esto determinando la translocación del factor de transcripción al núcleo y el estudio de la activación de proteínas como PI3K, AKT y PKC.
3. Investigar si los péptidos derivados de CCL13 modifican la desgranulación de eosinófilos y células cebadas en respuesta a estímulos de quimiocinas como CCL11 y CCL13. Como posible mecanismo antiinflamatorio en el proceso alérgico.
4. Estudiar el posible efecto en la modulación de la inflamación por el péptido CDIP-2, en células estructurales pulmonares (epitelio y músculo liso); para conocer si se modifica la secreción de citocinas o procesos como la proliferación celular, derivada de la activación de receptores como CCR3 y CCR1 en éstas células.
5. Analizar el efecto de la administración de CDIP-2 y otros péptidos derivados en la hiperreactividad bronquial inducida por el alérgeno.
6. En cuanto al estudio estructural de CDIP-2, se debe investigar si los aminoácidos K19, R24, K26 y R34 son importantes para la actividad del péptido; esto mediante la sustitución por Alaninas de forma escalonada en la secuencia, con la finalidad de crear secuencias mas cortas con actividad biológica similar o mayor a la que presenta CDIP-2.

## 9 Apéndice: Soluciones y reactivos utilizados

Los péptidos utilizados para la realización de este trabajo fueron sintetizados y liofilizados por la empresa Genscript (*New Jersey, USA*): CDIP-2:19-*KISLQRLKSYVITTSRCPQ*-37.

Todos los péptidos fueron suspendidos en agua calidad inyectable y se almacenaron  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las dosis administradas fueron diluidas en SS.

### Soluciones utilizadas para el ensayo de quimiotaxis

1. Solución balanceada Hanks con 1mM  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 0.01 % ASB.
2. Solución de Hanks sin 1mM  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 0.01 % ASB.
3. Calceína AM 1mg/mL.

### Soluciones utilizadas para ELISA

#### Buffer de Carbonatos pH 9.5

Para 200 mL (10X)

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ -3.2 g

$\text{NaHCO}_3$ -5.86 g

Agua desionizada

#### Solución de Trabajo

KCl.....200mg

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....200 mg

NaCl.....8000 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....1150 mg

BSA.....1 %

1L de agua desionizada y ajustar a pH 7.4

#### Solución de Lavado

KCl.....200 mg

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....200 mg

NaCl.....8000 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....1150 mg

Tween 20 0.05 %

Agua desionizada 1L, ajustar a pH 7.4



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

Para 100 mL

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....10.2 mL

Aforar a 100mL con agua desionizada

## **Anticuerpos:**

Anticuerpo anti ratón IgE biotilado) (Dilución 1:150)

Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG2a (ZyMed) (Dilución 1:1000)

Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG1 (ZyMed) (Dilución 1:1000)

## **Soluciones y anticuerpos utilizados para citometría de flujo**

### **Buffer de citometría: PBS/SFB 2%**

SFB.....2%

NaN<sub>3</sub>.....0.02%

Diluir en PBS 1X pH 7.4

### **Paraformaldehído al 4%**

Paraformaldehído al 4%.....4 g

Diluir en 100 mL de PBS 1X pH 7.4

## **Lista de anticuerpos**

Pe/Cy5-F480, BD (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), dilución utilizada 1:300

PerCP Ly-6G/Ly-6C-GR1, BD (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), dilución utilizada 1:100

SiglecF, BD Pharmigen, dilución utilizada 1:50

hCCR1, hCCR2, Santa Cruz, dilución utilizada 1:100

Pe-hCCR3

mCCR3

anti-rata IgG FITC, RD Systems (Minneapolis, USA), dilución utilizada 1:200

## **Soluciones y anticuerpos utilizados para WB**

### **Solución 1.5 M Tris-HCl pH 8.8**

Tris-base.....18.5 g

Agua desionizada.....100 mL

Ajustar a pH 8.8 con HCl y almacenar a 4°C

### **Solución 0.5 M Tris-HCl pH 6.8**

Tris-base.....6 g

Agua desionizadas.....100 mL

Ajustar a pH 6.8 con HCl y almacenar a °C

### **SDS al 10%**

SDS.....10 g

Agua desionizada.....100 mL

Almacenar a temperatura ambiente

**Persulfato de Amonio al 10 %**

Persulfato de amonio.....1 g

Agua destilada.....10 mL

Preparar sólo lo necesario o guardar por 10 días a -20°C

**Buffer de corrida 1X**

Tris Base.....3 g

Glicina.....1.44 g

SDS.....1 g

Agua desionizada.....1 L

**Buffer de transferencia**

Tris-base.....03.03 g

Glicina.....14.4 g

Metanol.....200 mL

SDS.....0.5 g

Aforar a 1 litro con agua y ajustar a pH=8.3

**TBS**

2.42 g de Tris-HCl (20 mM)

8 g de NaCl (137 mM)

Ajustar el pH a 7.6 y Aforar a 1 litro

**TBS-Tween 20 0.5 %**

0.5 ml Tween 20 en 1000 mL de TBS

**Solución de bloqueo: TBS-Leche al 5 %**

2 g de leche descremada en 40 mL de TBS-Tween 20

**Lista de anticuerpos**

1.-**pERK**, *Santa Cruz Biotechnology*, dilución 1:1000

2.-**p-p38**, *Santa Cruz Biotechnology*, dilución 1:1000

3.-**anti-cabra IgG FITC**, *Zymed*, dilución 1:10000

4.-**anti rata IgG-HRP**, *Zymed*, dilución 1:5000

**Soluciones utilizadas para PCR**

**Soluciones para electroforesis de ADN y ARN**

**TAE 1X**

Tris Base.....0.1M

EDTA.....0.001M

Agua estéril 1L, ajustar el pH 8.3

**Buffer de carga para ARN y ADN (10X)**

Glicerol 50 % (v/v)

EDTA a pH 8.3

Azul de bromofenol 0.05 %

## Gel de Agarosa

TAE 1X

Agarosa 1.5 % p/v

Agua desionizada estéril

### Reacción de PCR

Buffer 10X.....2.5 $\mu$ L

MgCl(50mM).....0.75 $\mu$ L

dNTPs(1mM)/uno.....0.5 $\mu$ L

Taq polimerasa.....1 $\mu$ L

Primers(10 $\mu$ M)/uno.....0.5 $\mu$ L

cDNA.....1.0 $\mu$ L

Agua.....20 $\mu$ L

Volumen total=25 $\mu$ L

### Reacción de PCR en tiempo real

Para la reacción de PCR se utilizaron 1 $\mu$ L de cADN obtenido por muestra utilizando como reportero fluorescente el reactivo Sybergreen Master Mix 2X (*Applied Biosystems*). El equipo utilizado fue ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems*), la reacción se realizó como sigue:

Volúmen para una reacción de 25 $\mu$ L

SyberGreen 2X.....12.5 $\mu$ L

Agua estéril.....9.5 $\mu$ L

cADN.....1 $\mu$ L

Primers(10 $\mu$ M)/uno.....1 $\mu$ L

## Lista de oligonucleótidos

Todos los oligonucleotidos se resuspendieron en agua estéril a la concentración de 10 $\mu$ M.

1. **TNF- $\alpha$**  (5'GGCAGGTCTACTACTTTGGAGTCATTGC3', 3'CTTCGAGGCTCCAGTGAATTTCCG5')
2. **CCR3** (5'TTCTCACCAGGAAGAAACGGA3', 3'GGAGGTGACTGAGGTGATTGC5')
3. **IL-4** (5'TCATCGGCATTTTGAACGAG3', 3'CGTTTGGCACATCCATCCATCTCC5')

## Plásmidos utilizados para la transfección de células CHO

Para las transfecciones descritas, se utilizaron plásmidos como vectores, los cuales fueron obtenidos por donaciones. El plásmido utilizado para la transfección del gen humano que codifica para la proteína que conforma al receptor CCR3 fue: pcDNA3 con el inserto de 1.1kb (producto de PCR) en los sitios HindIII-XhoI, el vector presenta el gen de resistencia a la geneticina. Fue inventariado con la clave Acc U28694 y fue generado por J. Pease.

El plásmido utilizado para la transfección del gen humano que codifica para la proteína que conforma al receptor CCR2b fue: Bluescript SK con el inserto de 1.2kb (producto de PCR) en los sitios EcoRV-EcoRV (Acc U03905), generado por C. Combadiere; de este plásmido se tomó el inserto en HindIII-BAMHI y se

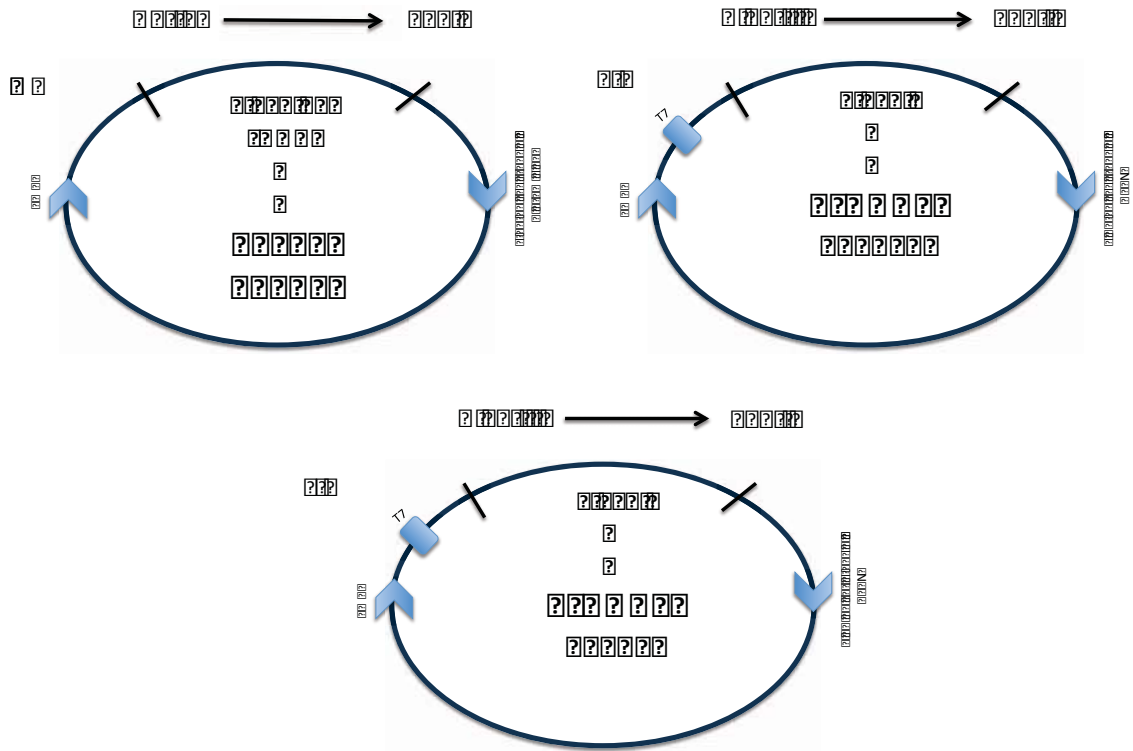


Figura 9.1 Plásmidos utilizados en las transfecciones.

subclonó en esos mismos sitios de restricción en el plásmido pcDNA3. El vector presenta el gen de resistencia a la geneticina.

El plásmido utilizado para la transfección del gen humano que codifica para la proteína que conforma al receptor CCR1 fué: pCEP4 con el inserto de 2.1kb (producto de PCR) en los sitios EcoRI-XhoI, el vector presenta el gen de resistencia a la higromicina. Fue inventariado con la clave Acc L10918 y fue generado por S. Ahuja.

Los plásmidos utilizados para la transfección de los genes de los receptores de quimiocina humanos que se utilizaron se muestran en la **Fig 9.1**.

# Bibliografía

- [1] A. Zlotnik and O. Yoshie, “The chemokine superfamily revisited.,” *Immunity*, vol. 36, pp. 705–16, May 2012.
- [2] A. Viola and A. D. Luster, “Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation.,” *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 48, pp. 171–97, Jan. 2008.
- [3] E. D. Bateman, S. S. Hurd, P. J. Barnes, J. Bousquet, J. M. Drazen, M. FitzGerald, P. Gibson, K. Ohta, P. O’Byrne, S. E. Pedersen, E. Pizzichini, S. D. Sullivan, S. E. Wenzel, and H. J. Zar, “Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary.,” *The European respiratory journal official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, vol. 31, no. 1, pp. 143–178, 2008.
- [4] J. E. Pease, “Targeting chemokine receptors in allergic disease.,” *The Biochemical journal*, vol. 434, pp. 11–24, Jan. 2011.
- [5] E. Van Coillie, J. Van Damme, and G. Opdenakker, “The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines.,” *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 10, pp. 61–86, Mar. 1999.
- [6] M. Hirano, S. Das, P. Guo, and M. D. Cooper, “The evolution of adaptive immunity in vertebrates.,” *Advances in immunology*, vol. 109, pp. 125–57, Jan. 2011.
- [7] C. A. Janeway, *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. 5th editio ed., 2001.
- [8] B. Beutler, “Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin?,” *Nature reviews. Immunology*, vol. 4, p. 498, July 2004.
- [9] D. Kabelitz and R. Medzhitov, “Innate immunity–cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines.,” *Current opinion in immunology*, vol. 19, pp. 1–3, Feb. 2007.
- [10] A. D. Luster, “Chemokines–chemotactic cytokines that mediate inflammation.,” *The New England journal of medicine*, vol. 338, pp. 436–45, Feb. 1998.
- [11] N. W. L. Jeffrey K. Harrison, *The chemokine receptors*. Humana Press, 2007.
- [12] P. M. Murphy, M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hébert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim, and C. A. Power, “International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.,” *Pharmacological reviews*, vol. 52, pp. 145–76, Mar. 2000.
- [13] S. J. Allen, S. E. Crown, and T. M. Handel, “Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism.,” *Annual review of immunology*, vol. 25, pp. 787–820, Jan. 2007.
- [14] G. M. Clore and A. M. Gronenborn, “Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines.,” *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 9, pp. 57–62, Jan. 1995.
- [15] G. S. Kuschert, F. Coulin, C. A. Power, A. E. Proudfoot, R. E. Hubbard, A. J. Hoogewerf, and T. N. Wells, “Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses.,” *Biochemistry*, vol. 38, pp. 12959–68, Sept. 1999.
- [16] R. Medzhitov, “Origin and physiological roles of inflammation.,” *Nature*, vol. 454, pp. 428–35, July 2008.
- [17] C. A. Janeway and R. Medzhitov, “Innate immune recognition.,” *Annual review of immunology*, vol. 20, pp. 197–216, Jan. 2002.
- [18] B. Plytycz and R. Seljelid, “From inflammation to sickness: historical perspective.,” *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, vol. 51, pp. 105–9, Jan. 2003.

- [19] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh, "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 7, pp. 678–89, Sept. 2007.
- [20] A. F. Miller and J. J. Falke, "Chemotaxis receptors and signaling.," *Advances in protein chemistry*, vol. 68, pp. 393–444, Jan. 2004.
- [21] S. Hemmerich, C. Paavola, A. Bloom, S. Bhakta, R. Freedman, D. Grunberger, J. Krstenansky, S. Lee, D. McCarley, M. Mulkins, B. Wong, J. Pease, L. Mizoue, T. Mirzadegan, I. Polsky, K. Thompson, T. M. Handel, and K. Jarnagin, "Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2.," *Biochemistry*, vol. 38, pp. 13013–25, Oct. 1999.
- [22] B. Wu, E. Y. T. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov, and R. C. Stevens, "Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists," *Science*, vol. 330, pp. 1066–71, Oct. 2010.
- [23] A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz, "Cell migration: integrating signals from front to back.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 302, pp. 1704–9, Dec. 2003.
- [24] E. G.-Z. G. Soldevila, "Role of Chemokines in T cell development.," *Inmunología*, vol. 22, no. 4, 2003.
- [25] C. Bissantz, "Conformational changes of G protein-coupled receptors during their activation by agonist binding.," *Journal of receptor and signal transduction research*, vol. 23, pp. 123–53, Jan. 2003.
- [26] R. Treisman, "Regulation of transcription by MAP kinase cascades.," *Current opinion in cell biology*, vol. 8, pp. 205–15, Apr. 1996.
- [27] L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz, "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals.," *Journal of cell science*, vol. 115, pp. 455–65, Feb. 2002.
- [28] L. T. May, K. Leach, P. M. Sexton, and A. Christopoulos, "Allosteric modulation of G protein-coupled receptors.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 47, pp. 1–51, Jan. 2007.
- [29] A. Claing, S. A. Laporte, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, "Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins.," *Progress in neurobiology*, vol. 66, pp. 61–79, Feb. 2002.
- [30] M. A. Byers, P. A. Calloway, L. Shannon, H. D. Cunningham, S. Smith, F. Li, B. C. Fassold, and C. M. Vines, "Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 181, pp. 4723–32, Oct. 2008.
- [31] M. Mariani, R. Lang, E. Binda, P. Panina-Bordignon, and D. D'Ambrosio, "Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells.," *European journal of immunology*, vol. 34, pp. 231–40, Jan. 2004.
- [32] L. D. Bennett, J. M. Fox, and N. Signoret, "Mechanisms regulating chemokine receptor activity.," *Immunology*, vol. 134, pp. 246–56, Nov. 2011.
- [33] M. O'Hayre, C. L. Salanga, T. M. Handel, and D. J. Hamel, "Emerging Concepts and Approaches for Chemokine-Receptor Drug Discovery.," *Expert opinion on drug discovery*, vol. 5, pp. 1109–1122, Nov. 2010.
- [34] S. S. Ferguson, "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling.," *Pharmacological reviews*, vol. 53, pp. 1–24, Mar. 2001.
- [35] D. K. Luttrell and L. M. Luttrell, "Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases.," *Assay and drug development technologies*, vol. 1, pp. 327–38, Apr. 2003.
- [36] E. A. Garcia-Zepeda, C. Combadiere, M. E. Rothenberg, M. N. Sarafi, F. Lavigne, Q. Hamid, P. M. Murphy, and A. D. Luster, "Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3," *J Immunol*, vol. 157, no. 12, pp. 5613–5626, 1996.
- [37] M. Uguccioni, P. Loetscher, U. Forssmann, B. Dewald, H. Li, S. H. Lima, Y. Li, B. Kreider, G. Garotta, M. Thelen, and M. Baggiolini, "Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 183, pp. 2379–84, May 1996.

- [38] T. A. Berkhout, H. M. Sarau, K. Moores, J. R. White, N. Elshourbagy, E. Appelbaum, R. J. Reape, M. Brawner, J. Makwana, J. J. Foley, D. B. Schmidt, C. Imburgia, D. McNulty, J. Matthews, K. O'Donnell, D. O'Shannessy, M. Scott, P. H. Groot, and C. Macphee, "Cloning, in vitro expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemoattractant protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, pp. 16404–13, July 1997.
- [39] B. Lamkhioed, E. A. Garcia-Zepeda, S. Abi-Younes, H. Nakamura, S. Jedrzkiewicz, L. Wagner, P. M. Renzi, Z. Allakhverdi, C. Lilly, Q. Hamid, and A. D. Luster, "Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 162, pp. 723–732, Aug. 2000.
- [40] K. Tenschler, B. Metzner, C. Hofmann, E. Schopf, J. Norgauer, and E. Schöpf, "The monocyte chemoattractant protein-4 induces oxygen radical production, actin reorganization, and CD11b up-regulation via a pertussis toxin-sensitive G-protein in human eosinophils," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 240, pp. 32–35, Dec. 1997.
- [41] A. D. Luster and M. E. Rothenberg, "Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 62, pp. 620–33, Nov. 1997.
- [42] E. Mendez-Enriquez and E. A. García-Zepeda, "The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation.," *Inflammopharmacology*, vol. 21, pp. 397–406, Dec. 2013.
- [43] H. Nakamura, A. D. Luster, H. Tateno, S. Jedrzkiewicz, G. Tamura, K. J. Haley, E. A. Garcia-Zepeda, K. Yamaguchi, and C. M. Lilly, "IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells.," *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, vol. 281, pp. L1288–302, Nov. 2001.
- [44] S. Shahabuddin, P. Ponath, and R. P. Schleimer, "Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 164, pp. 3847–54, May 2000.
- [45] M. Nonaka, A. Fukumoto, N. Ogihara, R. Pawankar, A. Sakanushi, and T. Yagi, "Expression of MCP-4 by TLR ligand-stimulated nasal polyp fibroblasts," *Acta Otolaryngol*, vol. 127, pp. 1304–1309, Dec. 2007.
- [46] T. Iwamoto, H. Okamoto, S. Kobayashi, K. Ikari, Y. Toyama, T. Tomatsu, N. Kamatani, and S. Momohara, "A role of monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 from chondrocytes in rheumatoid arthritis," *Febs J*, vol. 274, no. 18, pp. 4904–4912, 2007.
- [47] C. Hintzen, S. Quaiser, T. Pap, P. C. Heinrich, and H. M. Hermanns, "Induction of CCL13 expression in synovial fibroblasts highlights a significant role of oncostatin M in rheumatoid arthritis.," July 2009.
- [48] C. Barinka, A. Prah, and J. Lubkowski, "Structure of human monocyte chemoattractant protein 4 (MCP-4/CCL13)," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 64, no. Pt 3, pp. 273–278, 2008.
- [49] V. Kanabar, C. P. Page, D. E. Simcock, C. Karner, K. Mahn, B. J. O'Connor, and S. J. Hirst, "Heparin and structurally related polymers attenuate eotaxin-1 (CCL11) release from human airway smooth muscle.," *British journal of pharmacology*, vol. 154, pp. 833–42, June 2008.
- [50] L. Cohn, J. A. Elias, and G. L. Chupp, "Asthma: mechanisms of disease persistence and progression.," *Annual review of immunology*, vol. 22, pp. 789–815, Jan. 2004.
- [51] C. M. Lloyd and E. M. Hessel, "Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 10, pp. 838–48, Dec. 2010.
- [52] R. S. Geha, H. H. Jabara, and S. R. Brodeur, "The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 3, pp. 721–32, Sept. 2003.
- [53] D. Vercelli and R. S. Geha, "Regulation of isotype switching.," *Current opinion in immunology*, vol. 4, pp. 794–7, Dec. 1992.
- [54] H. Hammad and B. N. Lambrecht, "Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 8, pp. 193–204, Mar. 2008.
- [55] S. Koyasu, "Natural Helper Cells and TH2-Type Innate Immunity.," *Cornea*, vol. 31 Suppl 1, pp. S20–4, Nov. 2012.
- [56] K. Chung and P. Barnes, "Cytokines in asthma," *Thorax*, vol. 48, no. 9, pp. 825–857, 1993.



- [57] P. J. Barnes, K. F. Chung, and C. P. Page, "Inflammatory mediators of asthma: an update.," *Pharmacological Reviews*, vol. 50, no. 4, pp. 515–596, 1998.
- [58] D. Lykouras, F. Sampsonas, A. Kaparianos, K. Karkoulas, and K. Spiropoulos, "Role and pharmacogenomics of TNF-alpha in asthma.," *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 8, pp. 934–42, Aug. 2008.
- [59] D. H. Broide, G. Stachnick, D. Castaneda, J. Nayar, and P. Sriramarao, "Inhibition of eosinophilic inflammation in allergen-challenged TNF receptor p55/p75– and TNF receptor p55-deficient mice.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 24, pp. 304–11, Mar. 2001.
- [60] M. Berry, C. Brightling, I. Pavord, and A. Wardlaw, "TNF-alpha in asthma.," *Current opinion in pharmacology*, vol. 7, pp. 279–82, June 2007.
- [61] M. E. Rothenberg and S. P. Hogan, "The eosinophil.," *Annual review of immunology*, vol. 24, pp. 147–74, Jan. 2006.
- [62] H. F. Rosenberg, K. D. Dyer, and P. S. Foster, "Eosinophils: changing perspectives in health and disease.," *Nature Reviews Immunology*, Nov. 2012.
- [63] S. J. Galli and J. J. Costa, "Mast-cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation.," *Allergy*, vol. 50, pp. 851–62, Nov. 1995.
- [64] S. J. Galli and M. Tsai, "IgE and mast cells in allergic disease.," *Nature medicine*, vol. 18, pp. 693–704, May 2012.
- [65] W. E. Paul, *Fundamental Immunology*. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business, sixth edit ed., 2008.
- [66] M. Peters-Golden, "The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 31, pp. 3–7, July 2004.
- [67] A. P. Moreira and C. M. Hogaboam, "Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution.," *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, vol. 31, pp. 485–91, June 2011.
- [68] M. Yang, R. K. Kumar, P. M. Hansbro, and P. S. Foster, "Emerging roles of pulmonary macrophages in driving the development of severe asthma.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 91, pp. 557–69, Apr. 2012.
- [69] F. Sallusto, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia, "Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells.," *Science (New York, N. Y.)*, vol. 277, pp. 2005–7, Sept. 1997.
- [70] S. Schnyder-Candrian, D. Togbe, I. Couillin, I. Mercier, F. Brombacher, V. Quesniaux, F. Fossiez, B. Ryffel, and B. Schnyder, "Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 203, pp. 2715–25, Nov. 2006.
- [71] S. Nakae, Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano, and Y. Iwakura, "Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses.," *Immunity*, vol. 17, pp. 375–87, Sept. 2002.
- [72] P. Joubert, S. Lajoie-Kadoch, M. Welman, S. Dragon, S. Létuvé, B. Tolloczko, A. J. Halayko, A. S. Gounni, K. Maghni, and Q. Hamid, "Expression and regulation of CCR1 by airway smooth muscle cells in asthma.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 180, pp. 1268–75, Jan. 2008.
- [73] K. Blease, B. Mehrad, T. J. Standiford, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, S. W. Chensue, B. Lu, C. J. Gerard, and C. M. Hogaboam, "Airway remodeling is absent in CCR1-/- mice during chronic fungal allergic airway disease.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 165, pp. 1564–72, Aug. 2000.
- [74] M. Komai, H. Tanaka, K. Nagao, M. Ishizaki, D. Kajiwara, T. Miura, H. Ohashi, T. Haba, K. Kawakami, E. Sawa, O. Yoshie, N. Inagaki, and H. Nagai, "A novel CC-chemokine receptor 3 antagonist, Ki19003, inhibits airway eosinophilia and subepithelial/peribronchial fibrosis induced by repeated antigen challenge in mice.," *Journal of pharmacological sciences*, vol. 112, pp. 203–13, Feb. 2010.
- [75] P. C. Fulkerson, C. A. Fischetti, and M. E. Rothenberg, "Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling.," *The American journal of pathology*, vol. 169, pp. 2117–26, Dec. 2006.



- [76] N. H. Fifadara, F. Beer, S. Ono, and S. J. Ono, "Interaction between activated chemokine receptor 1 and FcepsilonRI at membrane rafts promotes communication and F-actin-rich cytoneme extensions between mast cells.," *International immunology*, vol. 22, pp. 113–28, Feb. 2010.
- [77] K. Blease, B. Mehrad, T. J. Standiford, N. W. Lukacs, J. Gosling, L. Boring, I. F. Charo, S. L. Kunkel, and C. M. Hogaboam, "Enhanced pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR2<sup>-/-</sup> mice.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 165, pp. 2603–11, Sept. 2000.
- [78] Y. Kim, Sung Ss, W. A. Kuziel, S. Feldman, S. M. Fu, and C. E. Rose, "Enhanced airway Th2 response after allergen challenge in mice deficient in CC chemokine receptor-2 (CCR2).," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 166, pp. 5183–92, Apr. 2001.
- [79] B. Lagu, C. Gerchak, M. Pan, C. Hou, M. Singer, R. Malaviya, M. Matheis, G. Olini, D. Cavender, and M. Wachter, "Potent and selective CC-chemokine receptor-2 (CCR2) antagonists as a potential treatment for asthma.," *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 17, pp. 4382–6, Aug. 2007.
- [80] I. Sabroe, A. Hartnell, L. A. Jopling, S. Bel, P. D. Ponath, J. E. Pease, P. D. Collins, and T. J. Williams, "Differential regulation of eosinophil chemokine signaling via CCR3 and non-CCR3 pathways.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 162, pp. 2946–55, Mar. 1999.
- [81] J. R. White, C. Imburgia, E. Dul, E. Appelbaum, K. O'Donnell, D. J. O'Shannessy, M. Brawner, J. Fornwald, J. Adamou, N. A. Elshourbagy, K. Kaiser, J. J. Foley, D. B. Schmidt, K. Johanson, C. Macphee, K. Moores, D. McNulty, G. F. Scott, R. P. Schleimer, and H. M. Sarau, "Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 62, pp. 667–75, Nov. 1997.
- [82] P. C. Fulkerson, C. A. Fischetti, M. L. McBride, L. M. Hassman, S. P. Hogan, and M. E. Rothenberg, "A central regulatory role for eosinophils and the eotaxin/CCR3 axis in chronic experimental allergic airway inflammation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, pp. 16418–23, Oct. 2006.
- [83] S. Ying, Q. Meng, K. Zeibecoglou, D. S. Robinson, A. Macfarlane, M. Humbert, and A. B. Kay, "Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 163, pp. 6321–9, Dec. 1999.
- [84] P. Joubert, S. Lajoie-Kadoch, I. Labonté, A. S. Gounni, K. Maghni, V. Wellemans, J. Chakir, M. Laviolette, Q. Hamid, and B. Lamkhioued, "CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 175, pp. 2702–8, Aug. 2005.
- [85] D. M. Conroy, L. A. Jopling, C. M. Lloyd, M. R. Hodge, D. P. Andrew, T. J. Williams, J. E. Pease, and I. Sabroe, "CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 74, pp. 558–63, Oct. 2003.
- [86] Y. Fuchimoto, A. Kanehiro, N. Miyahara, H. Koga, G. Ikeda, K. Waseda, Y. Tanimoto, S. Ueha, M. Kataoka, E. W. Gelfand, and M. Tanimoto, "Requirement for chemokine receptor 5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 45, pp. 1248–55, Dec. 2011.
- [87] C. D. Chung, F. Kuo, J. Kumer, A. S. Motani, C. E. Lawrence, W. R. Henderson, and C. Venkataraman, "CCR8 is not essential for the development of inflammation in a mouse model of allergic airway disease.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 170, pp. 581–7, Jan. 2003.
- [88] N. W. Lukacs, A. Berlin, D. Schols, R. T. Skerlj, and G. J. Bridger, "AMD3100, a CxCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity.," *The American journal of pathology*, vol. 160, pp. 1353–60, Apr. 2002.
- [89] O. Kalayci, L. A. Sonna, P. G. Woodruff, C. A. Camargo Jr., A. D. Luster, C. M. Lilly, and C. A. Camargo, "Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma.," *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma*, vol. 41, pp. 27–33, Feb. 2004.
- [90] R. A. Taha, E. M. Minshall, D. Miotto, A. Shimbara, A. Luster, J. C. Hogg, and Q. A. Hamid, "Eotaxin and monocyte chemotactic protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals.," *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 103, pp. 476–83, Mar. 1999.

- [91] O. Kalayci, E. Birben, L. Wu, T. Oguma, K. Storm Van's Gravesande, V. Subramaniam, H. K. Sheldon, E. S. Silverman, and C. M. Lilly, "Monocyte chemoattractant protein-4 core promoter genetic variants: influence on YY-1 affinity and plasma levels.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 29, pp. 750–6, Dec. 2003.
- [92] S. Ying, D. S. Robinson, Q. Meng, L. T. Barata, A. R. McEuen, M. G. Buckley, A. F. Walls, P. W. Askenase, and A. B. Kay, "C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue eosinophilia, and relationshi," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 163, pp. 3976–84, Oct. 1999.
- [93] A. Mantovani, R. Bonecchi, and M. Locati, "Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 6, pp. 907–18, Dec. 2006.
- [94] M. Wolf, S. Albrecht, and C. Märki, "Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions.," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 40, pp. 1185–98, Jan. 2008.
- [95] R. A. Dean, J. H. Cox, C. L. Bellac, A. Doucet, A. E. Starr, and C. M. Overall, "Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx," *Blood*, vol. 112, no. 8, pp. 3455–3464, 2008.
- [96] C. R. Mackay, "Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies.," *Nature immunology*, vol. 9, pp. 988–98, Sept. 2008.
- [97] J. E. Pease and R. Horuk, "Small molecule antagonists of chemokine receptors—is promiscuity a virtue?," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 10, pp. 1351–8, Jan. 2010.
- [98] J. Elsner, Y. Dulkys, S. Gupta, S. E. Escher, W.-G. Forssmann, A. Kapp, and U. Forssmann, "Differential pattern of CCR1 internalization in human eosinophils: prolonged internalization by CCL5 in contrast to CCL3.," *Allergy*, vol. 60, pp. 1386–93, Nov. 2005.
- [99] B. Moser, B. Dewald, L. Barella, C. Schumacher, M. Baggiolini, and I. Clark-Lewis, "Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, pp. 7125–8, Apr. 1993.
- [100] J. Elsner, H. Petering, R. Höchstetter, D. Kimmig, T. N. Wells, A. Kapp, and A. E. Proudfoot, "The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3.," *European journal of immunology*, vol. 27, pp. 2892–8, Nov. 1997.
- [101] M. Mack, B. Luckow, P. J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P. R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T. N. Wells, D. Schlöndorff, and A. E. Proudfoot, "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 187, pp. 1215–24, Apr. 1998.
- [102] A. E. Proudfoot, R. Buser, F. Borlat, S. Alouani, D. Soler, R. E. Offord, J. M. Schröder, C. A. Power, and T. N. Wells, "Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, pp. 32478–85, Nov. 1999.
- [103] A. E. Proudfoot, S. Fritchley, F. Borlat, J. P. Shaw, F. Vilbois, C. Zwahlen, A. Trkola, D. Marchant, P. R. Clapham, and T. N. Wells, "The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, pp. 10620–6, Apr. 2001.
- [104] S. Gupta, G. Erdmann, S. Schulz-Maronde, S. E. Escher, R. Richter, W. G. Forssmann, J. Elsner, and U. Forssmann, "n-Nonanoyl-CCL14 (NNY-CCL14), a novel inhibitor of allergic airway inflammation is a partial agonist of human CCR2.," *Allergy*, vol. 63, pp. 1317–23, Oct. 2008.
- [105] S. Gupta, S. Rieder, R. Richter, S. Schulz-Maronde, J. Manns, S. E. Escher, A. Heitland, M. Mack, W.-G. Forssmann, J. Elsner, and U. Forssmann, "CCR1- and CCR5-mediated inactivation of leukocytes by a nonglycosaminoglycan (non-GAG)-binding variant of n-nonanoyl-CCL14 (NNY-CCL14).," *Journal of leukocyte biology*, vol. 88, pp. 383–92, Aug. 2010.
- [106] I. C. Severin, A. L. S. Souza, J. H. Davis, N. Musolino, M. Mack, C. A. Power, and A. E. I. Proudfoot, "Properties of 7ND-CCL2 are modulated upon fusion to Fc.," *Protein engineering, design & selection : PEDS*, vol. 25, pp. 213–22, May 2012.

- [107] Y. J. Zhang, B. J. Rutledge, and B. J. Rollins, "Structure/activity analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis. Identification of a mutated protein that inhibits MCP-1-mediated monocyte chemotaxis.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, pp. 15918–24, June 1994.
- [108] S. Pertuz Belloso, P. Ostoa Saloma, I. Benitez, G. Soldevila, A. Olivos, and E. Garcia-Zepeda, "Entamoeba histolytica cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines," *Parasite Immunol*, vol. 26, no. 5, pp. 237–241, 2004.
- [109] Benítez-Hernández, "Proteolytic cleavage of chemokines by Trypanosoma cruzi's cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists.," *Immunobiology*, vol. 215, pp. 413–26, May 2010.
- [110] E. Mendez-Enriquez, Y. Melendez, F. Martinez, G. Baay, S. Huerta-Yepez, C. Gonzalez-Bonilla, T. I. Fortoul, G. Soldevila, and E. A. Garcia-Zepeda, "CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation," *Clin Exp Immunol*, vol. 152, no. 2, pp. 354–363, 2008.
- [111] F. Martinez-Becerra, D. A. Silva, L. Dominguez-Ramirez, G. Mendoza-Hernandez, Y. Lopez-Vidal, G. Soldevila, and E. A. Garcia-Zepeda, "Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-derived peptide (CDAP-4) on Pseudomonas aeruginosa," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 355, no. 2, pp. 352–358, 2007.
- [112] Vargas Becerra, "Epidemiología del asma," *Neumología y cirugiadel torax*, vol. 68, no. 2, pp. 91–97, 2009.
- [113] R. Godiska, D. Chantry, C. J. Raport, V. L. Schweickart, H. L. Trong, and P. W. Gray, "Monocyte chemotactic protein-4: tissue-specific expression and signaling through CC chemokine receptor-2.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 61, pp. 353–60, Mar. 1997.
- [114] S. Huerta-Yepez, G. J. Baay-Guzman, R. Garcia-Zepeda, R. Hernandez-Pando, M. I. Vega, C. Gonzalez-Bonilla, and B. Bonavida, "2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model.," *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, vol. 129, pp. 313–24, Nov. 2008.
- [115] K. D. Dyer, J. M. Moser, M. Czapiga, S. J. Siegel, C. M. Percopo, and H. F. Rosenberg, "Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 181, pp. 4004–4009, Sept. 2008.
- [116] S. Swain, D. Mondal, S. Beg, C. N. Patra, S. C. Dinda, J. Sruti, and M. E. B. Rao, "Stabilization and Delivery Approaches for Protein and Peptide Pharmaceuticals: An extensive review of patents.," *Recent patents on biotechnology*, Feb. 2013.
- [117] X. Liang, "CXCR4, inhibitors and mechanisms of action.," *Chemical biology & drug design*, vol. 72, pp. 97–110, Aug. 2008.
- [118] N. London, D. Movshovitz-Attias, and O. Schueler-Furman, "The structural basis of peptide-protein binding strategies.," *Structure (London, England : 1993)*, vol. 18, pp. 188–99, Feb. 2010.
- [119] A. Fernández, L. R. Scott, and H. A. Scheraga, "Amino Acid Residues at Protein–Protein Interfaces: Why Is Propensity so Different from Relative Abundance?," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, pp. 9929–9932, Sept. 2003.
- [120] E. L. Wise, C. Duchesnes, P. C. A. da Fonseca, R. A. Allen, T. J. Williams, and J. E. Pease, "Small molecule receptor agonists and antagonists of CCR3 provide insight into mechanisms of chemokine receptor activation.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, pp. 27935–43, Sept. 2007.
- [121] Y. A. Berchiche, S. Gravel, M.-E. Pelletier, G. St-Onge, and N. Heveker, "Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2b ligands on beta-arrestin recruitment, G $\alpha$ i signaling, and receptor internalization.," *Molecular pharmacology*, vol. 79, pp. 488–98, Mar. 2011.
- [122] S. Rajagopal, J. Kim, S. Ahn, S. Craig, C. M. Lam, N. P. Gerard, C. Gerard, and R. J. Lefkowitz, "Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy receptor CXCR7.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 628–32, Jan. 2010.
- [123] P. Ogilvie, S. Thelen, B. Moepps, P. Gierschik, A. C. da Silva Campos, M. Baggiolini, and M. Thelen, "Unusual chemokine receptor antagonism involving a mitogen-activated protein kinase pathway.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 172, pp. 6715–22, June 2004.
- [124] C. G. Persson and L. Uller, "Resolution of cell-mediated airways diseases.," *Respiratory research*, vol. 11, p. 75, Jan. 2010.

- [125] L. Uller, C. G. Persson, L. Källström, and J. S. Erjefält, “Lung tissue eosinophils may be cleared through luminal entry rather than apoptosis: effects of steroid treatment.,” *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 164, pp. 1948–56, Nov. 2001.
- [126] P. M. Hansbro, G. E. Kaiko, and P. S. Foster, “Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma?,” *British journal of pharmacology*, vol. 163, pp. 81–95, May 2011.
- [127] R. M. Phillips, V. E. L. Stubbs, M. R. Henson, T. J. Williams, J. E. Pease, and I. Sabroe, “Variations in eosinophil chemokine responses: an investigation of CCR1 and CCR3 function, expression in atopy, and identification of a functional CCR1 promoter.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 170, pp. 6190–201, June 2003.
- [128] I. Sabroe, M. J. Peck, B. J. Van Keulen, A. Jorritsma, G. Simmons, P. R. Clapham, T. J. Williams, and J. E. Pease, “A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry,” *J Biol Chem*, vol. 275, no. 34, pp. 25985–25992, 2000.
- [129] D. M. Mosser and J. P. Edwards, “Exploring the full spectrum of macrophage activation.,” *Nature reviews. Immunology*, vol. 8, pp. 958–69, Dec. 2008.
- [130] “CCR3 is a therapeutic and diagnostic target for neovascular age-related macular degeneration.”
- [131] R. D. Ye, “Regulation of nuclear factor  $\kappa$ B activation by G-protein-coupled receptors,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 70, pp. 839–848, Dec. 2001.
- [132] J. Fan, F. T. Ishmael, X. Fang, A. Myers, C. Cheadle, S.-K. Huang, U. Atasoy, M. Gorospe, and C. Stellato, “Chemokine transcripts as targets of the RNA-binding protein HuR in human airway epithelium.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 186, pp. 2482–94, Feb. 2011.
- [133] L. Xu, R. Rahimpour, L. Ran, C. Kong, A. Biragyn, J. Andrews, M. Devries, J. M. Wang, and D. J. Kelvin, “Regulation of CCR2 chemokine receptor mRNA stability.,” *Journal of leukocyte biology*, vol. 62, pp. 653–60, Nov. 1997.
- [134] U. Atasoy, S. L. Curry, I. Lopez de Silanes, A.-B. Shyu, V. Casolaro, M. Gorospe, and C. Stellato, “Regulation of Eotaxin Gene Expression by TNF- $\alpha$  and IL-4 Through mRNA Stabilization: Involvement of the RNA-Binding Protein HuR,” *J. Immunol.*, vol. 171, pp. 4369–4378, Oct. 2003.
- [135] G. T. Kampen, S. Stafford, T. Adachi, T. Jinquan, S. Quan, J. A. Grant, P. S. Skov, L. K. Poulsen, and R. Alam, “Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases.,” *Blood*, vol. 95, pp. 1911–7, Mar. 2000.
- [136] C.-H. Woo, D. T. Jeong, S.-B. Yoon, K.-S. Kim, I. Y. Chung, T. Saeki, and J.-H. Kim, “Eotaxin induces migration of RBL-2H3 mast cells via a Rac-ERK-dependent pathway.,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 298, pp. 392–7, Nov. 2002.
- [137] B. N. Lambrecht and H. Hammad, “The airway epithelium in asthma.,” *Nature medicine*, vol. 18, pp. 684–92, May 2012.

## 10 Artículos publicados



## A CCL chemokine-derived peptide (CDIP-2) exerts anti-inflammatory activity via CCR1, CCR2 and CCR3 chemokine receptors: Implications as a potential therapeutic treatment of asthma

E. Méndez-Enríquez<sup>a,b</sup>, J. Medina-Tamayo<sup>a,b</sup>, G. Soldevila<sup>b</sup>, T.I. Fortoul<sup>c</sup>, B. Anton<sup>d</sup>, L. Flores-Romo<sup>e</sup>, E.A. García-Zepeda<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> CBRL, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

<sup>d</sup> Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, México, D.F., México

<sup>e</sup> Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México, D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 January 2014

Received in revised form 29 January 2014

Accepted 30 January 2014

Available online 20 February 2014

#### Keywords:

Chemokines

Allergic airway inflammation

Chemotaxis

CCL13/MCP-4

CCR3

Chemokine receptors

### ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease characterized by the accumulation of eosinophils, Th2 cells and mononuclear cells in the airways, leading to changes in lung architecture and subsequently reduced respiratory function. We have previously demonstrated that CDIP-2, a chemokine derived peptide, reduced in vitro chemotaxis and decreased cellular infiltration in a murine model of allergic airway inflammation. However, the mechanisms involved in this process have not been identified yet. Now, we found that CDIP-2 reduces chemokine-mediated functions via interactions with CCR1, CCR2 and CCR3. Moreover, using bone marrow-derived eosinophils, we demonstrated that CDIP-2 modifies the calcium fluxes induced by CCL11 and down-modulated CCR3 expression. Finally, CDIP-2 treatment in a murine model of OVA-induced allergic airway inflammation reduced leukocyte recruitment and decreases production of cytokines. These data suggest that chemokine-derived peptides represent new therapeutic tools to generate more effective antiinflammatory drugs.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Asthma is a chronic disease characterized by an influx of inflammatory cells into the airways, airway hyperresponsiveness, bronchoconstriction and airway remodeling. Leukocytes recruited into the airways are mainly eosinophils, mast cells and activated T helper-2 cells. These cells generate a rich inflammatory microenvironment through secretion of cytokines and chemokines that have an important regulatory function [1].

Chemokines are low molecular weight chemotactic cytokines that drive several biological processes that are involved in homeostasis and disease [2]. They have been classified into four groups according to characteristics of the conserved cysteine in the NH<sub>2</sub>-termini (CC, CXC, CX3C and C). Chemokines activate biological functions by binding to seven transmembrane domains G protein coupled receptors (7-TM GPCR) that are sensitive to pertussis toxin [3]. A number of chemokines have been associated with the asthmatic phenotype; among them are CCR3 ligands that are key inducers of eosinophilia [4]. One of these

chemokines, CCL13/MCP-4, that belongs to the chemokine subgroup known as the MCP (*monocyte chemoattractant proteins*), shares more than 60% amino acid identity with the other members of the of MCP family and CCL11/eotaxin [5]. In addition to CCR1 and CCR2, CCL13 binds to CCR3 with high affinity becoming one of the most important eosinophil chemoattractants. Also, CCL13 induces several hallmarks of asthma, such as eosinophil degranulation, histamine release from basophils, pro-inflammatory cytokine secretion and adhesion molecule over-expression [6–10]. Despite the increased knowledge about the interaction between chemokine ligands and their receptors, the amino acid sequence of CCL13 leading to receptor activation remains unknown. Finding these sequences may be of relevance not only to further understand the mechanisms involved in these interactions but also to propose novel agonists or antagonists to treat chronic inflammatory diseases like asthma. Our group and others have reported that proteolytic cleavage of CCL13 produces antagonistic peptides that could regulate chemotaxis and inflammatory processes in vivo [11–13]. Recently, we reported that CDIP-2 (chemokine derived inhibitory peptide-2), a synthetic peptide derived from the CCL13 sequence, decreases in vitro chemotaxis, reduced the number of total cells in bronchoalveolar lavage (BAL) samples and the peribronchial perivascular infiltrate in an ovalbumin-induced model of allergic lung inflammation [14]. In the current study,

\* Corresponding author at: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico.

E-mail address: [garciaze@servidor.unam.mx](mailto:garciaze@servidor.unam.mx) (E.A. García-Zepeda).



we further evaluated the mechanisms through which CDIP-2 might exert its biological activities. Our *in vitro* studies demonstrated that CDIP-2 reduces chemotaxis towards CCL11 and CCL3 and calcium fluxes in bone marrow-derived murine eosinophils. Additionally, CDIP-2 induces the internalization of CCR1, CCR2 and CCR3 receptors, although it does not evoke G protein dissociation, chemotaxis or MAPK activation. Finally, in a severe murine model of allergic airway inflammation, CDIP-2 treatment decreased the expression of Th2 cytokines and chemokine receptors related to the inflammatory process. Taken together, our data suggest that CDIP-2 acts as a partial agonist with activity against CCR1, CCR2 and CCR3, blocking ligand-mediated functions. We propose that chemokine derived peptides could be used as more effective chemokine receptor blockers.

## 2. Methods

### 2.1. Ethics statement

All experimental procedures involving animals were handled in strict accordance with good animal practices as defined and approved by the Animal Experimental Bio-Ethics Guidelines of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from young healthy volunteers. Informed and written consent was obtained from all healthy volunteers who participated in this study. The protocol was approved by the Human Research Bioethics Committee (CEISHUM) of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

### 2.2. Mice

Six to eight-week-old BALB/c female mice were used in all experiments and maintained under specific-pathogen-free conditions. Water and food were supplied *ad libitum*.

### 2.3. Reagents

Peptides were synthesized by GenScript (USA) using solid-phase synthesis. The amino acid sequence of CDIP-2, *kislqrllksyvittsrpq*, corresponds to residues 19–37 of CCL13. Peptides were dissolved in sterile water in small aliquots of 1 mg/ml and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. Further dilutions were made in sterile saline solution or media as required. PE-Cy5- anti-mouse F480 and PerCP anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr1) antibodies were purchased from BD (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA); anti-Siglec-F-PE was obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti-hCCR1, anti-hCCR2, anti-pERK, and p-p38 antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-hCCR3-PE, anti-mCCR3, and anti-rat IgG-FITC antibodies were obtained from R&D Systems (Minneapolis, USA); and the anti-goat IgG-FITC and anti-rat IgG-HRP secondary antibodies were purchased from Zymed (Carlsbad, CA, USA). Human and murine recombinant chemokines and cytokines were obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Fura-Red, Fluo-3 and Calcein-AM were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Hank's balanced salt solution was purchased from Invitrogen (Piscataway, NJ, USA) and, supplemented with 0.05% endotoxin-free bovine serum albumin from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  was obtained from Perkin Elmer (Waltham, MA). Histopaque 1077 and other reagents (unless specified) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO), Calcein AM was purchased from Invitrogen (Piscataway, NJ, USA), and Power SYBER Green PCR Master Mix was purchased from Applied Biosystems, (Warrington, UK). Chemotaxis chambers and 5  $\mu\text{M}$  or 8  $\mu\text{M}$  polycarbonate membranes were obtained from Neuro Probe, Inc. (Gaithersburg, MD).

### 2.4. Cells

Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC CCL-61) and cultured in DMEM with 0.05 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Research Organics Inc., Cleveland, USA), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Grand Island, NY, USA), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1 mM HEPES (Gibco) and 10% FBS (Gibco) as recommended. The human acute monocytic leukemia cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was grown in RPMI-1640 media (Invitrogen) supplemented with 0.05 mM  $\beta$ -mercaptoethanol as suggested by the provider.

### 2.5. Transfection of CHO cells

CHO cells stably expressing human chemokine receptors were generated by transfection using Lipofectamine (Invitrogen) and selected as suggested by the manufacturer. To generate human CHO-hCCR3 cells, the coding region of hCCR3 receptor (1.1 kb cDNA) was subcloned into the *HindIII-XhoI* sites of the expression vector pcDNA3 (Invitrogen). Transfected cells were selected by culturing in the presence of 1 mg/ml of Geneticin (G418). Also, CHO-hCCR1 cells were generated by cloning the coding region of hCCR1 (2.1 kb) receptor into the *EcoRI-XhoI* sites of the expression vector pCEP4 (Invitrogen). CHO-hCCR2 cells were generated by cloning the coding region (1.2 kb) of the hCCR2 receptor into the *HindIII-BamHI* sites of pcDNA3 (Invitrogen). Transfected cells were selected by culturing under the presence of appropriated drug selection markers. CCR1, 2 and 3; expression was confirmed by PCR and flow cytometry.

### 2.6. Chemotaxis assays

Chemotaxis assays were carried out using modified Boyden's chambers, as described previously with minor modifications [14]. Briefly, in experiments using peptides, cells were preincubated with different peptide concentrations (0–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  prior to the assay. Chemokines (0–1000 ng/ml) were loaded into the lower chamber, which was separated from the cells ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) in the upper chamber by 5  $\mu\text{M}$  (eosinophils, THP-1 cells and PBMCs) or 8  $\mu\text{M}$  (CHO cells) polycarbonate membranes. After a 90 min (eosinophils, THP-1 cells and PBMCs) or 240 min (CHO cells) incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , the membrane was removed. The non-migrating cells were washed away, and the membrane was air-dried; the migrating cells were quantified using a Typhoon scanner system (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). To calculate the chemotactic index, the fluorescence of cells migrated in response to chemokines was divided by the fluorescence of spontaneously migrated cells.

### 2.7. Chemokine receptor down-modulation assay

Chemokine receptor internalization was assessed by the changes in cell surface receptor expression as determined by flow cytometry using monoclonal antibodies against hCCR1, hCCR2 (on THP-1 cells) and hCCR3 (CHO-CCR3) or against mCCR3 (eosinophils). Cells were incubated for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with chemokines or CDIP-2 in 96-well plates containing 50  $\mu\text{l}$  of RPMI culture medium without FBS. Then, cells were washed, incubated with antibodies (primary and fluorescence labeled secondary) and washed again, and the remaining receptor expression was analyzed by FACS as described above. Results are calculated as the geometric median fluorescence of antibody-stained chemokine receptor cells minus the geometric median of secondary antibody control stained chemokine-treated cells. This was expressed as a percentage of the median fluorescence of control medium-treated cells.

## 2.8. [<sup>35</sup>S] GTPγS binding assay

CHO-hCCR3 and CHO-hCCR1 cells were harvested and suspended in GTPγS binding buffer (50 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, pH 7.4,) supplemented with a cocktail of protease inhibitors. The cells were homogenized by repeated passage through a needle for 10 min. The pellet was suspended in GTPγS binding buffer at a final concentration of 250 μg protein/ml. The membrane suspension (25 μg protein) was preincubated with chemokines or peptides in a MultiScreen 96-well plate (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) with [<sup>35</sup>S] GTPγS (0.05 mM) and GDP (10 μM) for 45 min at 30 °C. [<sup>35</sup>S] GTPγS was added at a final concentration of 0.05 nM. After 120 min, the samples were filtered through the MultiScreen 96-well plate and washed three times with 1000 μl of ice-cold incubation buffer. The membranes were removed with the MultiScreen Punch Kit (Millipore) and washed three times with cold buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.5). Radioactivity was determined using scintillation counting. Non-specific binding was measured in the presence of 100 μM unlabelled GTP.

## 2.9. Generation of bone marrow-derived eosinophils

To generate bone marrow-derived eosinophils (BMEos), the previously described protocol was used, with some modifications [15]. Briefly, the tibiae and femurs of female BALB/c mice were opened at both ends. Bone marrow cells were extracted with chilled RPMI-1640 medium, red cells were lysed with 0.80% ammonium chloride solution and 5 × 10<sup>6</sup> BM cells/ml were cultured in RPMI-1640, 20% FBS, supplemented with 100 ng/ml of mSCF (stem cell factor) and 100 ng/ml mFLT3L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand). After 5 days, cells were centrifuged and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10 ng/ml of recombinant mIL-5. After day 12 of culture, cells reached 80% of purity as it was determined by FACS analysis of SiglecF+ and mCCR3 expression. In addition, classical morphology of eosinophils was analyzed by Wright's staining.

## 2.10. Western blot assay

1 × 10<sup>6</sup> BMEos were stimulated with chemokines or peptides and lysed using Laemmli buffer (BioRad); samples were subjected to SDS-PAGE (10% gel) and transferred to PVDF membranes for western blotting analysis. Membranes were incubated with appropriate antibodies followed by HR-peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were visualized using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Densitometric analysis of western blots was performed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD) after normalization with the alpha-actin loading control.

## 2.11. In vitro stimulation of BMEos

BMEos (1 × 10<sup>6</sup> cells per well) were stimulated in vitro with CCL11 (55 nM) or CDIP-2 (4.5 μM) during 18 h. In RPMI-1640 culture medium without FBS. In experiments using CDIP-2, cells were pre-incubated with the peptide before chemokine addition. After stimulation, cells were prepared for RT-PCR and FACS analyses.

## 2.12. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation

Human PBMCs were isolated from the heparinized blood from healthy donors by separation using a Histopaque 1077 (Sigma Chemicals) density gradient. Once separated, cells were washed twice and suspended at 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml in HBSS supplemented with 0.05% BSA prior to functional assays.

## 2.13. Murine airway inflammation model

To induce airway inflammation we followed a previously reported protocol with minor modifications [14]. Briefly, groups of age-matched (6–8 weeks) female BALB/c mice were immunized i.p. on days 0 and 5 with 100 μl of a 10 μg ovalbumin (OVA) suspension in 1 mg of alum (Pierce, NJ, USA). On days 12 and 22 after immunization, mice were challenged intratracheally (i.t) with a solution of 0.75% OVA. Control groups received SS on the same days. On days 23, 24 and 25, mice were treated with an i.t. injection of either peptide (2 mg/kg) or SS. After treatment, mice were sacrificed on day 26, and bronchoalveolar lavages (BALs) were obtained using 4 ml of PBS. Cell suspensions from the BAL were processed, centrifuged and stained with anti-F480, Gr1, CCR1, CCR2, CCR3, CD3, CD4 and Siglec-F antibodies for FACS analysis using a FACSCalibur instrument (BD, New Jersey, USA), and the data were evaluated with FlowJo 8.7 software (Tree Star, Inc.). In addition, BAL and LN cells were analyzed for chemotaxis assays as described above. Levels of IL-4, IL-5, TNF-α, and IL-10 cytokines were measured in BAL supernatants using commercial ELISA kits (ELISA Max™, BioLegend, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions.

## 2.14. Lung tissue processing and histochemical analysis

Mice were euthanized, and the lungs were fixed by i.t. instillation of 1 ml of 90% of ethanol. After fixation, the lungs were embedded in paraffin and processed for analysis. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the cellular infiltrates. H&E-stained paraffin-embedded transversal lung tissue sections were photographed at 20× and 100×. Images from five animals in each group (five fields from each animal) were evaluated using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). Bronchioles were identified by their structure, which is characterized by ducts covered by tall cubical ciliated epithelia surrounded by smooth muscle, while pulmonary vessels were covered by the associated tunica intima, media and adventitia. In each bronchiole, the length in μm from the basal lamina to the external muscle layer was measured, while in the case of the pulmonary vessels, the space between the adventitia and the connective tissue was analyzed.

## 2.15. Real time PCR

Total RNA from cells and tissues was purified with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). cDNA synthesis was performed using 2 μg of total RNA as a template, M-MLV (Promega, Madison, WI, USA) and OligodT (Invitrogen). Real Time PCR was performed using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primer sequences used for amplifications were as follows: TNFα: 5'-GGCAGGTCTACTACTTTG GAGTC-ATTGC-3', 3'-CTTCGAGGCTCCAGTGAATTTCCGG-5'; CCR3: 5-TTCTCA-CCAGGAAGAAACGGA-3', 3'-GGAGGTGACTGAGGTGATTGC-5'; IL-4: 5-TCATCGGCATTTTGAACGAG-3', 3'-CGTTTGGCACATCCATCCATCT CC-5' and β-actin as an internal control gene: 5-GGGTCAGAAGGATTCC TATG-3', 3'-GGTCTCAAACATGATGTGGG-5'. Gene expression analysis was performed relative to β-actin and calculated by using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method [16].

## 2.16. Cytokine determination of MLN stimulated cells

Mediastinal lymph nodes (MLNs) from OVA-sensitized BALB/c mice were excised and triturated into single cells; the resulting cell suspension was filtered through a 40 μm nylon cell strainer. Red cells were eliminated by lysis in 0.80% ammonium chloride and resulting cells were washed with phosphate buffer and suspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS. Approximately 1 × 10<sup>6</sup> cells/well were cultured in RPMI-1640 medium or with 50 μg of OVA in 24 well flat-bottom plates (Costar, NY, USA). CDIP-2 (45 μM) or vehicle was added to culture every other day (24 h). Finally, supernatants were harvested 48 and 72 h after stimulation for determination of IL-4, IL-5,



TNF- $\alpha$ , and IL-10 cytokine levels using commercial ELISA kits (ELISA Max™, BioLegend) following manufacturer's instructions.

### 2.17. Determination of cytosolic free calcium concentration

Cells at a density of  $1 \times 10^7$ /ml in RPMI-1640 or DMEM supplemented with 0.2% of FBS were incubated with 2  $\mu$ M Fura-2 AM and Fluo-3 for 45 min at 37 °C. Cells were then diluted twice the original volume of medium and washed for 40 min at room temperature; then, they were resuspended in serum-free medium and analyzed by flow cytometry (FACScan). The data was analyzed with FlowJo 8.7 software using the Kinetics platform (Tree Star, Inc.). Data were presented as the mean Ca<sup>2+</sup> fluorescence ratio (FL1H/FL3H).

### 2.18. Data analysis

Significant differences between groups were evaluated with GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.) using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison tests for differences between means. The values are reported as SEM. Differences with a p value equal or below 0.05 were considered as statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Antagonist effects of CDIP-2 on chemokine-mediated functions

In this report, we investigate the mechanisms underlying the antagonistic effects of CDIP-2 peptide. As CCL13 binds CCR1, 2 and 3 receptors, we first analyzed the effect of CDIP-2 on PBMC migration towards CCL13, CCL5, CCL3, CCL7 and CCL2 chemokine ligands of CCR1 and CCR2. Using an in vitro chemotaxis assay, we tested the effect of pre-incubating CDIP-2 (0–45  $\mu$ M) to cells prior to the chemotaxis assay. We found that treatment with CDIP-2 significantly reduced cell migration towards CCL13, CCL7, CCL5 and CCL3 but no differences were observed towards CCL2 (Fig. 1C). As expected, CDIP-2 did not affect CXCL12-mediated migration. CDIP-2 did not act as an agonist since it was unable to induce chemotaxis in PBMC even at 45  $\mu$ M (Fig. S1-A). This could suggest that hCCR1 and hCCR2 chemokine receptors might be involved in CDIP-2-mediated effects on PBMC. To further investigate this possibility, the effect of CDIP-2 on hCCR1 and hCCR2 expression was evaluated by flow cytometry. Cells were pre-incubated with CDIP-2 peptide or chemokines and compared with controls. Our results showed that CDIP-2 treatment induced the down-modulation of surface hCCR1 comparable to that induced after incubation with CCL13 and CCL5 chemokines (Fig. 1A). Interestingly CDIP-2 treatment reduced the levels of hCCR2 at the cell surface although it was not able to affect chemotaxis towards CCL2 (Fig. 1A).

Next, we analyzed the effects of CDIP-2 treatment on CCR3-mediated functions using CHO-hCCR3 cells. As before, a chemotaxis assay was performed by incubating these cells with CDIP-2 (0–45  $\mu$ M) either prior or during the chemotaxis assay. We observed a significant reduction in chemotaxis towards CCL13 or CCL11 (55 nM) under all these conditions (Fig. 1D). As it was observed with hCCR1 and hCCR2, CDIP-2 did not exert chemotactic activity via hCCR3 (Fig. S1-C). Likewise, we analyzed the effect of CDIP-2 treatment on the internalization of the CCR3 receptor by flow cytometry. A significant reduction in internalization after peptide incubation was determined (Fig. 1B), although this effect was lower than that obtained for CCR1 and CCR2 but these different results could be related with the machinery internalization between cell lines. In addition, we analyzed whether the observed effect of CDIP-2 could also affect the non-CC chemokine receptor hCXCR4. Our data showed no differences in the levels of expression of surface CXCR4 after CDIP-2 treatment (Fig. S2). Taken together, these findings suggest that CDIP-2 effects on chemotaxis may be caused by down-modulation of chemokine receptor expression rather than just

blocking chemokine–chemokine receptor interactions. In addition, the effects of CDIP-2 on hCCR3-mediated functions including chemotaxis and receptor internalization suggest that this mechanism may also occur in vivo.

To further characterize the effects of CDIP-2 on chemokine receptor activation, calcium flux assays were carried out in CHO-hCCR1, CHO-hCCR2 and CHO-hCCR3 transfected cells. Interestingly, we found that pre-incubation of CDIP-2 (45  $\mu$ M) was unable of reducing intracellular calcium fluxes induced by CCL3-stimuli in CHO-hCCR1 cells (Fig. 2A) as well as by CCL2 and CCL13 chemokines in CHO-hCCR2 transfectants (Fig. 2B). In contrast, in CHO-hCCR2 cells, CDIP-2 caused a reduction in calcium flux release in response to CCL13. These data are consistent with the above observation that CDIP-2 reduces in vitro chemotaxis towards CCL13 but not towards CCL2 in PBMCs (Fig. 1A) and CHO-hCCR2 cells. Finally, CDIP-2 (45  $\mu$ M) induced a reduction in the levels of calcium fluxes in CHO-hCCR3 in response to CCL11 or CCL13 chemokines; as expected, CDIP-2 alone did not show any effect (Fig. 2C).

### 3.2. CDIP-2 reduces chemokine-induced [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding

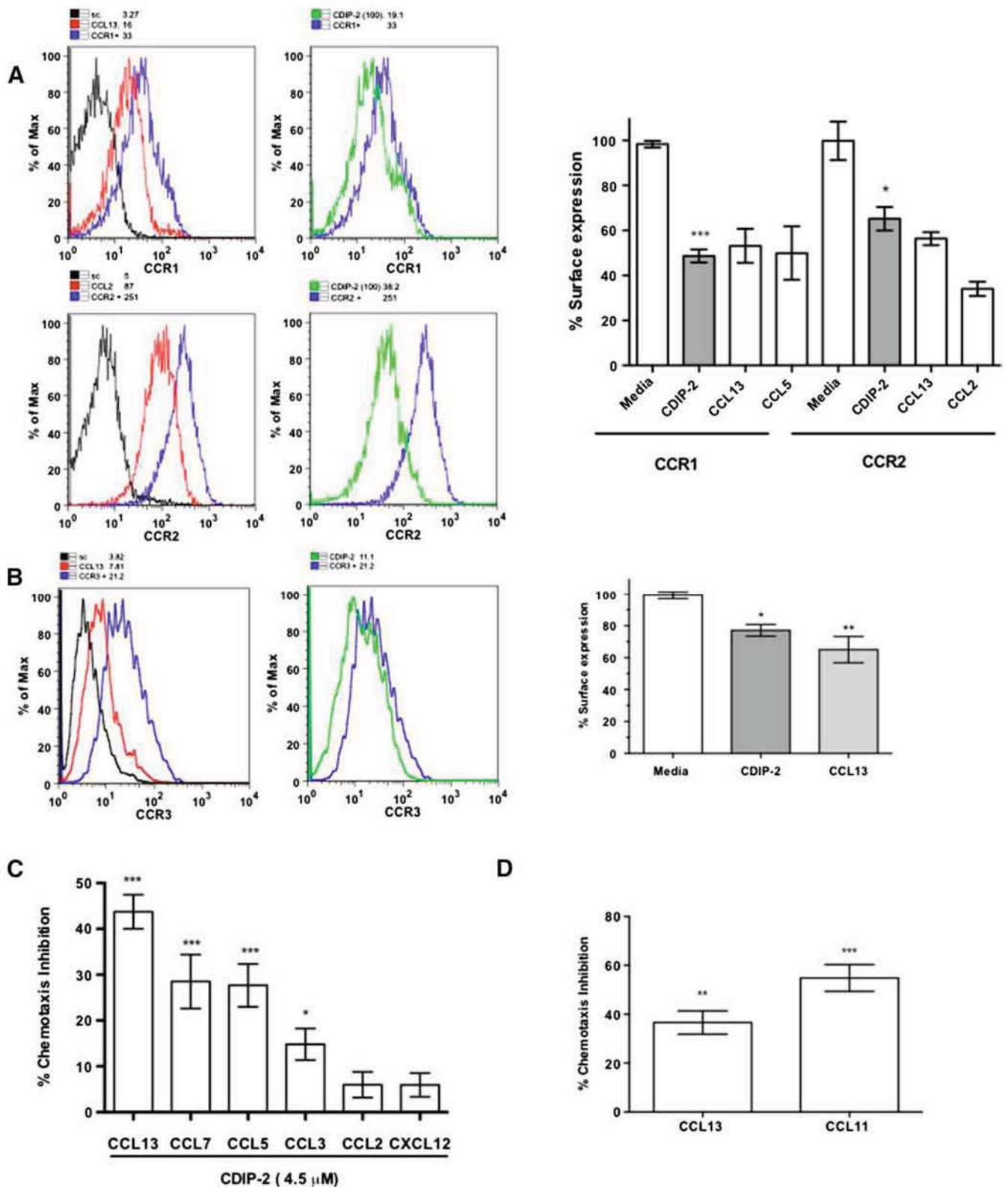
Once we identified that CDIP-2 had effects on several chemokine-mediated functions through CCR1 and CCR3 receptors, we sought to determine whether it would also affect G protein activation upon chemokine stimulation using a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation assay. This assay measures the degree of G-protein dissociation induced after chemokine receptor stimulation. To achieve our objective, crude membrane preparations from CHO-hCCR3 and CHO-hCCR1 cells were incubated with CDIP-2 (45  $\mu$ M) alone or prior to chemokine addition. As shown in Fig. 3A, CDIP-2-treated membranes from CHO-hCCR3 cells showed less [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation compared to those induced by CCL13 (10 nM) (Fig. 3A) or CCL11 (10 nM) (Fig. 3B). When CHO-hCCR1 cell membranes were analyzed, CDIP-2 reduced G-protein dissociation induced by CCL13 (Fig. 3C) but not by CCL3 (10 nM) (Fig. 3D) or other CCR1 ligands, such as CCL7 and CCL5 (data not shown). These findings support the hypothesis that CDIP-2 differentially modulates chemokine-mediated functions without evoking G-protein dissociation. Thus, its activity could be related to the G protein-independent internalization of CCR1 and CCR3.

### 3.3. CDIP-2 regulates activation of BMEos

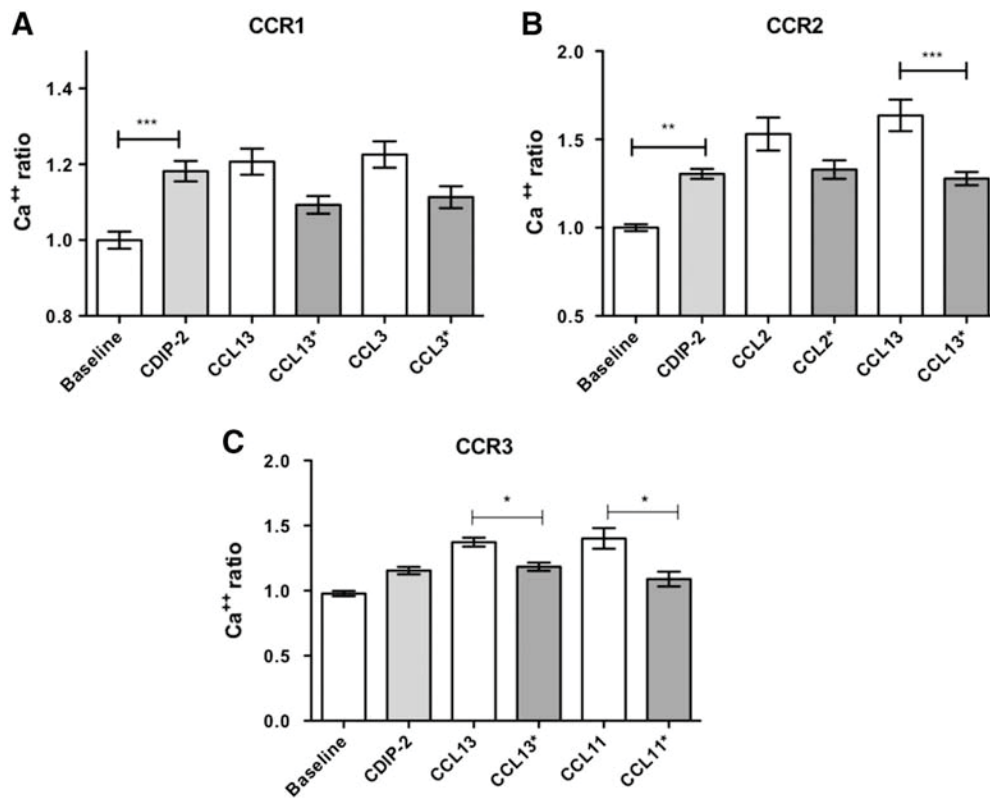
Since CDIP-2 displayed modulatory effects on hCCR3-CHO cells, we next investigated whether CDIP-2 had any effect on primary eosinophil cells due to its involvement in allergic airway inflammation and chosen bone marrow derived eosinophils (BMEos) as study population. After 12 days of culture, the BM cells contained 80% of Siglec-F<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup> cells (Fig. S3) and exhibited typical eosinophil morphology as determined by the Wright–Giemsa staining. Next, we analyzed the effects of CDIP-2 (4.5  $\mu$ M) treatment on chemokine-mediated responses in BMEo cells. Analysis of chemotaxis assays showed that CDIP-2 significantly affected migration induced by mCCL11, mCCL3 and mCCL5, but not in response to CCL24 treatment (Fig. 4A), and did not exert chemotactic properties in BMEos (Fig. S4). Besides, CDIP-2 (45  $\mu$ M) reduced significantly the release of intracellular calcium induced by mCCL11 (100 nM) (Fig. 4B). We also tested the effect of CDIP-2 treatment on CCR3 receptor internalization after mCCL11 stimulation.

A significant reduction (>50%) in CCR3 internalization was observed after peptide treatment (Fig. 4C). As activation of eosinophils during allergic airway inflammation includes secretion of pro-inflammatory cytokines; development of antagonists targeting these molecules became crucial. Indeed, when BMEos were stimulated in vitro with mCCL11 (55 nM) for 18 h, TNF- $\alpha$  gene expression was enhanced that CDIP-2 treatment reduced it (Fig. 4D).

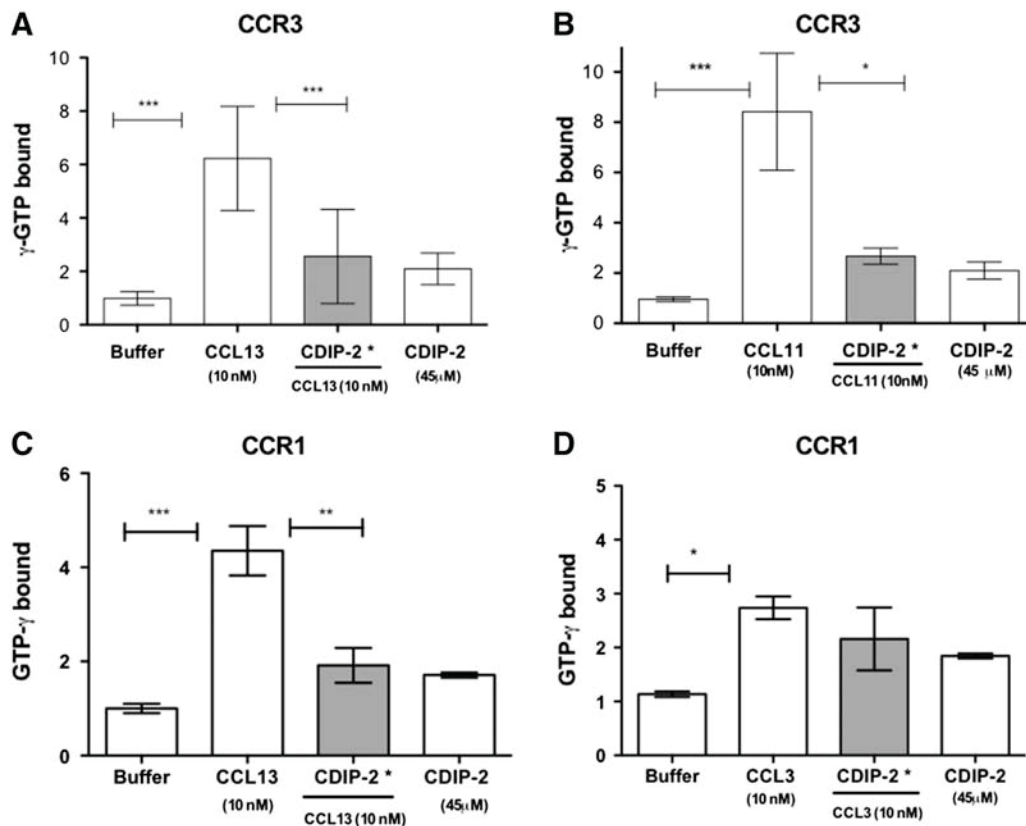
Additionally, we also tested the effects of CDIP-2 treatment on CCR3 gene expression after chemokine stimulation. We found that CCR3 expression was substantially reduced by CDIP-2 treatment.



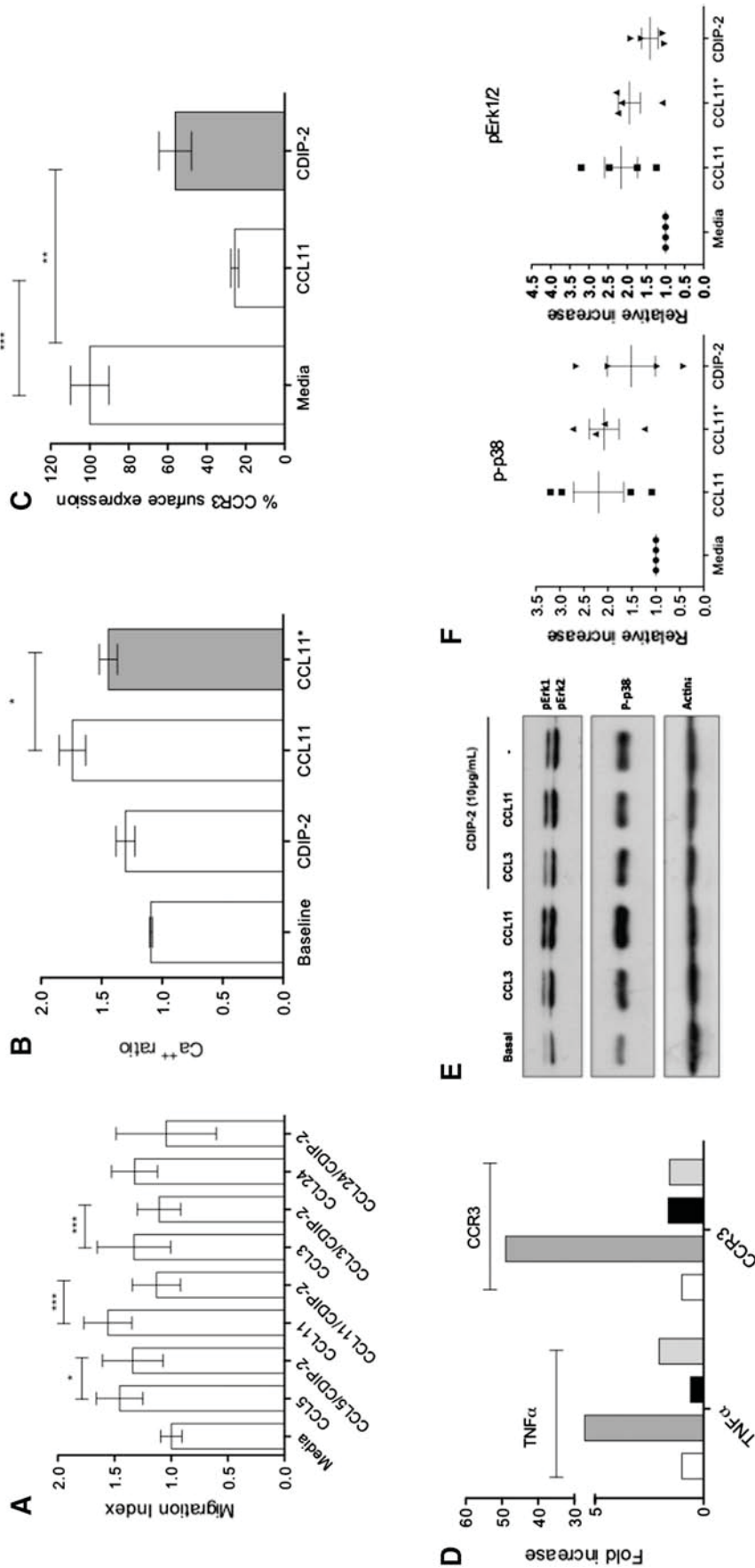
**Fig. 1.** CDIP-2 induces chemokine receptor internalization and reduces chemotaxis towards CC chemokines. Analysis of the effect of CDIP-2 on chemokine receptor internalization and chemotaxis on PBMC, THP-1 and hCHO-CCR3 cells. **A.** Representative histograms showing results from flow cytometry analysis of surface expression of chemokine receptors on THP-1 cells after incubation with CDIP-2 (45  $\mu$ M) or chemokines (55 nM). The data is displayed as % of surface receptor expression (CCR1, n = 4; CCR2, n = 8), sc (secondary antibody control), CCR1 + /CCR2 + (% receptor expression in untreated cells). **B.** Representative histograms showing surface expression of hCCR3 on hCHO-CCR3 cells after incubation with CDIP-2 (45  $\mu$ M) or chemokines (55 nM). The data is displayed as % of surface hCCR3 expression (n = 3). **C.** Peripheral blood mononuclear cells were purified and incubated in the presence of 4.5  $\mu$ M of CDIP-2 prior to the chemotaxis assay. Chemokines were tested at 55 nM; the data were expressed as the percentage of inhibition of migration with agonist treatment alone defined as 100% (n = 5). **D.** The chemotaxis induced by CCL11 and CCL13 decreases in the presence of CDIP-2. hCHO-CCR3 cells were pre-incubated with CDIP-2 (4.5  $\mu$ M). Chemokines were tested at 55 nM. The data are expressed as the percentage of inhibition relative to agonist treatment alone. Only 4.5  $\mu$ M is shown (n = 3). The data were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's comparison test (\*\*\*p < 0.0001, \*\*p < 0.001, \*p < 0.05).



**Fig. 2.** CDIP-2 has effects on chemokine-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> fluxes. Intracellular [Ca<sup>2+</sup>] changes in transfected CHO cells after stimulation with chemokines or CDIP-2 pretreatment (45  $\mu$ M)\* followed by chemokine (55 nM) stimulation. The [Ca<sup>2+</sup>] ratio reflected by the Fluo3-Ca<sup>2+</sup> and Fura red-Ca<sup>2+</sup> complexes was analyzed using the FlowJo kinetics platform. The data were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's comparison test (\*\*\* $p$  < 0.0001, \*\* $p$  < 0.05, \* $p$  < 0.02). A. CCR1,  $n$  = 3; B. CCR2,  $n$  = 8; C. CCR3,  $n$  = 6.



**Fig. 3.** CDIP-2 reduces [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation induced by chemokines. Membranes of CHO cells transfected with hCCR3 (A–B) and hCCR1 were incubated with [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S in the presence (0–45  $\mu$ M) of CDIP-2 prior to the addition of 10 nM chemokines (\*) and then analyzed for bound [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's comparison test (\*\*\* $p$  < 0.0001, \*\* $p$  < 0.05, \* $p$  < 0.028). CCR3/CCL13,  $n$  = 3; CCR3/CCL11,  $n$  = 3; CCR1, CCL13,  $n$  = 3.



**Fig. 4.** CDIP-2 reduces BMEo activation via CCR3 down-modulation. **A.** Chemotaxis assays with BMEos were performed as described in **Methods**. Cells were preincubated with CDIP-2 (4.5  $\mu$ M), and chemokines were applied at 55 nM. Data is expressed as the percentage of inhibition relative to agonist treatment alone. **B.** Analysis of CDIP-2 treatment on calcium fluxes by FACS. Intracellular  $[Ca^{2+}]$  changes were determined after stimulation with chemokines (100 nM) or after pre-treatment with CDIP-2\* (45  $\mu$ M) followed by chemokine stimulation. The  $[Ca^{2+}]$  flux was calculated as described in **Methods** (n = 5). **C.** Analysis of chemokine receptor expression in BMEos after CDIP-2 treatment by flow cytometry. BMEos ( $2.5 \times 10^5$ ) cells were incubated for 45 min at 37  $^{\circ}$ C with chemokines or CDIP-2 and analyzed by flow cytometry (n = 4). **D.** Analysis of gene expression by qRT-PCR. BMEos ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated with 55 nM of CCL11 for 18 h (CCL11<sup>+</sup>), with or without CDIP-2 pre-incubation (4.5  $\mu$ M). Then, qRT-PCR was performed to determine CCR3 and TNF- $\alpha$  gene expression and reported as described in **Methods**. The graph shows a representative experiment (n = 4). **E-F.** Analysis of MAP kinases and p38 activation by CDIP-2 treatment. BMEos ( $1 \times 10^6$  cells) were stimulated with CCL11 (55 nM), CDIP-2 (4.5  $\mu$ M) or preincubated with CCL11 (55 nM), CDIP-2 (4.5  $\mu$ M) before CCL11 (55 nM) stimulation (CCL11<sup>+</sup>). Cells were analyzed for pErk1/2 and p38 phosphorylation by western blotting and quantified as described in **Methods** (n = 4). (\*\*\*p < 0.0001, \*\*p < 0.001, \*p < 0.05).



CDIP-2 (4.5  $\mu\text{M}$ ) treatment alone has no effect on CCR3 or TNF- $\alpha$  gene expression (Fig. 4D). Once it was shown that CDIP-2 treatment might be acting through CCR3 receptor on BMEos, we analyzed whether this peptide could also affect any of the multiple signaling pathways activated by CCR3 [13]. Initially, we have analyzed the MAP kinases and p38 activation pathways. MAPK has been associated with eosinophil activation via CCR3; therefore the use of specific MAPK inhibitors may have an impact in asthma development. Our results demonstrated that CDIP-2 (4.5  $\mu\text{M}$ ) treatment before mCCL11 stimulation of BMEos induced slightly significant differences in Erk1/2 activation; in contrast, non-significant differences were determined in p38 activation (Fig. 4E–F).

Although non-conclusive, these results may indicate that eosinophil activation pathways such as MAPK are involved in CDIP-2 inhibitory effects; although other pathways might also be involved.

### 3.4. CDIP-2 reduces airway inflammation responses in vivo

A murine model of OVA-induced severe allergic airway inflammation was used to test the in vivo effects of CDIP-2. Initially, we analyzed the lung tissues and BAL cells obtained from OVA-challenged and peptide-treated mice by histological analysis and flow cytometry. Histological analysis of H&E stained lung tissues from OVA-challenged mice (Fig. 5B) showed that CDIP-2 treatment reduced inflammation in both the perivascular and peribronchial areas (Fig. 5A). Interestingly, a significant reduction in the number of total BAL cells was found in peptide-treated mice as compared with the saline treated group (Fig. 6A). Analysis of BAL cells from the CDIP-2 treated mice showed a reduction in the number of double positive F480+/CCR1+, F480+/CCR2+ macrophages (M) as well as CCR3+/Siglec-F+ eosinophils (E) compared to controls (Fig. 5B–C).

We also analyzed the effects of CDIP-2 treatment on the expression of OVA specific antibodies and cytokines in the serum and BAL. Similar levels of anti OVA IgE, IgG1 or IgG2a-specific antibodies were found in the serum and BAL in treated and untreated groups (data not shown). TNF- $\alpha$  and IL-4 were reduced after CDIP-2 treatment (Fig. 6D); in contrast, the effects on IL-5 or IL-10 were not statistically significant (data not shown).

### 3.5. CDIP-2 inhibits cytokine expression in OVA-stimulated lymph node cells

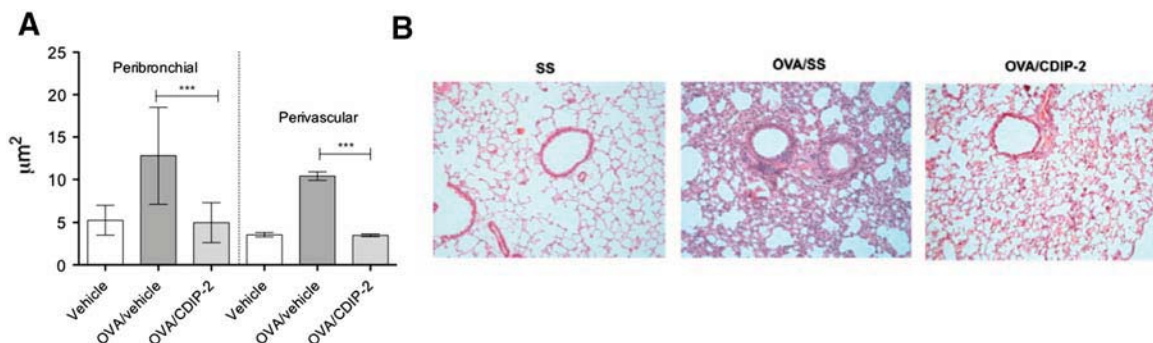
To investigate whether CDIP-2 could modify expression of cytokines after antigen challenge, we performed an ex-vivo analysis of mediastinal lymph nodes cells of mice previously immunized with OVA. After four days of in vitro stimulation with OVA in the presence of CDIP-2, we found a reduction in the levels of IL-5 (Fig. 7A), IL-4 (Fig. 7B), IL-10 (Fig. 7C) and TNF- $\alpha$  (Fig. 7D) cytokines in the supernatants of stimulated cells. Thus, CDIP-2 may act as a modulator of in vitro and in vivo chemokine-mediated inflammatory Th-2 type responses.

## 4. Discussion

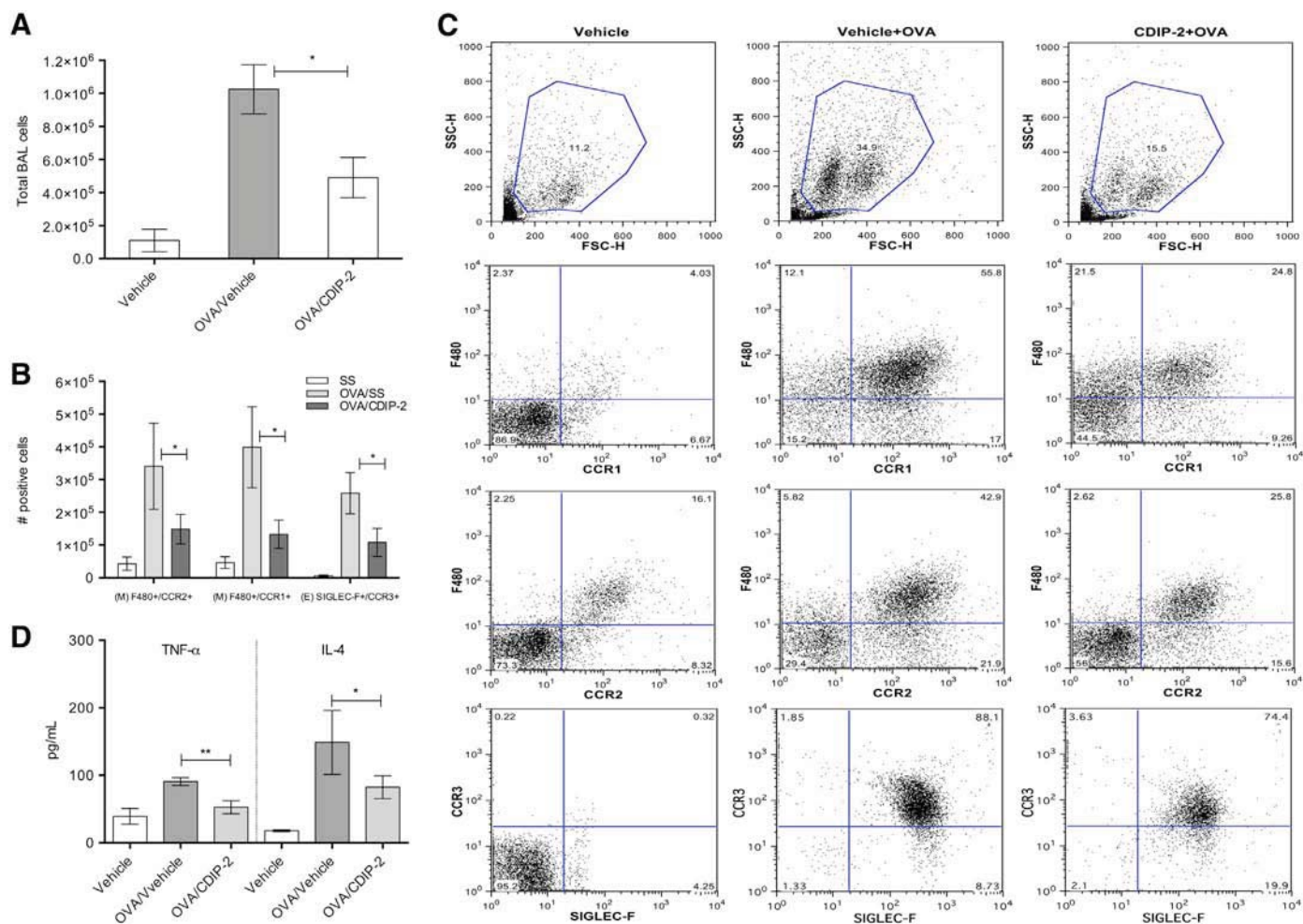
In this study, we have further analyzed the biological activities of CDIP-2, a 19-aa peptide derived from CCL13 that exerts its in vitro and in vivo functions through activation of CCR1, 2 and 3 receptors. Our in vitro findings suggest that CDIP-2 displays partial agonist effects on these chemokine receptors. CDIP-2 regulated allergic airway inflammation in vivo correlating with the down-modulation of pro-inflammatory molecules and the reduced cellular migration observed in the airways. Inhibition or blocking of cell recruitment is one of the therapeutic aims in the treatment of inflammatory diseases, such as asthma. One of the potential targets is CCR3, a chemokine receptor related to eosinophil activation and trafficking; it has been studied as a possible therapeutic target to reduce eosinophilic inflammation and angiogenesis [17–19]. Although big efforts have been made to generate CCR3 antagonists, more research is needed to clarify how CCL11 and CCL13 activate CCR3 [20].

Current knowledge indicates that chemokines interact with their receptors through a two-step process. The first step involves receptor recognition of the chemokine binding site in the core region (N-loop). Next, the NH<sub>2</sub>-terminal region of the chemokine activates the receptor by interacting with extracellular loops and transmembrane domains, inducing changes in receptor conformation leading to receptor activation [3,21]. Regarding the CCL11–CCR3 interaction, it has been reported that both pH and ionic strength influence their binding and function. A few amino acids in CCR3, specifically Tyr<sup>41</sup>, Tyr<sup>113</sup> and Glu<sup>287</sup>, are required for full receptor activation, which are also important in CCR1 activation [22,23]. Additionally, sulfation of Tyr<sup>16</sup> and Tyr<sup>17</sup> at the amino terminal of CCR3 influenced the binding specificity to CCL11 and CCL13 [24]. Additionally, mutations in CCL11 residues from 1 to 8 and 1 to 20 region (substitution of Thr<sup>7</sup>, Leu<sup>13</sup> and Leu<sup>20</sup>) exhibit reduced receptor activation. However, the residues in the chemokine core section, which are crucial for receptor activation, have not been elucidated yet.

A number of possible mechanisms to regulate chemokine and chemokine receptors activities have been proposed. Post-translation modifications and proteolytic cleavage of chemokines by proteases like MMPs or dipeptidylpeptidases are some of these regulatory mechanisms. Truncation of the first 3, 4 or 8 N-terminal residues of CC chemokines by MMP-12 leads to a loss of chemotactic properties [11,7,25]. Additionally, N-terminal truncation of CCL11 by CD26/DPP IV results in a loss of CCR3-mediated intracellular calcium mobilization and CCR3 internalization in human eosinophils in vivo [25]. Interestingly, analysis of CDIP-2 amino acid sequence shows that it shares several sequence motifs with CCL11, including <sup>19</sup>KI<sup>20</sup>, <sup>22</sup>LQRL<sup>25</sup>, <sup>35</sup>CPQ<sup>37</sup>, R<sup>24</sup> and R<sup>30</sup> amino acids. Although these sequences are conserved across the MCP family and have been reported as important for CCR2 activation, it is not clear whether they are also important for



**Fig. 5.** CDIP-2 treatment reduces cellular infiltration in a murine model of OVA-induced allergic airway inflammation. Analysis of the cellular infiltration in the OVA-treated lung murine tissue. A. Quantitative analysis of the inflammatory cells recruited to the perivascular and peribronchial regions. Areas of infiltration are expressed as  $\mu\text{m}^2$  from selected areas. B. Histological analysis of lung sections of CDIP-2-treated mice and their controls were stained with H&E and analyzed as described as above. Representative images (40 $\times$ ) are shown (n = 38).



**Fig. 6.** CDIP-2 treatment reduces BAL cell recruitment in a murine model of OVA-induced allergic airway inflammation. Analysis of total BAL cells obtained from OVA-treated, CDIP-2 treated and vehicle treated mice. A. Number of total cells obtained from BAL. B. FACS analysis of BAL cell populations: Macrophages (M): F480 +/CCR1 + or F480 +/CCR2 + (n = 8) and eosinophils (E) (Siglec-F +/CCR3 +) (n = 10). C. A live gate based on forward and side scatter was used to analyse BAL subpopulations. Macrophages (M) were identified using F480 +/CCR1 + or F480 +/CCR2 + markers, and eosinophils (E) using Siglec-F +/CCR3 +. A representative dot plot is shown D. Determination of cytokine levels of IL-4 and TNFα cytokines in the BAL of untreated (n = 5) and peptide-treated (n = 5) mice by ELISA assay (\*\*p < 0.0001, \*\*p < 0.001, \*p < 0.05).

CCR3 [11,26]. Human CCR3 and CCR1 receptors share almost 60% of amino acid sequences. Based on this, antagonist molecules for CCR1 and CCR3 receptors have been developed and tested *in vivo* [27].

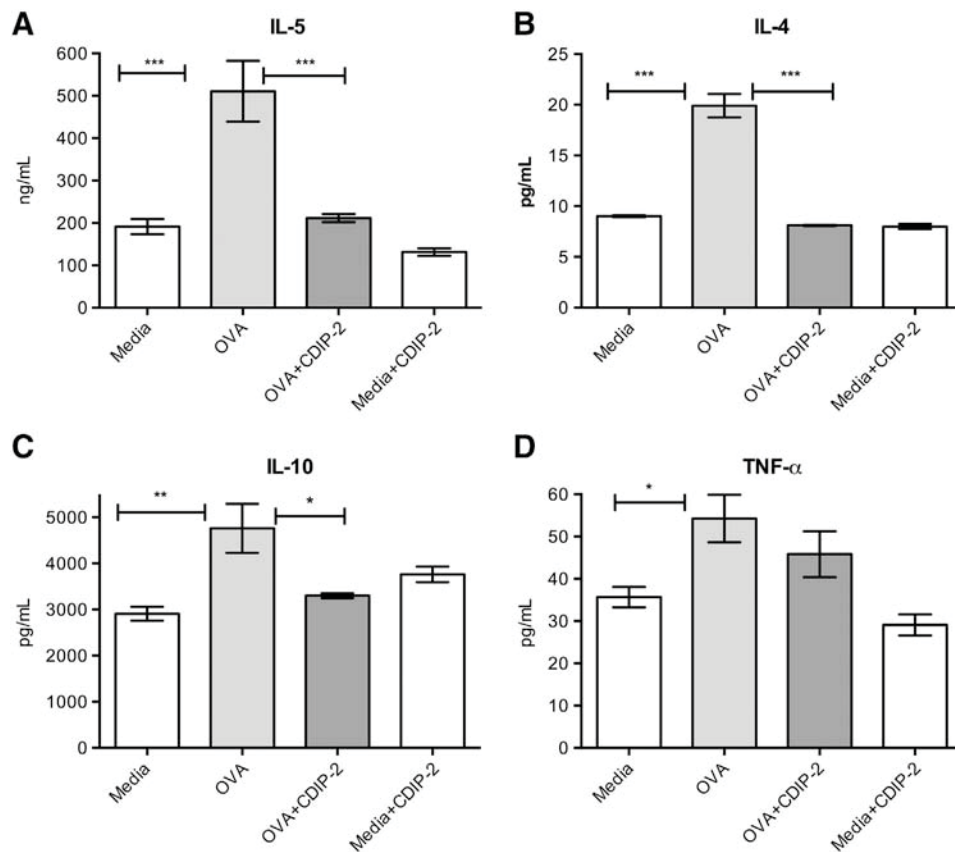
CCR1 is a chemokine receptor that binds CCL3, CCL5 and CCL13 chemokines. CCR1 might have an important role in airway inflammation since it is expressed in some eosinophils, macrophages, lymphocytes and epithelial and muscle cells [28,29]. Our results indicated that CDIP-2 reduces CCR1-mediated chemotaxis towards CCL3, CCL5, CCL7 and CCL13 chemokines in PBMCs. In GTPγS binding assays, we observed a significant reduction with 10 nM of CCL13, but not with CCL3, CCL5 or CCL7 after CDIP-2 (100 μM) incubation [14,30].

Signaling events following chemokine receptor binding triggering migration or other responses are poorly understood. Indeed, it is not clear whether calcium fluxes and chemotaxis are always linked. In fact, it has been reported that some chemokines can internalize chemokine receptors without inducing migration. Some of these molecules have been described as inverse agonists, such as peptides derived from CXCL12 and natural antagonists of CCR2 like CCL11 [31,32]. We found that CDIP-2 treatment has little effect on MAPK phosphorylation induced by CCL11, but it is able to reduce GTPγS binding and calcium fluxes via CCR3. In contrast, CDIP-2 induced calcium fluxes through CCR1 but it was not able to decrease the calcium fluxes induced by CCR1 ligands upon stimulation. Although CDIP-2 was capable to induce down-modulation of CCR1 and CCR2 receptors in the THP-1 cells, it did not affect CCL2-induced chemotaxis or calcium release. In this context,

recent reports have demonstrated that calcium fluxes mediated by partial agonists were not reduced after the addition of pertussis toxin. These data indicated that the signaling elicited by different chemokine ligands results in the activation of different pathways, leading to different functional responses.

CCR2 and ligands have been involved in regulating allergic inflammatory responses in asthma, being CCL2 and CCL13 clearly implicated in macrophage activation in the airways [32]. Our data indicate that CDIP-2 (4.5–45 μM) does not reduce the chemotaxis induced by CCL2 (55 nM) in THP-1 cells, PBMCs or CHO cells transfected with CCR2; however, we found that CDIP-2 reduces surface CCR2 on THP-1 cells up to 40%. This effect might be similar to that described for natural CCR2 antagonists [33]. However, this interaction is not sufficient to reduce other CCR2 dependent responses mediated by CCL2, such as calcium fluxes. In contrast, it has been reported that the N-terminal region corresponding to 13–35 amino acids of CCL2 displays agonist activities since it induces chemotaxis by competing for binding sites with the native CCL2 [34]. Thus, a synthetic peptide based on this sequence inhibited CCL2 binding and chemotaxis suggesting that these amino acid sequences are responsible for receptor interactions, although they might be different for each ligand [35].

Previously, using THP-1 cells, we showed that CDIP-2 reduced chemotaxis towards CCL13 stimuli, but not for CCL2. However, using PBMCs, we found reduced chemotaxis towards CCL7, whereas no significant differences were found using THP-1 cells. This effect



**Fig. 7.** CDIP-2 decreases in vitro cytokine secretion of OVA-stimulated MLN cells. MLN cells were prepared and stimulated in vitro as described in [Methods](#). After 5 days of incubation, cell supernatants were collected for cytokine analysis by ELISA ( $n = 4$ ). A. IL-5, B. IL-4, C. TNF- $\alpha$ , D. IL-10 (\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ).

could be related to differences in receptor expression in monocytic cells; although CCR1 and CCR2 are expressed in both PBMC and THP-1 monocytes, the latter tends to express less CCR1 than PBMCs. CDIP-2 does not display substantial activity against CCR2, which is likely the major receptor for CCL7 in THP-1 cells.

CCR3 shares 44% sequence identity with human CCR2 and 58% identity with murine CCR2. Interestingly, it was reported that CCL11 antagonizes CCR2 by blocking CCL2-induced cellular responses [31,36]; this CCL11-mediated antagonism does not cause complete receptor desensitization and stimulates the phosphorylation of different isoforms of PI3K [37]. Furthermore, CCL24, another CCR3 ligand, is also an antagonist of CCR2, and CCL2 showed agonist activities on CCR3 receptor [38]. These antagonist/agonist features might be relevant in vivo where a fine tune regulation of chemokine functions would be critical to solve chronic diseases.

Our work showed that mice treated with CDIP-2 had significantly fewer BAL macrophages (F480+) recruited that express CCR2 and CCR1 compared to controls. Similarly, in vitro chemotaxis assays with PBMCs and human THP-1 monocytes showed that the chemotaxis induced by CCL5, CCL13, CCL7, and CCL3 was reduced to different extents. We reported previously that CDIP-2 treated mice reduced the number of macrophages recruited into the peritoneum after induction of peritonitis with thioglycollate, indicating that CDIP-2 reduces macrophage chemotaxis in vivo.

In this context, CC chemokines display different ranges of activity with respect to CC chemokine receptors, and this effect is well described for some chemokines, such as CCL13, which does not abolish the responses of some high-affinity CCR1 and CCR2 ligands.

Indeed, the anti-inflammatory activity related to CDIP-2 antagonism may be explained not only by a decrease in leucocyte recruitment to inflammatory foci but also by a reduction in the release of inflammatory mediators. CDIP-2 treatment reduced the expression levels of IL-4 and

TNF- $\alpha$  cytokines and CCL11 chemokine. It has been reported that an increase of the expression of these cytokines and chemokines correlate with an inflammatory response mediated by Th2 lymphocytes and eosinophilia. As we focused in the role of CDIP-2 in regulating the expression of cytokines/chemokines associated with eosinophilia, we found that after CDIP-2 treatment of BMEOs, the expression of CCR3 and TNF- $\alpha$  transcripts were reduced after CCL11 stimulation; these data reinforce the hypothesis related to CDIP-2 displaying down-modulatory activities similar to that reported for other chemokines [39]. CDIP-2 treatment might also have an impact on functions that have been associated with TNF- $\alpha$  in asthma, such as endothelial activation, increase of adhesion molecules and up-regulation of mucin gene expression (currently under investigation) [40]. IL-4 is a classical cytokine associated with IgE switching, induction of eosinophil transmigration across endothelium and regulation of Th2 responses in allergic diseases. IL-4 also has effects on the synthesis of chemokines such as CCL11 and CCL13. Thus, CDIP-2 treatment has a direct effect on the recruitment of eosinophils and Th2 cells which express CCR3 receptors and respond to these chemokines. Moreover, in a murine model of asthma, CDIP-2 treatment directly affected the expression of CCR3 and the release of eosinophil chemoattractants such as CCL11 and CCL24. Altogether, these effects demonstrated the regulatory effect of CDIP-2 in allergic inflammatory models of asthma. Furthermore, no differences in the expression of OVA-specific IgE or IgG1 in BAL were determined after CDIP-2 treatment, possibly because immunoglobulin responses require longer-term treatments to reflect effects related to specific IgE reduction. Finally, we described that CDIP-2 modified cytokine release in vitro after antigen challenge in cells from mediastinal lymph nodes obtained from mice that had previously been immunized with OVA. These data demonstrated that chemokine receptor blocking modulated the cytokine-related allergen-specific activation associated with eosinophil activation and Th2 polarization.



In summary, we present the first demonstration that CDIP-2 peptide has important receptor binding/activation activity with differential partial agonist effects via CCR3, CCR2 and CCR1, reducing cell infiltration as well as expression of inflammatory mediators related to hallmarks of asthma. We suggest that this strategy could be used to generate more efficient chemokine receptor blockers based on the knowledge of specific ligand–receptor interactions.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.01.032>

## Acknowledgments

We would like to thank Verónica Rodríguez and Raquel Guerrero Alquicira from Facultad de Medicina, Gisela DuPont from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and Maura Matus from INPRFM for technical assistance. Erika Méndez-Enríquez was a PhD student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a Ph.D. Fellowship from CONACYT (#255922). This research work was supported by a CONACYT grant #167913 to EGZ.

## References

- [1] Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004;22:789–815.
- [2] Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:891–928.
- [3] Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007;25:787–820.
- [4] Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, et al. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1999;163:6321–9.
- [5] Mendez-Enriquez E, Garcia-Zepeda EA. The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation. *Inflammopharmacology* 2013;21:397–406.
- [6] Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, et al. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 1996;2:449–56.
- [7] Luster AD, Rothenberg ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol* 1997;62:620–33.
- [8] Petering H, Hochstetter R, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, et al. Detection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. *J Immunol* 1998;160:555–8.
- [9] Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, et al. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L1288–302.
- [10] Tenscher K, Metzner B, Hofmann C, Schopf E, Norgauer J. The monocyte chemotactic protein-4 induces oxygen radical production, actin reorganization, and CD11b up-regulation via a pertussis toxin-sensitive G-protein in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:32–5.
- [11] McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, et al. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 2002;100:1160–7.
- [12] Dean RA, Cox JH, Bellac CL, Doucet A, Starr AE, et al. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR + CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 2008;112:3455–64.
- [13] Benitez-Hernandez I, Mendez-Enriquez E, Ostoa P, Fortoul T, Ramirez JA, et al. Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology* 2010;215:413–26.
- [14] Mendez-Enriquez E, Melendez Y, Martinez F, Baay G, Huerta-Yepez S, et al. CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol* 2008;152:354–63.
- [15] Dyer KD, Moser JM, Czapiga M, Siegel SJ, Percopo CM, Rosenberg HF. Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow. *J Immunol* 2008;181:4004–9.
- [16] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [17] Adachi T, Cui CH, Kanda A, Kayaba H, Ohta K, et al. Activation of epidermal growth factor receptor via CCR3 in bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:292–6.
- [18] White JR, Imburgia C, Dul E, Appelbaum E, O'Donnell K, et al. Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils. *J Leukoc Biol* 1997;62:667–75.
- [19] Fulkerson PC, Fischetti CA, Rothenberg ME. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling. *Am J Pathol* 2006;169:2117–26.
- [20] Pease JE. Targeting chemokine receptors in allergic disease. *Biochem J* 2011;434:11–24.
- [21] Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010;330:1066–71.
- [22] Wise EL, Duchesnes C, da Fonseca PC, Allen RA, Williams TJ, Pease JE. Small molecule receptor agonists and antagonists of CCR3 provide insight into mechanisms of chemokine receptor activation. *J Biol Chem* 2007;282:27935–43.
- [23] Sabroe I, Jorritsma A, Stubbs VE, Xanthou G, Jopling LA, et al. The carboxyl terminus of the chemokine receptor CCR3 contains distinct domains which regulate chemotactic signaling and receptor down-regulation in a ligand-dependent manner. *Eur J Immunol* 2005;35:1301–10.
- [24] Zhu JZ, Millard CJ, Ludeman JP, Simpson LS, Clayton DJ, et al. Tyrosine sulfation influences the chemokine binding selectivity of peptides derived from chemokine receptor CCR3. *Biochemistry* 2011;50:1524–34.
- [25] Wolf M, Albrecht S, Marki C. Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1185–98.
- [26] Mayer MR, Stone MJ. Identification of receptor binding and activation determinants in the N-terminal and N-loop regions of the CC chemokine eotaxin. *J Biol Chem* 2001;276:13911–6.
- [27] Sabroe I, Peck MJ, Van Keulen BJ, Jorritsma A, Simmons G, et al. A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J Biol Chem* 2000;275:25985–92.
- [28] Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res* 2000;1:54–61.
- [29] Carpenter KJ, Ewing JL, Schuh JM, Ness TL, Kunkel SL, et al. Therapeutic targeting of CCR1 attenuates established chronic fungal asthma in mice. *Br J Pharmacol* 2005;145:1160–72.
- [30] Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, et al. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 1996;157:5613–26.
- [31] Ogilvie P, Bardi G, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Uguccioni M. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 2001;97:1920–4.
- [32] Mortier A, Van Damme J, Proost P. Regulation of chemokine activity by posttranslational modification. *Pharmacol Ther* 2008;120:197–217.
- [33] Lagu B, Gerchak C, Pan M, Hou C, Singer M, et al. Potent and selective CC-chemokine receptor-2 (CCR2) antagonists as a potential treatment for asthma. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:4382–6.
- [34] Valente AJ, Rozek MM, Schwartz CJ, Graves DT. Characterization of monocyte chemotactic protein-1 binding to human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:309–14.
- [35] Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, et al. Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 1999;38:13013–25.
- [36] Martinelli R, Sabroe I, LaRosa G, Williams TJ, Pease JE. The CC chemokine eotaxin (CCL11) is a partial agonist of CC chemokine receptor 2b. *J Biol Chem* 2001;276:42957–64.
- [37] Ogilvie P, Thelen S, Moepps B, Gierschik P, da Silva Campos AC, et al. Unusual chemokine receptor antagonism involving a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Immunol* 2004;172:6715–22.
- [38] Parody TR, Stone MJ. High level expression, activation, and antagonism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR3 in Chinese hamster ovary cells. *Cytokine* 2004;27:38–46.
- [39] Heiman AS, Abonyo BO, Darling-Reed SF, Alexander MS. Cytokine-stimulated human lung alveolar epithelial cells release eotaxin-2 (CCL24) and eotaxin-3 (CCL26). *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:82–91.
- [40] Lykouras D, Sampsonas F, Kaprianos A, Karkoulis K, Spiropoulos K. Role and pharmacogenomics of TNF-alpha in asthma. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:934–42.



# The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation

E. Mendez-Enriquez · E. A. García-Zepeda

Received: 18 March 2013 / Accepted: 20 June 2013  
© Springer Basel 2013

**Abstract** CCL13/MCP-4, is a CC family chemokine that is chemoattractant for eosinophils, basophils, monocytes, macrophages, immature dendritic cells, and T cells, and its capable of inducing crucial immuno-modulatory responses through its effects on epithelial, muscular and endothelial cells. Similar to other CC chemokines, CCL13 binds to several chemokine receptors (CCR1, CCR2 and CCR3), allowing it to elicit different effects on its target cells. A number of studies have shown that CCL13 is involved in many chronic inflammatory diseases, in which it functions as a pivotal molecule involved in the selective recruitment of cell lineages to the inflamed tissues and their subsequent activation. Based on these studies, we suggest that blocking the actions of CCL13 can serve as a novel strategy for the generation of agents with anti-inflammatory activity. The main goal of this review is to present the current information about CCL13, its gene and protein structure and the roles of this chemokine during innate/adaptive immune responses in inflammatory diseases.

**Keywords** CCL13 · MCP-4 · Chemokines · Inflammation · Asthma · CCR3 · CCR1 · CCR2 · Multiple sclerosis · Rheumatoid arthritis · Obesity · Artherosclerosis

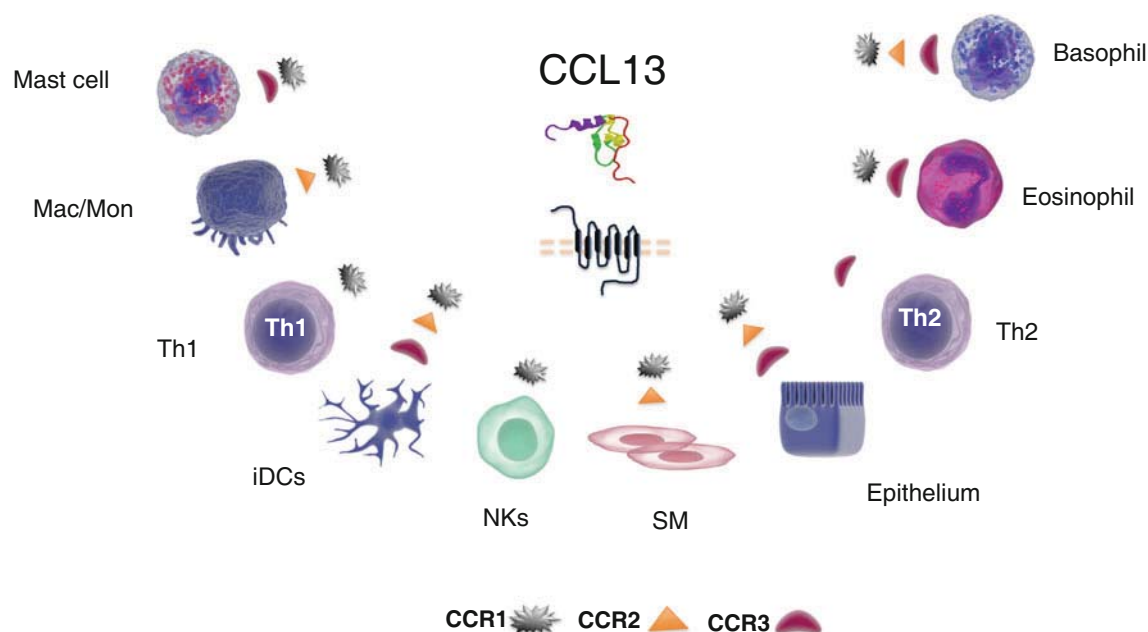
## Introduction

Leukocyte migration in the steady state and during an inflammatory response is chiefly driven by chemokines, a family of chemotactic cytokines that are basic glycosaminoglycan-binding proteins, which participate in numerous biological processes, such as cellular lymphoid organogenesis, angiogenesis, adhesion molecule expression and cytokine secretion (Viola and Luster 2008; Zlotnik and Yoshie 2012). Chemokines have been sub-classified into four groups (CC, CXC, CX3C and C) according to the number of conserved cysteines present in their sequences. All chemokines bind to seven transmembrane domains-G protein-coupled receptors (GPCR's) that primarily bind to the pertussis toxin sensitive  $G\alpha_i/G\alpha_o$  subclasses (Allen et al. 2007).

CCL13 is a member of the CC chemokines family known as MCPs (monocyte chemoattractant proteins) which share more than 60 % amino acid identity, but induce distinct activities in their target cells (Van Coillie et al. 1999). In human, four MCPs have been described: CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) and CCL13 (MCP-4). In mice, only orthologous of CCL2, CCL7 and CCL8 have been reported (Luster and Rothenberg 1997). CCL13 binds to CCR1 and CCR2, similar to other MCPs; it is a chemoattractant for monocytes, T cells and immature dendritic cells (DCs); moreover, it is the only MCP that binds to CCR3, and together with CCL11, CCL13 is one of the most important eosinophil chemoattractants (Fig. 1) (García-Zepeda et al. 1996; Godiska et al. 1997; Luster and Rothenberg 1997; Ugucioni et al. 1996). In addition to chemotaxis, CCL13 induces the degranulation of eosinophils, the release of histamine from basophils, the expression of adhesion molecules and the secretion of pro-inflammatory cytokines in epithelial, endothelial and muscular cells. Interestingly, it also displays antimicrobial activity against Gram-negative

---

E. Mendez-Enriquez · E. A. García-Zepeda (✉)  
Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, México  
e-mail: garciaze@servidor.unam.mx



**Fig. 1** CCL13 activates several cells involved in inflammation. CCL13 binds to CCR1, CCR2 and CCR3, which are expressed in several cell types involved in inflammation-induced chemotaxis and cellular activation, leading to cytokine secretion or degranulation. These receptors are also expressed in structural cells, including

epithelial and muscle cells, in which CCL13 induces activation and proliferation (Garcia-Zepeda et al. 1996; Joubert et al. 2008; Luster 1998; Viola and Luster 2008). Macrophages (Mac), Monocytes (Mon), immature dendritic cells (iDCs), Natural killer (NKs), Smooth muscle cells (SM), Helper T Lymphocyte (Th)

bacteria (Fig. 2). (Martinez-Becerra et al. 2007; Tenscher et al. 1997; Ugucioni et al. 1996).

CCL13 is broadly expressed under homeostatic conditions by different tissues (small bowel, colon, lung, heart, placenta, thymus, liver, muscle, kidney, pancreas, prostate, testis and ovary), in which it plays an important role in leukocyte circulation (Garcia-Zepeda et al. 1996). Several cells produce CCL13 upon stimulation with various inflammatory molecules. In cell lines such as BEAS-2B (bronchial epithelial cell line) and A549 (alveolar type II epithelial cell line), CCL13 mRNA is not detectable in the absence of cytokine stimulation; however, after stimulation with TNF- $\alpha$  or other cytokines, CCL13 is significantly produced (Lamkhioued et al. 2000; Pype et al. 1999; Stellato et al. 1997).

### Role of CCL13 in innate immunity and inflammation

Inflammation is a highly regulated process, which provides a rapid response against pathogens or host stress signals produced after tissue damage or pathogen insults (Medzhitov et al. 2008). In this way cells recognize the stimulus by a wide variety of sensing mechanism; like patterns recognition receptors (PRRs); some of them converge on a common set of signalling pathways, such as NF- $\kappa$ B that drives proinflammatory molecules production. In this way some reports shown that CCL13 increase in mRNA and protein expression with TLR2, 3, 4 and 5 but not TLR7, 8

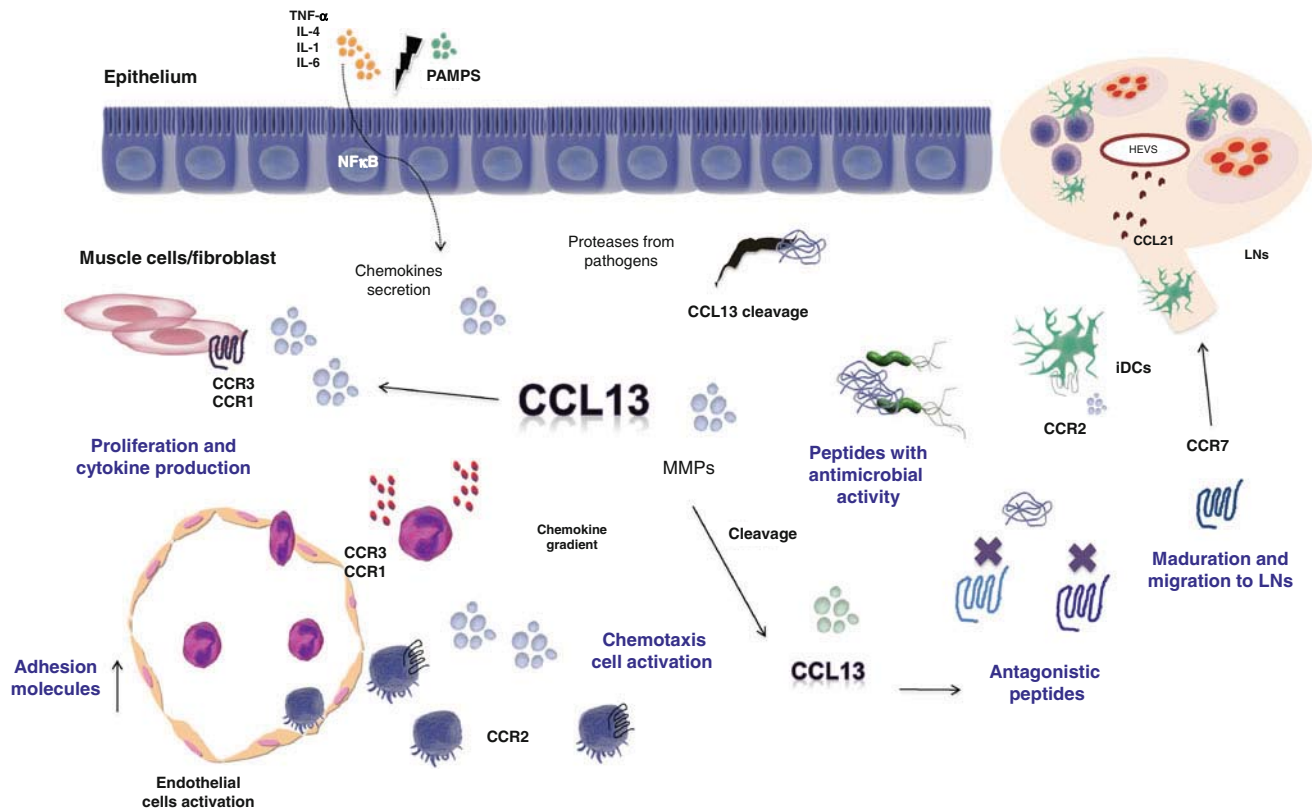
and 9 agonist in human fibroblast (Fig. 2) (Nonaka et al. 2007).

Additionally number of evidences has been showed that CCR2 ligands play a role in the link between innate and adaptive immune responses, because they control recruitment of monocytes, macrophages and DCs (dendritic cells) (Caux et al. 2000). Some studies suggest, that CCR2 ligands induce DCs maturation and activation, in fact DCs from CCR2 deficient mice express lesser amounts of CD40 and MHCII molecules after activation with pathogens in lung, although it has normal DCs migration, less IL-12 is produced by CCR2-/- DCs, as a result CCR2-/- has impaired T cell responses, this suggests that ligands of CCR2 like CCL13, could be implicated in DCs maturation besides of chemoattractant activities (Chiu et al. 2004).

Moreover CCL13 plays an interesting role in DCs migration into inflamed epithelial layers, because monocytes and blood DC precursors such as CD34+ derived DCs and CD11c+ DCs respond first to CCR2 ligands, specifically CCL13 that is expressed in basal epithelial cells contacting blood vessels, then cells are recruited into the tissue by a different gradient of chemokines such as CCL20 (Osterholzer et al. 2005; Vanbervliet et al. 2002).

### Protein structure

CCL13 contains 98 amino acids, and after signal peptidase cleavage, the protein contains 75 amino acids with an



**Fig. 2** CCL13 and its role during innate immune responses. When epithelial cells are activated by cytokines or PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) via TLRs (Toll like receptors), CCL13 is released together with other chemokines as a consequence of NFκB activation (Garcia-Zepeda et al. 1996; Lambrecht and Hammad 2012; Lamkhioued et al. 2000). Chemokine secretion leads to a number of events related to inflammation, such as the overexpression of adhesion molecules in endothelial cells (Tenschler et al. 1997). For example, in fibroblasts and smooth muscle, CCL13 induces cell proliferation that is associated with remodelling (Joubert et al. 2005; Kohan et al. 2010; Lamkhioued et al. 2000) and dendritic cell

activation (Osterholzer et al. 2005; Vanbervliet et al. 2002). Additionally, during inflammation, the activity of CCL13 can be regulated by cleavage mediated by proteases from pathogens (Benítez-Hernández 2010; Pertuz Belloso et al. 2004) or MMPs (Dean et al. 2008; McQuibban et al. 2002). These truncated chemokines or peptides that are generated exert antagonist effects on the CCL13 receptors (Benítez-Hernández 2010; Mendez-Enriquez et al. 2008) or antimicrobial activity against Gram-negative bacteria (Martinez-Becerra et al. 2007; Yang et al. 2003). Immature dendritic cells (iDCs), Matrix metalloproteinases (MMPs), Lymph nodes (LN), High endothelial venules (HEVs)

amino-terminal glycine, which is conserved amongst members of the MCP family (Garcia-Zepeda et al. 1996). Data obtained from the crystal structure of CCL13 showed a tertiary conformation similar to that of other CC chemokines, with a central three-stranded antiparallel β-sheets and α-helix in the carboxyl terminus. The amino terminus of the molecule forms a loop that is attached to the rest of the protein by disulphide bridges (Barinka et al. 2008). As a chemokine with antimicrobial activity, CCL13 contains a large positively charged surface that might be important for interacting with the negatively charged membranes of bacteria. Our group demonstrated that CCL13's C-terminal region has the highest percentage of positive charge volume, much higher than the same region in CCL2 (77.7 vs. 48.5 %) (Barinka et al. 2008; Martinez-Becerra et al. 2007; Yang et al. 2003).

Additionally, most of the differences between CCL2 and CCL13 are located in the first ten amino acids. These

differences have been reported to be important for the induction of eosinophil chemotaxis by CCL13 (Garcia-Zepeda et al. 1996; Luster and Rothenberg 1997).

Besides, some CC chemokines form homodimers and heterodimers and the crystal model of CCL13 suggests that it exists as a dimer, and other groups have reported CCL13-CCL8 and CCL2-CCL13 dimer formation, as detected by mass spectrometry. However, it is not known whether these dimers are relevant in vivo (Allen et al. 2007). Moreover, two mature CCL13 isoforms were found in the peripheral blood of patients with renal cell carcinoma. These isoforms have the same molecular weight but might have disparate post-transcriptional modifications (Rossi et al. 2006).

#### Gene structure

The CCL13 gene (SCYA13) was isolated from a cDNA library using CCL11 as a probe. It is located in the

chromosome region 17q11.2 in a cluster of CC chemokine genes (Hein et al. 1999). The CCL13 gene possesses three exons of 138, 115 and 578 bp; two introns of 867 and 437 bp; and 1.4 kb of regulatory sequences in the immediate 5' upstream region (Garcia-Zepeda et al. 1996; Hein et al. 1999; Maho et al. 1999). The promoter region of the CCL13 gene has consensus sequences for the transcription factors AP-2, NF- $\kappa$ B, YY-1, NF-IL6, IRFs and glucocorticoid receptors (Hein et al. 1999).

Polymorphisms in the binding sequences for the transcription factor Ying Yang-1 (YY-1) in the CCL13 promoter have been reported, including two single-nucleotide transitions in the gene region at 887 and 896 in the 5' direction (Kalayci et al. 2003; Maho et al. 1999), and the polymorphisms in this region were linked with a risk of developing inflammatory diseases (Kalayci et al. 2003).

Regarding NF- $\kappa$ B binding site in CCL13 gene at position -114, it is not a classical consensus sequence to bind NF- $\kappa$ B and this feature might be related with the amount of TNF- $\alpha$  and IL1- $\alpha$  induced by CCL13 compared with CCL7 that has two classical sites to bind NF- $\kappa$ B (Maho et al. 1999).

## CCL13 and its role in inflammatory diseases

### Asthma

Asthma is a disease characterized by allergic airway inflammation caused by the accumulation of eosinophils, Th2 cells and mononuclear cells, which leads to airway damage, remodelling, bronchial hyperreactivity and mucus overproduction (Cohn et al. 2004; Nakajima and Iwamoto 2005). Similar to CCL11, CCL13 exerts potent effects on eosinophils, and it has the broadest activity range of the MCP and eotaxin subgroups (Garcia-Zepeda et al. 1996; Ugucioni et al. 1996). Several studies have demonstrated that CCL13 mRNA and protein are overexpressed in the bronchial epithelium and sub-mucosa of the bronchial biopsy tissues and bronchi-alveolar lavage (BAL) fluid from patients with asthma; likewise, the plasma levels of CCL13 in patients with chronic-stable asthma are higher than those in normal subjects (Garcia-Zepeda et al. 1996; Kalayci et al. 2004; Stellato et al. 1997). CCL13 overexpression is also related to the number of macrophages in the BAL of asthmatic patients with viral airway infections (Carroll and Hartert 2008; Santiago et al. 2008). Taken together, these findings suggest that CCL13 is a bio-marker for asthma exacerbation (Kalayci et al. 2004).

Furthermore, the spatially localized regulated expression of CCL13 has been suggested to be a temporal event related to different chemoattractant gradients that direct

cells (Ying et al. 1999). This finding suggests that there is an initial step in which blood-circulating leukocytes migrate through the blood vessels guided by adhesion molecules and specific chemotactic gradients, resulting in the recruitment of inflammatory cells. The subsequently, cells encounter a second gradient that recruits them into the airway and to nearby locations. In this context, CCL13 is more likely to be involved in the second step of cellular migration. Furthermore was described that IL-4 differentially regulates the expression of CCL11 and CCL13 in peripheral mononuclear cells by inhibiting the expression of these chemokines; in contrast, the expression in epithelial cells is not modified after IL-4 priming. These observations are consistent with the concept that in the periphery, these chemokines induce an increase in the number of blood eosinophils, whereas the production of CCL13 and other chemoattractants by epithelial cells contributes to airway eosinophil recruitment (Nakamura et al. 2001).

In eosinophils, CCL13 up-regulates adhesion molecules in eosinophils, particularly CD11b (Tenschler et al. 1997) and is capable of inducing the cytoplasmic release of calcium, degranulation and chemotaxis at the same levels of CCL11. Furthermore, these chemokines are able to undergo complete cross-desensitisation via CCR3, whereas other ligands of CCR3 have been categorised as lower affinity agonists (CCL7, CCL5 and CCL15) (Garcia-Zepeda et al. 1996; Stellato et al. 1997). These varied responses of CCR3 could be related to differential signalling mechanisms, but only a few studies using human eosinophils have shown that the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). However, specific activation of Erk2 and p38 but not JNK, plays an important role in CCR3 signalling activated by CCL11 and that this activation is related to degranulation and chemotaxis in asthma (Kampen et al. 2000).

On the other hand, CCR1 is also a key chemokine receptor related with asthma progression (Carpenter et al. 2005). Like other CCL13 receptors, CCR1 is a target for the generation of effective drugs against airway inflammation, and some reports in murine models have shown that a CCR1 antagonist can reduce the number of intra-epithelial DCs (Carpenter et al. 2005). Similar to the levels of CCR3, the levels of CCR1 are increased in the airways of asthmatics, and CCR1 is significantly expressed by the airway smooth muscle cells (ASM). Although CCR1 is also expressed by eosinophils, macrophages and DCs, it has been found to be more closely associated with the remodelling process in asthma (Blease et al. 2000; Joubert et al. 2008). In addition to its role in asthma, CCL13 plays a key role as an eosinophil chemoattractant in several allergic conditions, such as atopic dermatitis; this information is summarised in Table 1.

**Table 1** CCL13 in allergic diseases

Diseases	CCL13 implications	References
Rhinitis	CCL13 protein and mRNA levels are significantly higher in the mucosal epithelium.	(Christodoulopoulos et al. 1999, and Carda, n.d.)
Atopic dermatitis	Biopsy specimens have cells positive for CCL13 (mRNA) that correlated with the eosinophilia present in lesions.	(Gros, Bussmann, Bieber, Förster, and Novak 2009; Taha et al. 2000)
Sinusitis	CCL13 mRNA is increased within the epithelium layer.	(Woodworth, Joseph, Kaplan, and Schlosser 2004)
Bullous pemphigoid	CCL11 and CCL13 are present in high levels in the tissues and eosinophil granules.	(Gounni Abdelilah et al. 2006)
Nasal polyps	CCL13 is released after TLR2 and TLR5 stimulation in fibroblasts from patients with nasal polyps, and this increase is associated with IL-4.	(Nonaka et al. 2007)

CCL13 has been found to be elevated in fluid and tissue samples from patients with different allergic diseases. This chemokine is closely related to eosinophilia and the exacerbation of the inflammatory process

### Rheumatoid arthritis (RA)

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease that leads to joint destruction. The aetiology of the severe immune response associated with RA is not yet fully understood; however, there is evidence of cell infiltration into the joints, and structural cells from the joints release high levels of cytokines Fig. 3. The accumulation of inflammatory cells during RA progression is closely associated with high concentrations of certain chemokines, such as CCL13, CCL2, CCL3, and CCL5, all of which are found in the synovial tissue and synovial fluid of RA patients. These CC chemokines induce primarily monocyte and T-lymphocyte infiltration, but they also induce cell proliferation and changes in the joint structure (Hintzen et al. 2009; Iwamoto et al. 2006). Some studies have described a role for CCL13 in RA because of the high concentration of the CCL13 protein in the synovial fluid and the increase in CCL13 mRNA expression in the cartilage of patients with RA compared with the normal controls. CCL13 induces the proliferation of fibroblasts and chondrocytes, and some studies have found that TNF- $\alpha$ , IL-1 and IFN- $\gamma$  stimulate an increase in CCL13 mRNA expression and CCL13 release from human chondrocytes (Iwamoto et al. 2006; White et al. 2013).

### Obesity and atherosclerosis

Obesity is linked to several metabolic disturbances such as hypertension, insulin resistance, atherosclerosis and hepatic steatosis. Recently, obesity was shown to be associated with a systemic inflammatory state. Chemokines, particularly the CCR2 ligands, have been shown to be closely associated with macrophage accumulation. Some reports have shown that cultured murine adipocytes and human

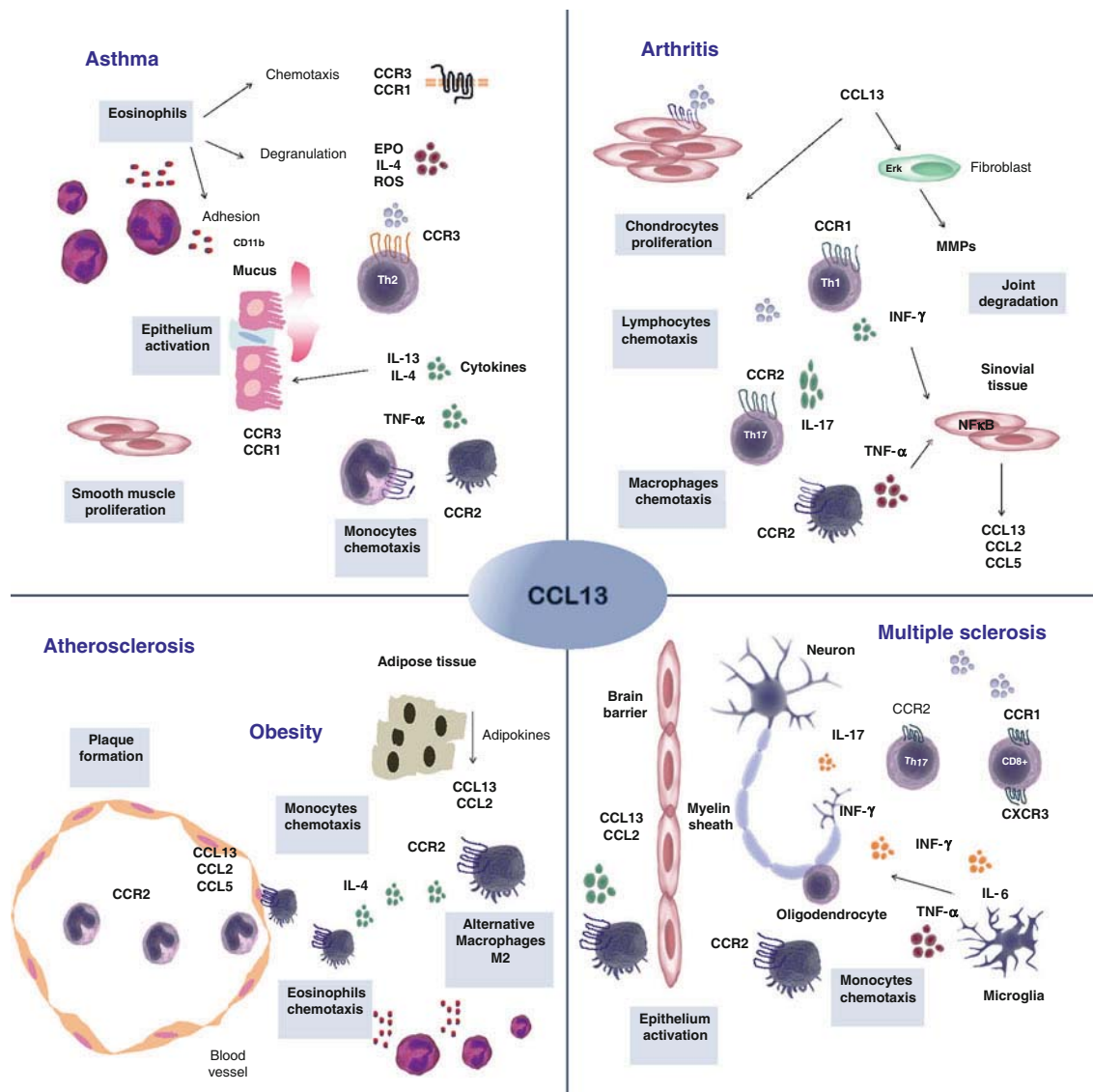
adipocytes isolated from fat depots produce chemokines (Sartipy and Loskutoff 2003) (Fig. 3).

CCL13 was found in the sera of obese patients and increased CCL13 concentrations correlated with certain anthropometric parameters, such as body mass index, waist circumference and other parameters associated with metabolic syndrome, such as insulin resistance. The CCL13 mRNA levels in the visceral adipose tissue are also increased in these patients (Hashimoto et al. 2006). These results establish a link between obesity and other closely related problems like atherosclerosis, in fact several reports have suggested that CCR2 ligands mainly CCL2 play important roles in the recruitment of monocytes to atherosclerotic lesions. These hypotheses are reinforced by data from murine models; for instance, mice deficient in CCR2 have reduced food intake and are less inclined to become obese when fed a high-fat diet. Furthermore, treatment with a CCR2 antagonist reduces the inflammatory features associated with obesity, such as macrophage infiltration into adipose tissue (Sartipy and Loskutoff, 2003; Schober et al. 2004). Although CCL13 is a CCR2 ligand little is known regarding this chemokine in these kinds of disorders.

### Multiple sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system that is related to autoimmunity and leads to neurodegeneration as a result of demyelination (Ockinger et al. 2009). Several chemokines regulate the transmigration of immune cells into the brain, where they activate local cells. CCR2 and its ligands have been shown to be associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS, and with the human disease.





**Fig. 3** CCL13 is a key molecule in inflammatory diseases. CCL13 has been described as an important chemokine that is associated with eosinophilia in asthma and with the degranulation of basophils and eosinophils. CCL13 also induces epithelial and muscle cell activation, macrophage chemotaxis and cytokine overexpression in the airway (Fujisawa et al. 2000; Kalayci et al. 2004; Lamkhioued et al. 2000). Furthermore, in RA, CCL13 induces some hallmarks associated with joint degradation, including chondrocyte proliferation, lymphocyte chemotaxis and monocyte recruitment (Hintzen et al. 2009; Iwamoto

et al. 2007, 2008; Yamaguchi et al. 2012a, b). In multiple sclerosis, CCL13 induces monocyte chemotaxis and the secretion of inflammatory cytokines in lymphocytes that can lead to oligodendrocyte activation and myelin destruction (Ockinger et al. 2009). Importantly, CCL13 has been linked to obesity (Hashimoto et al. 2006) and atherosclerosis, in which CCL13, together with CCL2, induces plaque formation (Breland et al. 2010; Koenen and Weber 2010; Sheikine and Hansson 2004). Eosinophil peroxidase (EPO), Reactive oxygen species (ROS), Matrix metalloproteinases (MMPs)

Chemokines have been detected in the brain lesions of MS patients and at elevated levels in their cerebrospinal fluid (Pigard et al. 2009).

CCL13 is likely to be involved in the recruitment of mononuclear cells into the central nervous system because in a rat model of induced experimental autoimmune encephalomyelitis, a chemokine gene locus (Eae18b locus, 0.88 Mb) was found to be associated with susceptibility to the development of neuro-inflammation (Ockinger et al. 2009), as well as the homologous human

genes were associated with the susceptibility to generate MS, because a specific haplotype for CCL13 has been shown to predispose individuals to the disease (Ockinger et al. 2009). In addition, some patients with MS treated with intravenous immunoglobulin show changes in CCL13 expression in their peripheral T cells. Other chemokines, such as CXCL3, CXCL5 and XCL2, were also found to be down-regulated after intravenous immunoglobulin treatment (Ockinger et al. 2009; Pigard et al. 2009).

**Table 2** Peptides derived from CCL13 with biological activity

Peptides	Origen	Activity	References
CDCP-1	Cruzipain cleavage	Antagonist of chemotaxis	(Benítez-Hernández 2010)
<sup>a</sup> NS	EhCP2	Antagonist of chemotaxis	(Pertuz Belloso et al. 2004)
CDIP-2	Synthetic peptide	Anti-inflammatory activity in vivo	(Mendez-Enriquez et al. 2008)
CDAP-4	Synthetic peptide	Antimicrobial activity	(Martinez-Becerra et al. 2007)
4–75,5–75,8–75	MMPs cleavage	Antagonist of chemotaxis	(Dean et al. 2008; McQuibban et al. 2002)

CCL13-derived peptides have been tested as possible antagonists of chemotaxis or inflammation in *in vivo* models; some of these peptides are naturally produced by MMPs or by parasite proteolytic cleavage, while others were synthetic produced from the CCL13 sequence

<sup>a</sup> NS not sequenced

Additionally IL-17 producing T cells (Th17) are involved in the pathogenesis of several diseases such as ME (Fig. 2), specifically we can distinguish Th17 because the expression of CCR2 + CCR5- as well as the expression of the ROR $\gamma$ t, as a result ligands of CCR2 like CCL13 might be an important regulators in the recruitment of Th17 cells into the inflammatory foci (Sato et al. 2007).

### CCL13 as a therapeutic target for inflammatory diseases

Over the last several decades, the incidences of several diseases, such as allergic asthma, arthritis, obesity and atherosclerosis, have dramatically increased worldwide. Unfortunately, the currently available therapies do not successfully ameliorate conditions that are associated with chronic inflammation and eventually lead to irreparable tissue damage (Allen et al. 2007; Viola and Luster 2008). A number of molecules that play key roles in the process of inflammation have been tested as therapeutic targets to produce more effective therapies. Chemokines, which are involved in inflammatory cell recruitment, represent some of the best options for the development of new anti-inflammatory drugs (Luster 1998; Viola and Luster 2008; Zlotnik and Yoshie 2012).

For CCL13 in particular, some studies have shown that peptide products created by the proteolytic cleavage of CCL13 (Table 2) have antagonistic activity *in vitro* (Benítez-Hernández 2010; Pertuz Belloso et al. 2004). Likewise, synthetic peptides have antagonistic activity in murine models of airway inflammation. These results suggest that CCL13 and its receptors are important targets during asthma progression, because several CCR3, CCR2 and CCR1 antagonists reduce airway inflammation (Lagu et al. 2007; Mendez-Enriquez et al. 2008; Vaidehi et al. 2006; Zlotnik and Yoshie 2012). Moreover, blocking CCR1 with neutralizing antibodies prevents pulmonary fibrosis in animal models of fibrosis and asthma (Blease et al. 2000). However, the role of CCL13 in fibrosis via CCR1 activation has not yet been elucidated in humans. Most previous research has focused on

the CCR1/CCL3 interaction and on how CCL13 might be associated with asthma progression through its binding to CCR1. Currently, little is known about CCL13 elicited CCR3 signalling. Once these signalling pathways are elucidated, this knowledge can be used to develop novel and more specific pharmacological approaches for the treatment of asthma.

### Conclusions

Interference with the chemokine system is considered an important area of study for the generation of anti-inflammatory drugs. Several pharmacological approaches have been tested to assess their ability to block chemokine activity. These approaches include the use of small organic molecules, modified chemokines and antibodies (Pease 2011; Viola and Luster 2008). However, thus far, only a few drugs, such as maraviroc (a CCR5 antagonist) and plerixafor (a CXCR4 antagonist), have been approved by the FDA. Numerous chemokine receptor antagonists have exhibited a lack of efficacy in pharmacological trials, in part because of the promiscuity of the chemokine family, inadequate doses or undesirable side effects (Pease and Horuk 2010). In addition, inflammatory diseases are multifactorial, and it is difficult to design a single drug that can treat all aspects of the disease. Therefore, we surmise that new and more efficacious drugs will be generated based on the specific knowledge obtained from chemokines such as CCL13 and its receptors in different cellular contexts.

**Acknowledgments** This work was supported by a CONACYT Grant No. 167913 (EAGZ). MEE was recipient of a Ph.D. scholarship from CONACYT (#255922) and is a doctoral student of Posgrado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, (UNAM). We would like to thank Dr. Jaciel Medina-Tamayo and Fernando Galicia for critical reading of the manuscript.

### References

- Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007) Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25:787–820. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529

- Barinka C, Prah A, Lubkowski J (2008) Structure of human monocyte chemoattractant protein 4 (MCP-4/CCL13). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64(Pt 3):273–278
- Benítez-Hernández I (2010) Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology* 215(5):413–426. doi:10.1016/j.imbio.2009.06.001
- Blease K, Mehrad B, Standiford TJ, Lukacs NW, Kunkel SL, Chensue SW, Lu B et al (2000) Airway remodeling is absent in CCR1<sup>-/-</sup> mice during chronic fungal allergic airway disease. *J Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 165(3):1564–1572
- Carpenter KJ, Ewing JL, Schuh JM, Ness TL, Kunkel SL, Aparici M, Miralpeix M et al (2005) Therapeutic targeting of CCR1 attenuates established chronic fungal asthma in mice. *Br J Pharmacol* 145(8):1160–1172. doi:10.1038/sj.bjp.0706243
- Carroll K. N, Hartert T. V (2008) The impact of respiratory viral infection on wheezing illnesses and asthma exacerbations. *Immunol Allergy Clin North Am* 28(3):539–61, viii. doi:10.1016/j.iac.2008.03.001
- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, De Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C et al (2000) Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 22(4):345–369
- Chiu B-C, Freeman CM, Stolberg VR, Hu JS, Zeibecoglou K, Lu B, Gerard C et al (2004) Impaired lung dendritic cell activation in CCR2 knockout mice. *Am J Pathol* 165(4):1199–1209
- Christodoulououlos P, Wright E, Frenkiel S, Luster A, Hamid Q (1999) Monocyte chemotactic proteins in allergen-induced inflammation in the nasal mucosa: effect of topical corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 103(6):1036–1044
- Cohn L, Elias JA, Chupp GL (2004) Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 22:789–815. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104716
- Dean RA, Cox JH, Bellac CL, Doucet A, Starr AE, Overall CM (2008) Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR + CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112(8):3455–3464
- Fujisawa T, Kato Y, Nagase H, Atsuta J, Terada A, Iguchi K, Kamiya H et al (2000) Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J Allergy Clin Immunol* 106(3):507–513. doi:10.1067/mai.2000.108311
- García-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM et al (1996) Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 157(12):5613–5626
- Godiska R, Chantray D, Raport CJ, Schweickart VL, Trong HL, Gray PW (1997) Monocyte chemotactic protein-4: tissue-specific expression and signaling through CC chemokine receptor-2. *J Leukoc Biol* 61(3):353–360
- Hashimoto I, Wada J, Hida A, Baba M, Miyatake N, Eguchi J, Shikata K et al (2006) Elevated serum monocyte chemoattractant protein-4 and chronic inflammation in overweight subjects. *Obesity* (Silver Spring, Md.) 14(5):799–811. doi:10.1038/oby.2006.93
- Hein H, Schlüter C, Kulke R, Christophers E, Schröder JM, Bartels J, Schlüter C et al (1999) Genomic organization, sequence analysis and transcriptional regulation of the human MCP-4 chemokine gene (SCYA13) in dermal fibroblasts: a comparison to other eosinophilic beta-chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 255(2):470–476. doi:10.1006/bbrc.1999.0216
- Hintzen C, Quaiser S, Pap T, Heinrich PC, Hermanns HM (2009) Induction of CCL13 expression in synovial fibroblasts highlights a significant role of oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. doi:10.1002/art.24602
- Iwamoto T, Okamoto H, Ikuni N, Takeuchi M, Toyama Y, Tomatsu T, Kamatani N et al (2006) Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 45(4):421–424. doi:10.1093/rheumatology/kei209
- Iwamoto T, Okamoto H, Kobayashi S, Ikari K, Toyama Y, Tomatsu T, Kamatani N et al (2007) A role of monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 from chondrocytes in rheumatoid arthritis. *FEBS J* 274(18):4904–4912
- Iwamoto Takuji, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J* 275(18):4448–4455. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06580.x
- Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Labonté I, Gounni AS, Maghni K, Wellemans V, Chakir J et al (2005) CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. *J Immunol* (Baltimore, Md.: 1950) 175(4):2702–2708
- Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Welman M, Dragon S, Létuvé S, Tolloczko B, Halayko AJ et al (2008) Expression and regulation of CCR1 by airway smooth muscle cells in asthma. *J Immunol* (Baltimore, Md.: 1950) 180(2):1268–1275
- Kalayci O, Birben E, Wu L, Oguma T, Storm Van's Gravesande K, Subramaniam V, Sheldon HK et al (2003) Monocyte chemoattractant protein-4 core promoter genetic variants: influence on YY-1 affinity and plasma levels. *Am J Respir Cell Mole Biol* 29(6):750–756. doi:10.1165/rcmb.2003-0024OC
- Kalayci O, Sonna LA, Woodruff PG, Camargo CA Jr, Luster AD, Lilly CM, Camargo CA (2004) Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma. *J Asthma* 41(1):27–33
- Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinquan T, Quan S, Grant JA, Skov PS et al (2000) Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood* 95(6):1911–1917
- Koenen RR, Weber C (2010) Therapeutic targeting of chemokine interactions in atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 9(2):141–153. doi:10.1038/nrd3048
- Kohan M, Puxeddu I, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N (2010) Eotaxin-2/CCL24 and eotaxin-3/CCL26 exert differential pro-fibrogenic effects on human lung fibroblasts. *Annals Allergy Asthma Immunol* 104(1):66–72
- Lagu B, Gerchak C, Pan M, Hou C, Singer M, Malaviya R, Matheis M et al (2007) Potent and selective CC-chemokine receptor-2 (CCR2) antagonists as a potential treatment for asthma. *Bioorg Med Chem Lett* 17(15):4382–4386. doi:10.1016/j.bmcl.2007.01.115
- Lambrech BN, Hammad H (2012) The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 18(5):684–692. doi:10.1038/nm.2737
- Lamkhioe B, García-Zepeda EA, Abi-Younes S, Nakamura H, Jedrziewic S, Wagner L, Renzi PM et al (2000) Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 162(2 Pt 1):723–732
- Luster AD (1998) Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med* 338(7):436–445
- Luster AD, Rothenberg ME (1997) Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol* 62(5):620–633
- Maho A, Carter A, Bensimon A, Vassart G, Parmentier M (1999) Physical mapping of the CC-chemokine gene cluster on the human 17q11. 2 region. *Genomics* 59(2):213–223. doi:10.1006/geno.1999.5850
- Martinez-Becerra F, Silva DA, Dominguez-Ramirez L, Mendoza-Hernandez G, Lopez-Vidal Y, Soldevila G, García-Zepeda EA (2007) Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-



- derived peptide (CDAP-4) on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 355(2):352–358
- McQuibban GA, Gong J-H, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100(4):1160–1167
- Mendez-Enriquez E, Melendez Y, Martinez F, Baay G, Huerta-Yepe S, Gonzalez-Bonilla C, Fortoul TI et al (2008) CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C–C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol* 152(2):354–363
- Nakajima H, Iwamoto I (2005) Pathogenesis of asthma. *Nippon Rinsho* 63 Suppl 5(6):53–57
- Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, Garcia-Zepeda EA et al (2001) IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(5):L1288–L1302
- Nonaka M, Fukumoto A, Ogihara N, Pawankar R, Sakanushi A, Yagi T (2007) Expression of MCP-4 by TLR ligand-stimulated nasal polyp fibroblasts. *Acta Otolaryngol* 127(12):1304–1309. doi:10.1080/00016480701242444
- Ockinger J, Stridh P, Beyeen AD, Lundmark F, Seddighzadeh M, Oturai A, Sorensen PS et al (2009) Genetic variants of CC chemokine genes in experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 11(2):142–154
- Osterholzer JJ, Ames T, Polak T, Sonstein J, Moore BB, Chensue SW, Toews GB et al (2005) CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen. *J Immunol* (Baltimore, MD.: 1950) 175(2):874–883
- Pease JE (2011) Targeting chemokine receptors in allergic disease. *Biochem J* 434(1):11–24. doi:10.1042/BJ20101132
- Pease JE, Horuk R (2010) Small molecule antagonists of chemokine receptors—is promiscuity a virtue? *Curr Top Med Chem* 10(13):1351–1358
- Pertuz Belloso S, Ostoa Saloma P, Benitez I, Soldevila G, Olivos A, Garcia-Zepeda E (2004) Entamoeba histolytica cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol* 26(5):237–241
- Pigard N, Elovaara I, Kuusisto H, Paalavuo R, Dastidar P, Zimmermann K, Schwarz H-P et al (2009) Therapeutic activities of intravenous immunoglobulins in multiple sclerosis involve modulation of chemokine expression. *J Neuroimmunol* 209(1–2):114–120. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.01.014
- Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Van Coillie E, Opendakker G, Van Damme J, Chung KF et al (1999) Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(4):528–536
- Rossi L, Moharram R, Martin BM, White RL, Panelli MC (2006) Detection of human MCP-4/CCL13 isoforms by SELDI immunoaffinity capture. *J Transl Med* 4:5
- Santiago J, Hernández-Cruz JL, Manjarrez-Zavala ME, Montes-Vizuet R, Rosete-Olvera DP, Tapia-Díaz AM, Zepeda-Peney H et al (2008) Role of monocyte chemotactic protein-3 and -4 in children with virus exacerbation of asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 32(5):1243–1249. doi:10.1183/09031936.00085107
- Sartipy P, Loskutoff DJ (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(12):7265–7270. doi:10.1073/pnas.1133870100
- Sato W, Aranami T, Yamamura T (2007) Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2 + CCR5- phenotype. *J Immunol* (Baltimore, MD.: 1950) 178(12):7525–7529
- Schober A, Zernecke A, Liehn EA, Von Hundelshausen P, Knarren S, Kuziel WA, Weber C (2004) Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. *Circ Res* 95(11):1125–1133. doi:10.1161/01.RES.0000149518.86865.3e
- Sheikine Y, Hansson GK (2004) Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med* 36(2):98–118
- Stellato C, Collins P, Ponath PD, Soler D, Newman W, La Rosa G, Li H et al (1997) Production of the novel C–C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C–C chemokines. *J Clin Invest* 99(5):926–936. doi:10.1172/JCI119257
- Tenschler K, Metzner B, Hofmann C, Schopf E, Norgauer J, Schöpf E (1997) The monocyte chemotactic protein-4 induces oxygen radical production, actin reorganization, and CD11b up-regulation via a pertussis toxin-sensitive G-protein in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 240(1):32–35. doi:10.1006/bbrc.1997.7601
- Uguccioni M, Loetscher P, Forssmann U, Dewald B, Li H, Lima SH, Li Y et al (1996) Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J Exp Med* 183(5):2379–2384
- Vaidehi N, Schlyer S, Trabanino RJ, Floriano WB, Abrol R, Sharma S, Kochanny M et al (2006) Predictions of CCR1 chemokine receptor structure and BX 471 antagonist binding followed by experimental validation. *J Biol Chem* 281(37):27613–27620. doi:10.1074/jbc.M601389200
- Van Coillie E, Van Damme J, Opendakker G (1999) The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 10(1):61–86
- Vanbervliet B, Homey B, Durand I, Massacrier C, Ait-Yahia S, De Bouteiller O, Vicari A et al (2002) Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol* 32(1):231–242. doi:10.1002/1521-4141(200201)32:1<231::AID-IMMU231>3.0.CO;2-8
- Viola A, Luster AD (2008) Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:171–197. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.121806.154841
- White GE, Iqbal AJ, Greaves DR (2013) CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. *Pharmacol Rev* 65(1):47–89. doi:10.1124/pr.111.005074
- Breland UM, Michelsen AE, Skjelland M, Folkersen L, Krohg-Sørensen K, Russell D, Ueland T et al (2010) Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis: an inflammatory link between platelet and monocyte activation. *Cardiovascular research* 86(2):265–273. doi:10.1093/cvr/cvq044
- Yamaguchi A, Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Suzuki F, Takamori K, Ogawa H et al (2012a) CC motif chemokine ligand 13 is associated with rheumatoid arthritis pathogenesis. *Modern Rheumatol*. doi:10.1007/s10165-012-0752-4
- Yamaguchi A, Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I et al (2012b) Estrogen inhibits apoptosis and promotes CC motif chemokine ligand 13 expression on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34(5):852–857. doi:10.3109/08923973.2012.664149
- Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ (2003) Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74(3):448–455

Ying S, Robinson DS, Meng Q, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF et al (1999) C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue

eosinophilia, and relationshi. *J Immunol* (Baltimore, Md.: 1950) 163(7):3976–3984

Zlotnik A, Yoshie O (2012) The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36(5):705–716. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.008

# CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation

E. Mendez-Enriquez,\* Y. Melendez,\*  
F. Martinez,\* G. Baay,<sup>†</sup>  
S. Huerta-Yepe,<sup>‡</sup>  
C. Gonzalez-Bonilla,<sup>†</sup> T. I. Fortoul,<sup>‡</sup>  
G. Soldevila\* and  
E. A. García-Zepeda\*

\*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, <sup>†</sup>Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Centro Médico 'La Raza', IMSS, and <sup>‡</sup>Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Accepted for publication 23 January 2008

Correspondence: E. A. García-Zepeda, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, México, DF, CP 04510, México.  
E-mail: garciaze@servidor.unam.mx

## Introduction

Chemokines are a large family of low molecular weight basic proteins involved in several biological functions, including recruitment of cells to sites of inflammation, cellular differentiation and lymphoid organogenesis [1–4]. Chemokine-mediated responses in leucocytes are triggered by their interaction with seven transmembrane G protein coupled receptors. Currently, a model of ligand–receptor interaction involves a two-step mechanism, where the chemokine initially interacts with the amino-terminus of the chemokine receptor [5]. This first interaction does not promote signalling, and probably allows the chemokine to reach the inner region of the chemokine receptor. The amino-terminus of the chemokine then activates the receptor, promoting several responses including actin polymerization, calcium flux and degranulation [6].

Chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13) is a member of the CCL chemokines that binds CCR1, CCR2 and CCR3 receptors expressed in eosinophils, basophils, dendritic cells, monocytes and T lymphocytes [2,7]. This chemokine is up-regulated in several chronic inflammatory diseases,

## Summary

Airway inflammation is characterized by selective recruitment of mononuclear and granulocytic cells. This recruitment is mediated by the action of chemotactic cytokines, such as chemokines. A number of chemokines and their receptors have been identified and proposed as potential therapeutic agents in allergic airway inflammation. One of these chemokines is chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), a CC chemokine that has been associated with allergic inflammatory diseases such as asthma and allergic rhinitis. To investigate alternative therapeutic agents to alleviate allergic inflammatory diseases, a number of chemokine-derived synthetic peptides were designed and tested for their ability to modulate *in vitro* and *in vivo* chemokine-mediated functions. Our results show that one of these peptides, CDIP-2, displayed antagonist functions in *in vitro* chemotaxis assays using monocytic cell lines. In addition, we found that CDIP-2 significantly reduced peribronchial, perivascular infiltrate and mucus overproduction in an ovalbumin-induced allergic lung inflammation murine model. Thus, CDIP-2 may be considered as part of a novel group of anti-inflammatory agents based on chemokine-derived synthetic peptides.

**Keywords:** allergy, chemokine, inflammation, peptide

including asthma, rhinitis, glomerulonephritis and atherosclerosis [8–12]. Interestingly, CCL13 also displays antimicrobial activities [13,14].

However, the residues of CCL13 involved in receptor binding and activation are not known. Recently, it was shown that truncated variants of CCL13, generated by MMPs or pathogen cysteine proteases, have antagonistic activities on monocytic cells [15,16]. These results provide new insights into the mechanisms involved in the ligand–receptor interactions and aims to seek for molecules that may modulate chemokine-mediated biological responses.

As an approach to find novel therapeutic agents, we have analysed a number of synthetic peptides based on the primary sequence of CCL chemokines and tested them for either agonist or antagonist functions. In this report, data are presented regarding the biological functions of a short CCL13-derived peptide (CDIP-2). This peptide was capable of antagonizing chemokine-mediated functions *in vitro* and to reduce leucocyte recruitment *in vivo*, using a murine model of allergic airway inflammation. CDIP-2 may be included within a novel group of recently described

chemokine-derived agents with broad antagonist functions and considered as a good anti-inflammatory candidate.

## Materials and methods

### Reagents

Peptides (18–19 aa length) were synthesized using solid-phase synthesis and obtained from AnaSpec (San Jose, CA, USA). The amino acid sequence of the peptides based on the CCL13 mature protein (1–75) is as follows: chemokine-derived peptides (CDP)-1 (1–18): qpdalnvstccftfssk, CDIP-2 (19–37): kislqrklysvittsrpcq. Human and murine recombinant chemokines were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Hank's balanced salt solution was obtained from Invitrogen (Piscataway, NJ, USA), supplemented with 0.5% endotoxin-free bovine albumin (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). Calcein-AM, Fura-Red and Fluo-3 were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

### Cell lines

The human monocytic cell line tumour human peripheral blood (THP-1) (ATCC TIB-202) was cultured in RPMI-1640 media (Life Technologies, Rockville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS), sodium pyruvate, non-essential amino acids and penicillin/streptomycin (Life Technologies).

### Chemotaxis assays

Chemotaxis assays were carried out using modified Boyden's chambers (NeuroProbe, Inc., Cabin John, MD, USA), as described previously [17]. In experiments using peptides, cells were preincubated with different concentrations of peptide (0–4  $\mu\text{M}$ ) for 15 min at 4°C before the assay. Chemokines (0–0.1  $\mu\text{M}$ ) were loaded in the lower chamber separated by a 5- $\mu\text{m}$  polycarbonate membrane from the cells ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ), which are loaded in the upper chamber. After a 90-min incubation at 37°C, the membrane was separated and non-migrating cells were removed with a scraper. The membrane was air-dried, and migrating cells were quantified by detecting fluorescence in a molecular imager (FX; BioRad, Hercules, CA, USA).

### Calcium flux assays

Cells ( $1 \times 10^7/\text{ml}$ ) were loaded with a solution containing 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fura-Red (Molecular Probes), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fluo-3 and 0.1% pluronic acid in RPMI-1640/2% FCS media for 45 min at 37°C, in the dark. After incubation, cells were centrifuged, washed twice with RPMI-1640 2% FCS and kept at 4°C until they were acquired using a fluorescence activated cell sorter (FACScan) cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). For acquisition, cells were diluted in RPMI-1640 to a

final density of  $1 \times 10^6$  cells/ml, and data were analysed using the FACS Assistant software (Beckton Dickinson). Changes of cytosolic free calcium were monitored after addition of chemokines (0.1–0.5  $\mu\text{M}$ ) or peptides (4.2–8.4  $\mu\text{M}$ ). Fluo-3 and Fura Red were excited at 488 nm with Fluo-3 emission detected at 515–535 nm and Fura Red emission detected at 665–685 nm. The data are presented as the relative ratio of fluorescence of Fluo3/Fura Red.

### Murine peritonitis model

BALB/c mice (4–6 weeks old) were injected with 1 ml of a 3% thioglycolate solution; 24 h later, 1 mg/kg of peptide in saline solution (SS) (final volume of 100  $\mu\text{l}$ ) was administered intraperitoneally (i.p.). Mice were killed 72 h post-thioglycolate injection. Total peritoneal cells were harvested by washing the peritoneal cavity with 4 ml of prewarmed sterile RPMI-1640 medium. The collected fluid was centrifuged, cells were separated and supernatant was kept frozen at –20°C. An aliquot of the cell suspension was fixed on a coverslip using a Cytofuge-2 cytocentrifuge system (StatSpin, Norwood, MA, USA), stained by Wright–Giemsa staining and cells counted differentially under a light microscope.

### Ovalbumin-sensitization and challenge

We have followed a protocol of immunization and challenge that has been reported previously, with minor modifications [18]. Briefly, groups of age-matched (6–8 weeks) female, BALB/c mice were immunized i.p. with 100  $\mu\text{l}$  of a 10  $\mu\text{g}$  ovalbumin (OVA) suspension in 1 mg of alum (Pierce, NJ, USA) on days 0 and 5. After immunization, mice were challenged intratracheally (i.t.) with a solution of 0.75% OVA in SS, on day 12. Control groups received SS on the same day. On day 15, mice were treated i.t. either with the peptides (2 mg/kg) or with SS. After treatment, mice were killed on day 16. Bronchoalveolar lavages (BAL) were obtained using 4 ml of SS. Cell suspension from BAL was centrifuged and fixed on a coverslip by citospin. Cells were stained by Wright–Giemsa staining and counted differentially at 40 $\times$  under a light microscope.

### Lung tissue processing and histochemical analysis

Mice were killed and the lungs were fixed by i.t. instillation of 1 ml of 90% ethanol. After fixation, lungs were embedded in paraffin and processed for analysis. Tissue sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) staining to assess cellular infiltrate. Mucus production was revealed by periodic acid Schiff (PAS) staining. Transversal lung tissue sections, embedded in paraffin and stained with H&E, were photographed at 100 $\times$ . Eight animals from each group (five fields from each animal) were measured using the Motic Image Plus 2.0 software (Motic Instruments Inc., British Columbia, CA, USA). Bronchioles were identified by their

structure, characterized by ducts covered by tall cubical ciliated epithelia surrounded by smooth muscle, while pulmonary vessels were covered by its tunica intima, media and adventitia. From each bronchiole, the length in  $\mu\text{m}^2$  from the basal lamina to the external muscle layer was measured, while in the case of pulmonary vessels the space between the adventitia and the connective tissue was analysed.

Experimental protocols involving animals were approved and conducted in accordance with the Instituto de Investigaciones Biomédicas's Animal Safety Committee guidelines.

### Enzyme-linked immunosorbent assays

An enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) assay to determine levels of anti-immunoglobulin E (IgE) OVA-specific antibodies in serum and bronchoalveolar fluid (BALF) was developed using a biotinylated anti-IgE antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions. To determine serum levels of IgG1 and IgG2a, an ELISA assay was developed using secondary anti-IgG1 and anti-IgG2a peroxidase-labelled antibodies (Zymed, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Cytokine levels in BAL and serum were quantified using commercially available ELISA kits (Opt EIA; BD Pharmigen, San Diego, CA, USA).

### Statistical analysis

Data were analysed by using the one-way ANOVA test to determine between-groups significance. *P*-values < 0.05 were considered significant.

## Results

### Analysis of the agonistic activity of CCL13-derived peptides

To determine whether the CDP-1 and CDIP-2 have agonistic activities, *in vitro* chemotaxis assays were evaluated using the THP-1 monocytic cells. These cells were stimulated with each of the peptides using CCL13 as a control. None of the peptides was able to induce a chemotactic response in THP-1 cells. Figure 1a shows a representative experiment using 0.42  $\mu\text{M}$  of CDP-1 and CDIP-2 peptides, and the corresponding CCL13 control used at 0.1  $\mu\text{M}$  (which corresponds to the peak of dose-response in chemotaxis for THP-1 cells, data not shown). To characterize further the potential chemotactic response to CDPs, we tested different concentrations of these peptides (0.004–42  $\mu\text{M}$ ). In Fig. 1b representative data are shown of the chemotactic response of CDIP-2. None of these concentrations induced a significant chemotactic response on THP-1 cells. In addition, to determine whether these peptides were capable of inducing intracellular calcium fluxes, different peptide concentrations (0–4.2  $\mu\text{M}$ ) were used to stimulate THP-1 cells and calcium

responses were measured using a flow cytometer (Fig. 1c). As shown, both peptides, CDP-1 and CDIP-2 (at 4.2  $\mu\text{M}$ ) were incapable of inducing calcium flux responses in THP-1 cells compared with CCL13 (0.1  $\mu\text{M}$ ), which induced significant calcium mobilization.

### Analysis of the antagonistic activities by CCL13-derived peptides

Because no chemotactic responses were induced by CDPs, we explored the possibility that these peptides could be acting as antagonists, possibly by binding the chemokine receptors without inducing activation or by blocking the binding of CCL13 to their receptors. First, to evaluate their antagonistic effect, THP-1 cells were preincubated with different concentrations of each peptide (1–4.2  $\mu\text{M}$ ) for 15 min at 4°C, prior to chemotaxis assays using CCL13 (1  $\mu\text{M}$ ) as agonist. Interestingly, CDIP-2 (<2.1  $\mu\text{M}$ ) induced more than 40% of inhibition of the chemotactic response of THP-1 cells compared with other CDP. At lower concentrations (1  $\mu\text{M}$ ), it had little or no effect on CCL13-mediated chemotaxis (Fig. 2a). In addition, we determined the effect of CDIP-2 on both human peripheral blood mononuclear cells and murine peritoneal mononuclear cells, showing a similar antagonistic effect (data not shown). Furthermore, we determined whether the CDPs might have an inhibitory effect on the calcium flux response. Peptides (4.2–8.4  $\mu\text{M}$ ) were added to monocytic cells before adding CCL13 (0.1  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 2b) and calcium fluxes were determined by FACS analysis. As shown, none of the tested peptides (CDIP-2 and CDP-1) inhibited the calcium flux induced by CCL13.

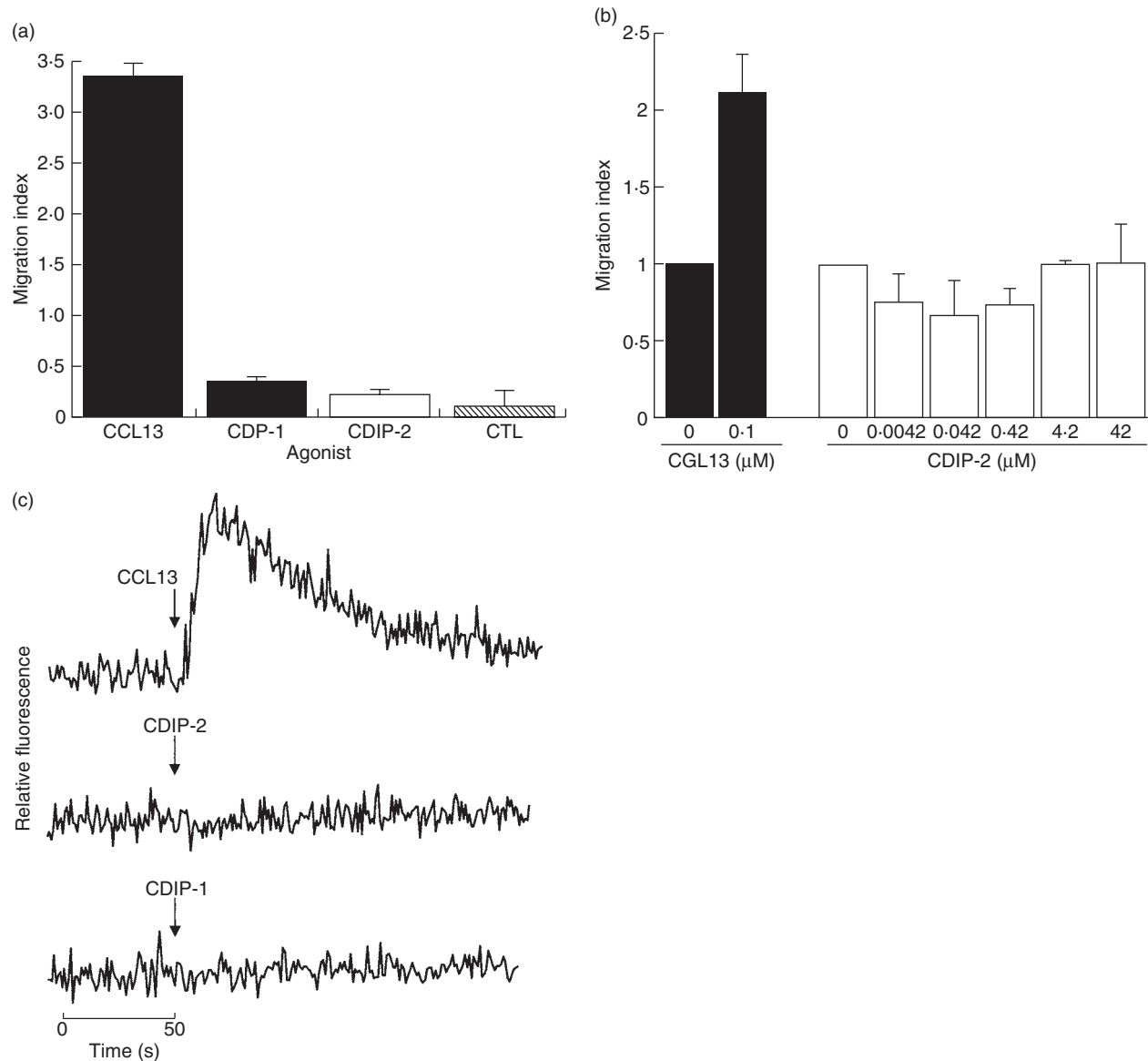
### Specificity of CDIP-2-mediated antagonism

To analyse further the specificity of this antagonist effect, CDIP-2 was tested on two other members of the monocyte chemoattractant protein (MCP) subfamily, CCL2 (MCP-1) and CCL8 (MCP-3). These chemokines bind to chemokine receptors CCR2 and CCR1, 2 and 3 respectively. Preincubation with CDIP-2 or CDP-1 peptides (2.1–4.2  $\mu\text{M}$ ) had little or no effect on the chemotactic responses induced by CCL2 (0.05  $\mu\text{M}$ ) and CCL8 (0.05  $\mu\text{M}$ ) on THP-1 cells (Fig. 3a). In addition, we analysed the antagonist activity of CDIP-2 on calcium flux assays. As tested in chemotaxis assays, CDIP-2 (2.1–4.2  $\mu\text{M}$ ) had no antagonist effect on CCL2 (0.1  $\mu\text{M}$ ) and CCL8 (0.1  $\mu\text{M}$ ) functions (Fig. 3b). The same response was observed when CDP-1 (2.1–4.2  $\mu\text{M}$ ) peptide was tested (not shown). These results may suggest that the antagonist effect of CDIP-2 on monocytic cells may be specific for CCL13-mediated responses.

### Murine peritonitis model

As a first approach to investigate the *in vivo* antagonist effects of CDIP-2, we used a well-characterized murine model of





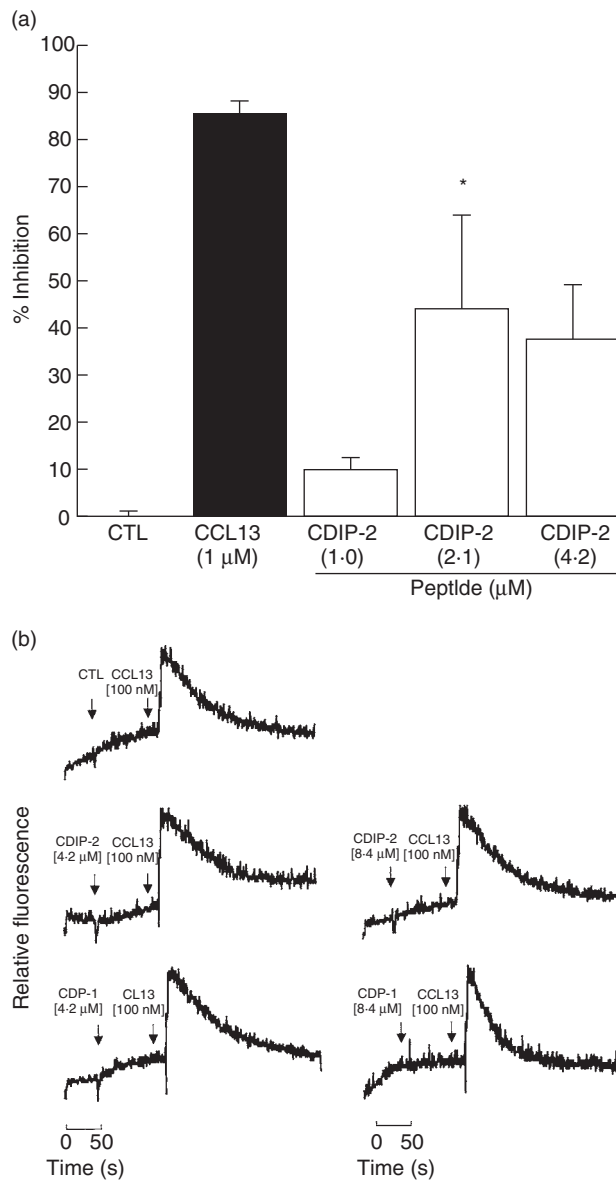
**Fig. 1.** Analysis of the agonistic properties of chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)-derived peptides (CDPs) in tumour human peripheral blood monocytic (THP-1) cells. (a) Chemotaxis assays. THP-1 monocytic cells were used in a chemotaxis assay using the CDPs as agonists, as described in Methods. Peptides were used at a concentration of 0.42 μM. The chemokine CCL13 (0.1 μM) was used as control. Data are expressed as the mean migration index as described in Methods. (b) Dose–response analysis of CDIP-2 chemotaxis assays using different concentrations of CDIP-2 peptide (0.004–42 μM). CCL13 (0.1 μM) was used as control. (c) Calcium flux assays. Calcium flux responses induced by CDPs was monitored by cytometry and displayed as relative fluorescence ratio. THP-1 cells were stimulated with 8.4 μM of CDPs and 0.1 μM of the chemokine CCL13 at different time-points (arrow). Tracings are from a representative three independent experiments.

peritoneal inflammation induced by thioglycolate medium. Inflammation was induced after i.p. injection of a 3% thioglycolate as described in Methods. After 72 h of treatment, the inflammatory response is characterized by recruitment of a high percentage (70–80%) of mononuclear cells. Mice treated with CDIP-2 peptide showed consistently reduced numbers of total cell infiltration (76%) when compared with controls (no peptide treatment or SS) (Fig. 4). CDIP-2 affected the recruitment of macrophages compared with other cell types such as lymphocytes (data not shown).

CDP-1 also had a reduction (45%) on the inflammatory cell recruitment, although it was always lower than with CDIP-2.

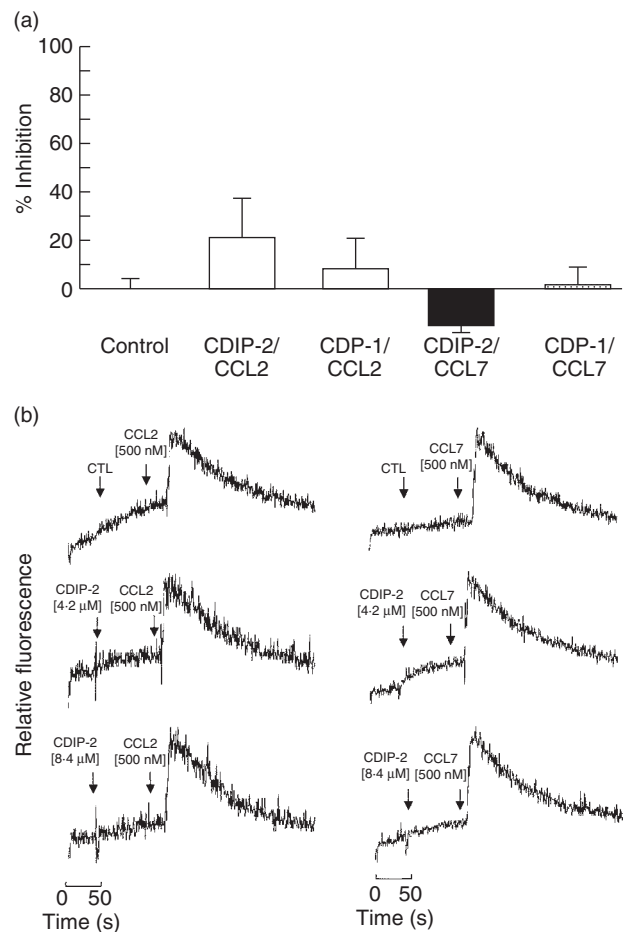
#### Allergic lung inflammation model

In addition, an *in vivo* model of OVA-induced allergic lung inflammation was analysed. Mice were immunized and challenged i.t. with OVA as described in Methods. Seventy-two hours after the last challenge (day 15), mice were treated i.t. either with peptides (2 mg/kg weight) or with SS. Mice were

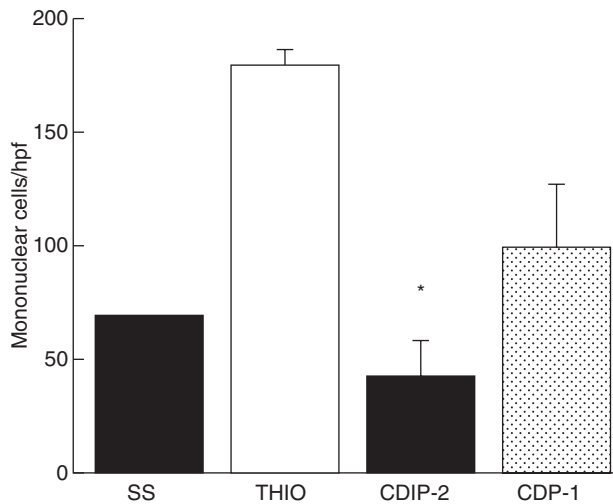


**Fig. 2.** Antagonistic activities induced by chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)-derived peptides (CDPs) in tumour human peripheral blood monocytic (THP-1) cells. (a) CDIP-2 peptide inhibits CCL13-mediated chemotactic responses of THP-1 cells. Cells were preincubated with different concentrations of either peptide CDIP-2 (1–4.2 μM) or CCL13 (1 μM) previous to the chemotaxis assay using CCL13 (1 μM) as a chemoattractant. Results are shown as percentage of inhibition  $\pm$  standard error ( $*P < 0.01$ ). (b) Analysis of the antagonist activities of CDIP-2 in calcium flux responses. Calcium flux responses induced by CDPs was monitored by cytometry and displayed as relative fluorescence ratio. CDIP-2 and CDP-1 (4.2–8.4 μM) peptides were added to THP-1 cells (arrow 1) before stimulation (arrow 2) with human CCL13 (0.1 μM). The data show a representative experiment ( $n = 3$ ).

killed 24 h after peptide treatment (day 16). BAL fluids and tissues were obtained and analysed by ELISA and histochemistry. As shown in Fig. 5, this model of allergic lung inflammation induced a typical recruitment of inflammatory cells around the vessels (Fig. 5a–d), as well as the peribronchial areas (Fig. 5e–h). The production of mucin by goblet cells was also observed by PAS staining (Fig. 5i–l). CDIP-2 treatment (Fig. 5c,g) reduced significantly the inflammatory process induced by administration of OVA (Fig. 5b,f), in particular the recruitment of eosinophils and mononuclear cells to the peribronchial and perivascular area (Fig. 6). In addition, the production of mucin by goblet cells was also diminished (Fig. 5k) in the CDIP-2 peptide-treated



**Fig. 3.** Analysis of the antagonist activities of CDIP-2 on other chemokine (C-C motif) ligand (CCL) chemokines. (a) Chemotaxis assays. Tumour human peripheral blood monocytic (THP-1) cells were preincubated with either CDIP-2 (4.2 μM) or CDP-1 (4.2 μM) peptides prior to the chemotaxis assay using CCL2 (0.1 μM) or CCL7 (0.1 μM) as agonists. Results are shown as percentage of inhibition ( $\pm$  standard error) ( $P > 0.2$ ). (b) Calcium flux induced by CCL13-derived peptides (CDPs) and chemokines was monitored by flow cytometry and displayed as relative fluorescence ratio. CDIP-2 and CDP-1 (4.2–8.4 μM) peptides were added to THP-1 cells (arrow 1) before stimulation (arrow 2) with human CCL7 (0.1 μM) and CCL2 (0.1 μM). The data show a representative experiment ( $n = 3$ ).



**Fig. 4.** Analysis of the *in vivo* antagonist activities of CDIP-2 using a murine peritonitis model. BALB/c mice were immunized intraperitoneally with 3% thioglycolate broth, and were treated 24 h later with peptides either CDIP-2 or CDP-1 (1 mg/kg). Mice were killed 48 h later, peritoneal washes were obtained, and number of total cells counted under light microscope. The data are presented as number of migrating cells per high-power field. (\* $P < 0.02$ ).

animals in comparison with untreated animals (Fig. 5j). Treatment with other peptides such as CDP-1 had a null effect on cell recruitment (Fig. 5d,h,l).

When we analysed the BAL fluid of the CDIP-2-treated mice, our results displayed similar features to those observed in the tissues. A decrease in total cell numbers (Fig. 7a) as well as in the number of mononuclear cells and eosinophils (Fig. 7b) was observed in CDIP-2-treated mice, compared with SS-treated mice, while mice treated with CDP-1 peptide showed a less pronounced effect (data not shown).

Finally, we analysed whether peptide treatment might have an effect on the production of IgE antibodies and T helper 2 (Th2)-associated cytokines in both, serum and BALF. Using ELISA assays, it was found that serum levels of anti-OVA IgE-specific antibodies diminished but not IgG1 or IgG2a, which are part of the hallmarks of the allergic inflammatory response in the lung (Table 1). Interestingly, we also found a decrease in the levels of interleukin (IL)-4 but not interferon- $\gamma$  or tumour necrosis factor- $\alpha$  cytokines in the BALF of the CDIP-2 treated mice compared with non-treated or control mice (Table 2). Altogether, this may indicate that, under these conditions of treatment, CDIP-2 may be affecting the amplification of the Th2 responses generated during the allergic airway inflammation.

## Discussion

Understanding the mechanisms by which chemokines bind and activate their receptors is crucial for the design and development of therapeutic tools to be used in inflammatory and infectious diseases [19]. As an initial attempt to investigate these interactions, we designed several chemokine-derived synthetic peptides based on published data regarding the agonist and antagonist activities of several members of the CCL chemokine family on leucocytes. In particular, we select and tested several CCL13-derived peptides and found that none of them displayed agonistic activities. This lack of agonism could be explained by the fact these peptides might lack the crucial residues required for induction of functions such as migration or induction of calcium fluxes in mononuclear cells. Indeed, the mature N-terminal amino acid sequence is thought to be important for the biological activity and leucocyte selectivity of some CCL chemokines. For example, addition or deletion of the first residue in the amino terminal region of CCL2 reduces

**Table 1.** Effect of CDIP-2 on antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Ag-specific immunoglobulin G1 (IgG1), IgG2a and IgE in serum obtained from of untreated ( $n = 5$ ) and peptide-treated ( $n = 5$ ) mice was quantified by ELISA as described in Methods. Mean values are reported as  $A_{450}$  nm units ( $\pm$  standard error).

	SS	OVA	OVA + CDIP-2	OVA + CDP-1
IgG1	0.10 (0.014)	2.20 (0.013)	2.00 (0.004)	2.10 (0.05)
IgG2a	0.02 (0.001)	0.48 (0.08)	0.56 (0.25)	0.50 (0.20)
IgE	0.02 (0.001)	1.07 (0.21)	0.80 (0.17)	1.09 (0.31)

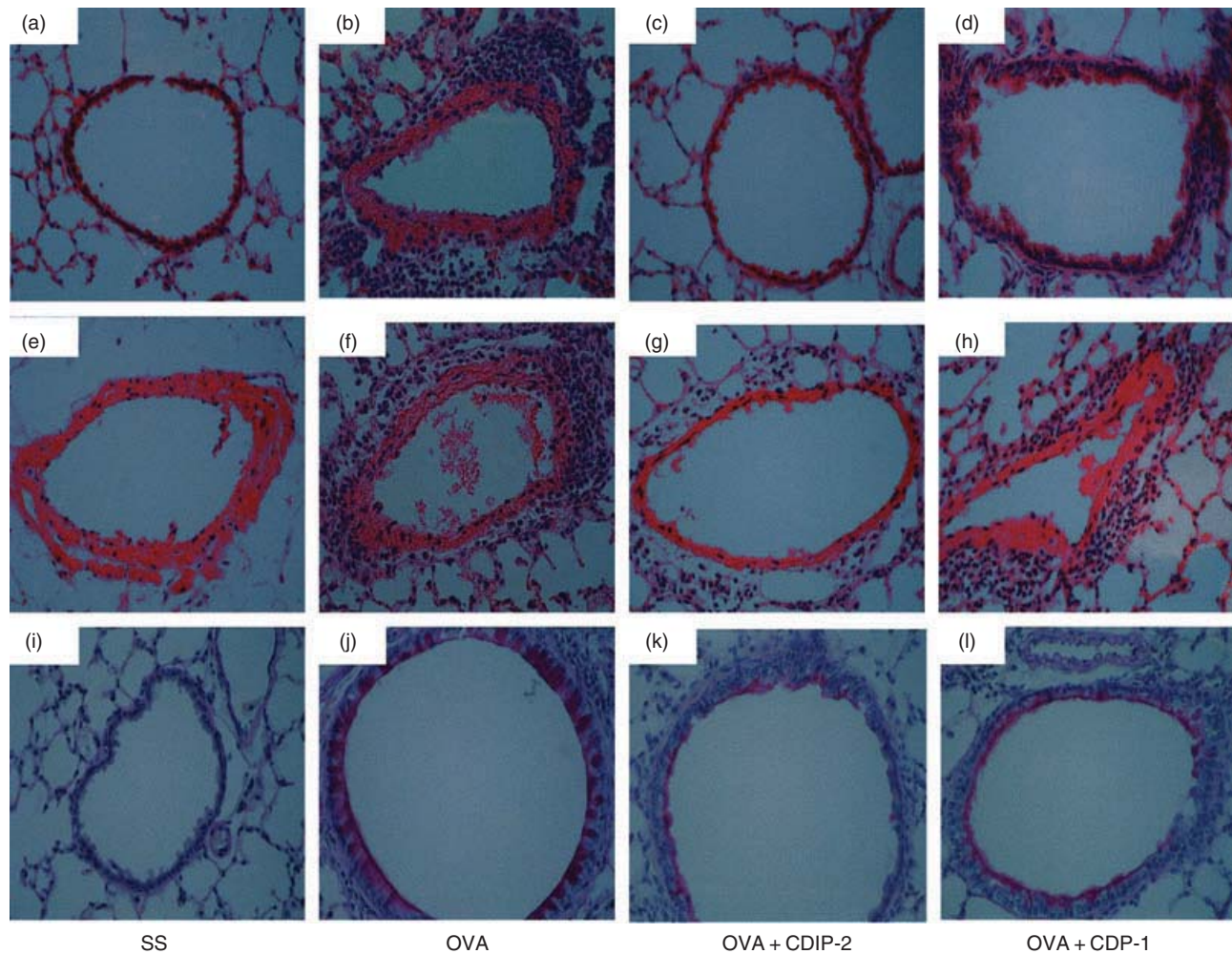
CDP, chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)-derived peptides; OVA, ovalbumin; SS, saline solution.

**Table 2.** Effect of CDIP-2 on cytokine levels by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Determination of interleukin (IL)-4, interferon (IFN)- $\alpha$ , and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  cytokines in the bronchoalveolar fluid of untreated ( $n = 5$ ) and peptide treated ( $n = 5$ ) mice by ELISA as described in Methods. Values reported as pg/ml ( $\pm$  standard error).

	SS	OVA	OVA + CDIP-2	OVA + CDP-1
IFN- $\alpha$	30.5 (3.95)	31.5 (5.20)	30.00 (11.54)	30.5 (2.93)
TNF- $\beta$	28.5 (2.73)	31.0 (1.78)	27.00 (1.86)	28.0 (0.94)
IL-4	56.5 (6.33)	161.1 (12.84)	56.38 (3.21)	86.3 (2.85)

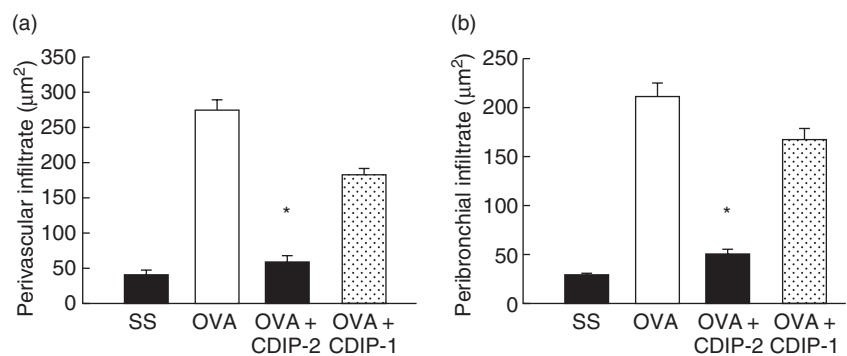
CDP, chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)-derived peptides; OVA, ovalbumin; SS, saline solution.

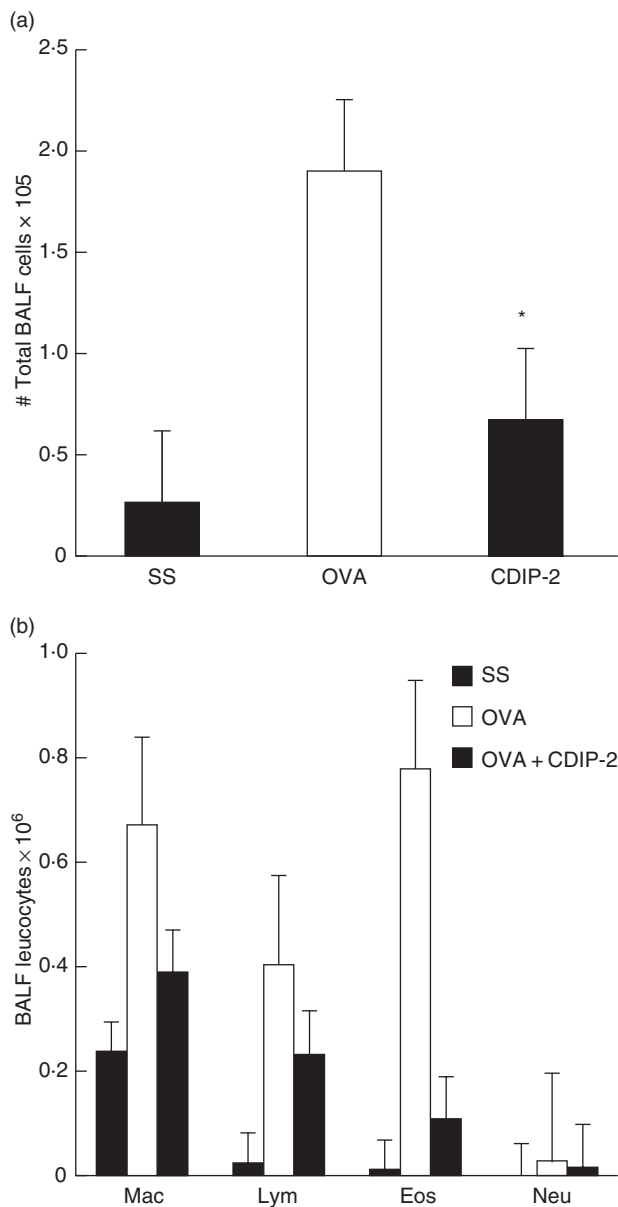




**Fig. 5.** Analysis of the effect of CDIP-2 in an ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation murine model. BALB/c mice were sensitized and challenged with OVA following the protocol described in Methods. Controls using saline solution (SS) and chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)-derived peptide (CDP)-1 treatment and challenge were performed as described. Histological analysis of haematoxylin and eosin-stained lung tissue sections of (a,e) SS-treated mice, (b,f) OVA-sensitized, OVA-challenged and SS-treated, (c,g) OVA-sensitized, OVA-challenged and CDIP-2-treated mice, (d,h) OVA-sensitized, OVA-challenged and CDP-1-treated mice. Histological analysis of periodic acid Schiff-stained lung tissue sections. (i) SS-treated mice, (j) OVA-sensitized, OVA-challenged and SS-treated, (k) OVA-sensitized OVA-challenged and CDIP-2-treated mice, (l) OVA-sensitized, OVA-challenged and CDP-1 treated.

**Fig. 6.** Quantitative analysis of inflammatory cells in haematoxylin and eosin-stained lung tissues. Quantitative analysis of the recruited inflammatory cells in the (a) perivascular and (b) peribronchial regions. Cell infiltrate area ( $\mu\text{m}^2$ ) from selected areas is shown in the histograms and analysed as described in Methods. A representative experiment is shown ( $n = 5$ ) (\* $P < 0.001$ ).





**Fig. 7.** Analysis of the bronchoalveolar fluid (BALF) cells of the CDIP-2-treated and untreated mice. (a) Analysis of the total BALF cell numbers. Cells were separated from the BALF and counted under microscope as described in Methods. (b) Differential cell counting of the BALF in the CDIP-2-treated mice, compared with those treated with chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)-derived (CDP)-1 peptide or saline solution (SS) treatment. Data represent total number of cells  $\times 10^5$  ( $n = 5$ ) ( $*P < 0.01$ ). Mac, macrophages; Lym, lymphocytes; Eos, eosinophils; Neu, neutrophils.

its biological activity on monocytes by 100–1000-fold [20]. Additionally, an N-terminal extension in CCL13 and CCL11 decreases their biological functions [21]. Hence, it was proposed that the residues, which would allow binding and activation of CCL2 to chemokine receptor CCR2, might be distributed throughout the entire protein [22].

This may not be the case for all chemokines, as it was shown that peptides (1–10 aa length) from the NH<sub>2</sub>-terminus of chemokine CCL5 induced chemotaxis of THP-1 cells [23]. Similarly, a peptide (1–17) derived from CXCL12 promotes chemotaxis of T cells [24]. This peptide competes with complete CXCL12 for binding its CXCR4 receptor, suggesting that its NH<sub>2</sub>-terminal region is important for binding and activation. Furthermore, these data are supported by mutational analysis of CXCL12, in which the first two NH<sub>2</sub>-terminal residues are required for activation, while 12–18 amino acids may be involved in binding to CXCR4 [25].

Moreover, analysis of the biological effect of metalloproteases on MCP chemokines such as CCL7 and 13 resulted in the finding that NH<sub>2</sub>-terminal truncated chemokines were inactive [15,26]. This finding indicated that the NH<sub>2</sub>-terminal region might be important for agonist functions in these chemokines.

In this report, we have investigated the agonist functions of two CCL13-derived peptides, CDP-1 and CDIP-2, and demonstrated that the residues in these peptides are not sufficient to elicit agonistic responses in monocytic cells expressing CCR1 and CCR2. This lack of activity is probably not due to low peptide affinity, because even at higher (42  $\mu$ M) concentrations of peptides we were unable to induce chemotaxis of THP-1 cells. Instead, other regions of the protein may be required for the activation of these chemokine receptors.

In addition, as part of our analysis of biological functions modulated by CCL13-derived synthetic peptides, we analysed for antagonism mediated by these peptides and found that CDIP-2 antagonized some of the biological responses mediated by CCL13. Interestingly, CDIP-2 could inhibit *in vitro* monocyte chemotaxis, but did not inhibit calcium flux mobilization. This finding suggests that several functional responses elicited by chemokines can be inhibited selectively at the chemokine–receptor interaction level, making it possible to design inhibitors that target one or several responses at a time. This antagonistic effect was observed on CCL13, but not on other related CC chemokines that share chemokine receptors, such as CCL2 and CCL7. These findings suggest that it is possible to design antagonists, which can target specific ligands even if they share chemokine receptors with other ligands. Our results suggest that CDIP-2 may be acting on chemokine receptors CCR1, 2 and 3. We are currently investigating which of these receptors is involved specifically in its antagonist function. Our data also imply that there are important differences in the mechanisms of activation used by closely related chemokines. Interestingly, CDIP-2 is a novel antagonistic peptide which spans a short region of the NH<sub>2</sub>-terminal and part of the  $\beta$ -sheet region of CCL13 (19–37). This region has not been investigated as an antagonist in other members of the MCP/CCL family of chemokines.

Several small molecule inhibitors of chemokine receptors are now being developed for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. CCR3 antagonists,

which block eosinophil chemotaxis, are now in clinical development for asthma therapy [27]. Using an allergic inflammation murine model, we have shown that a single dose of CDIP-2 peptide can inhibit the inflammatory response in the lungs of treated mice. CDIP-2 was capable of reducing both the peribronchial and perivascular recruitment of mononuclear and eosinophil cells. In addition, production of mucus by goblet cells was also diminished. Both inflammatory cell recruitment and mucus production are important signs of the physiopathology of asthma.

Additionally, serum and BALF levels of proinflammatory Th2-like cytokines such as IL-4 were affected by CDIP-2 treatment. This correlates with the role of IL-4 in the promotion of eosinophilic inflammation and inhibition of eosinophil apoptosis. Indeed, a reduction in the number of eosinophils obtained from the BALF is accompanied by a reduction in the levels of IL-4. This could also be associated with a reduction in the levels of IL-5 or chemokines such as CCL11 (data not shown). As already known, IL-4 is involved in the production of IgE by B lymphocytes. In this context, CDIP-2 treatment also had an effect on the levels of anti-OVA-specific IgE antibodies. It was proposed that preventing eosinophilia in the lung must be beneficial to the asthmatic patients. Therefore, using modified or truncated chemokines aimed at reducing the recruitment of these cells may be of relevance in the treatment of allergic inflammatory diseases such as asthma.

Altogether, our results demonstrate that a CCL13-derived peptide, CDIP-2, is capable of inhibiting both *in vitro* chemotaxis and inflammation in two different *in vivo* murine models. CDIP-2 reduced airway eosinophilia as well as Th2 cytokines, suggesting that it has a potential use as a therapeutic agent in lung diseases such as asthma.

## Acknowledgements

We would like to thank Veronica Rodríguez and Judith Reyes for processing tissue samples for histological analysis. Thanks are also due to Dr P. Ostoa for providing some reagents and G. Dupont for technical assistance. This work was supported by a CONACYT Grant No. 33365-N (EAGZ). F. M. was supported by a Doctoral Fellowship from CONACYT. E. M. E. was supported by a pre-Doctoral Fellowship from DGAPA-UNAM.

## References

- 1 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; **12**:121–7.
- 2 Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; **10**:61–86.
- 3 Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; **2**:108–15.
- 4 Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; **42**:469–99.
- 5 Monteclaro FS, Charo IF. The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *J Biol Chem* 1996; **271**:19084–92.
- 6 Tenscher K, Metzner B, Hofmann C, Schopf E, Norgauer J. The monocyte chemoattractant protein-4 induces oxygen radical production, actin reorganization, and CD11b up-regulation via a pertussis toxin-sensitive G-protein in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**:32–5.
- 7 Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME *et al.* Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 1996; **157**:5613–26.
- 8 Taha RA, Minshall EM, Miotto D *et al.* Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **103**:476–83.
- 9 Lamkhioued B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S *et al.* Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162**:723–32.
- 10 Chakravorty SJ, Howie AJ, Girdlestone J, Gentle D, Savage CO. Potential role for monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4) in monocyte/macrophage recruitment in acute renal inflammation. *J Pathol* 2001; **194**:239–46.
- 11 Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG, Lipoxin A. 4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**:13266–71.
- 12 Iwamoto T, Okamoto H, Iikuni N *et al.* Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxf)* 2006; **45**:421–4.
- 13 Yang D, Chen Q, Hoover DM *et al.* Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 2003; **74**:448–55.
- 14 Martinez-Becerra F, Silva DA, Dominguez-Ramirez L *et al.* Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-derived peptide (CDAP-4) on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **355**:352–8.
- 15 McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. *Blood* 2002; **100**:1160–7.
- 16 Pertuz Beloso S, Ostoa Saloma P, Benitez I, Soldevila G, Olivos A, Garcia-Zepeda E. Entamoeba histolytica cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol* 2004; **26**:237–41.
- 17 Soldevila G, Licona I, Salgado A, Ramirez M, Chavez R, Garcia-Zepeda E. Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3. *Immunology* 2004; **112**:191–200.

- 18 Huerta-Yepez S, Hernandez-Pando R, Santos-Argumedo L *et al.* Therapeutic efficacy of an *E. coli* strain carrying an ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OMPC in a murine model of allergic airway inflammation. *Vaccine* 2003; **21**:566–78.
- 19 Proudfoot AE, Power CA, Rommel C, Wells TN. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. *Semin Immunol* 2003; **15**:57–65.
- 20 Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K *et al.* Structure–activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 1995; **57**:703–11.
- 21 Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME *et al.* Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 1996; **157**:5613–26.
- 22 Hemmerich S, Paavola C, Bloom A *et al.* Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 1999; **38**:13013–25.
- 23 Wells TN, Guye-Coulin F, Bacon KB. Peptides from the amino-terminus of RANTES cause chemotaxis of human T-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **211**:100–5.
- 24 Loetscher P, Gong JH, Dewald B, Baggiolini M, Clark-Lewis I. N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J Biol Chem* 1998; **273**:22279–83.
- 25 Crump MP, Gong JH, Loetscher P *et al.* Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 1997; **16**:6996–7007.
- 26 McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000; **289**:1202–6.
- 27 De Lucca GV. Recent developments in CCR3 antagonists. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2006; **9**:516–24.

# NOTAS

