



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL REGULADOR DE LA POBLACIÓN LINFOCITARIA CD8+ CCR9+ EN EL PROCESO INFLAMATORIO DEL COLON EN UN MODELO MURINO INDUCIDO POR DSS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
QFB CECILIA FRANCO MENDIETA

DR. EDUARDO A. GARCÍA ZEPEDA  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO  
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA  
[Facultad de Medicina, UAEM](#)

DR. LEOPOLDO FLORES  
[CINVESTAV, IPN](#)

DR. CONSTANTINO III LÓPEZ MACÍAS  
[Centro médico nacional, Siglo XXI, IMSS](#)

DRA. LETICIA MORENO FIERROS  
[FES Iztacala, UNAM](#)

MÉXICO, D. F. Agosto, 2015



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.

## ÍNDICE

### CONTENIDO

I.	ABREVIATURAS.....	4
II.	INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
III.	RESUMEN.....	6
IV.	INTRODUCCIÓN .....	7
4.1	El Sistema inmunológico.....	7
4.2	Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) .....	8
4.3	Tejido linfoide asociado a intestino (GALT).....	8
4.4	Quimiocinas y sus receptores.....	10
4.4.1	Clasificación de las quimiocinas.....	10
4.5	Receptor de quimiocinas CCR9.....	12
4.6	Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) .....	15
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
VI.	HIPOTESIS .....	18
VII.	OBJETIVO GENERAL .....	18
VIII.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
IX.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
9.1	Ratones de experimentación.....	19
9.2	Tipificación ratones de experimentación .....	19
9.2.1	Obtención de ADN de ratón CCR9 HT y CCR9 KO .....	19
9.2.2	Análisis de genotipo CCR9 KO por PCR.....	20
9.3	Reactivos y anticuerpos.....	20
9.4	Inducción y evaluación del proceso inflamatorio intestinal.....	20
9.5	Recolección de muestras.....	22
9.6	Obtención de células para su análisis.....	22
9.6.1	Obtención de IELs y LPLs.....	22
9.6.2	Obtención de linfocitos de bazo y ganglio linfático mesentérico (MLN).....	23
9.6.3	Conteo celular.....	23
9.7	Análisis de distintas poblaciones celulares por Citometria de Flujo. ....	24
9.8	Reacción en cadena de la polimerasa .....	24
9.8.1	Extracción de RNA .....	24
9.8.2	Síntesis de cDNA.....	25

9.8.3	RT-PCR Semicuantitativa .....	25
9.8.4	RT-PCR Tiempo Real .....	26
9.9	Análisis estadístico.....	26
X.	RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	26
XI.	CONCLUSIONES GENERALES.....	47
XII.	REFERENCIAS .....	48

## I. ABREVIATURAS

CCR	Receptor de quimiocinas de la familia CC
CMF	Solución salina balanceada de Hank libre de calcio y de magnesio.
CU	Colitis Ulcerativa
CXCR	Receptor de quimiocinas de la familia CXC
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DSS	Dextran Sulfato de Sodio
DTT	Dithiothreitol
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ELISA	Ensayo ligado a enzima inmunoabsorbente
FACS	Citómetro de flujo
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HE	Hematoxilina/eosina
HRP	Peroxidasa de rábano
HT	Ratones Heterocigotos para un gen determinado
IEL	Linfocitos Intraepiteliales
IIB	Instituto de Investigaciones Biomedicas
KO	Ratones <i>knock out</i> para un gen determinado
LPL	Linfocitos de Lamina Propria
M-MLVRT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina-Moloney
PAS	Ácido peryódico de Schiff
pCD	Células Dendríticas plasmacitoides
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (por sus siglas en inglés)
RT PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa

SFB	Suero fetal bovino
TAE	Solución de tris-acetato EDTA
TCR	Receptor de linfocito T
TECK	Quimiocina expresada en el timo (por sus siglas en inglés)
TGF- $\beta$	Factor transformante de crecimiento beta
TNF – $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores

## II. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura del receptor de quimiocina CCR5.</i>	13
<i>Figura 2: Esquema descriptivo de la metodología propuesta.</i>	19
<i>Figura 3. Descripción del modelo murino de inducción de colitis utilizando DSS al 1%.</i>	21
<i>Figura 4. Variaciones del peso corporal (%).</i>	29
<i>Figura 5. Variaciones de longitud del colon durante tres ciclos de administración de DSS al 1%.</i>	30
<i>Figura 6. Variaciones de longitud del colon ratones HT y KO al finalizar la inducción del proceso inflamatorio crónico.</i>	31
<i>Figura 7. Signos clínicos observados en ratones KO y HT durante los tres ciclos de administración de 1% DDS.</i>	33
<i>Figura 8. Corte histológico teñido con PAS.</i>	34
<i>Figura 9. Comparación de cambios histológicos en colón murino.</i>	36
<i>Figura 10. Porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ en compartimiento intraepitelial y en lamina propia.</i>	39
<i>Figura 11. Expresión del receptor de quimiocinas CCR9+ en linfocitos CD8+ y CD4+ del compartimiento intraepitelial y de lámina propia.</i>	40
<i>Figura 12. Porcentaje de linfocitos T4Reg y T8Reg en el compartimiento intraepitelial y en lamina propia.</i>	41
<i>Figura 13. Expresión del receptor de quimiocinas CCR6.</i>	42
<i>Figura 14. Porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ que expresan el receptor CCR9+ en órganos linfoides secundarios (MLN y bazo)</i>	43
<i>Figura 15. Expresión relativa de CCR9 y CCL25 en colón</i>	45
<i>Figura 16. Expresión relativa de TNF<math>\alpha</math> en colón (porción del recto)</i>	46

### TABLAS

<i>Tabla 1: Expresión del ligando de CCR9, CCL25 en diferentes órganos.</i>	14
<i>Tabla 2: Expresión del receptor de quimiocinas CCR9, en diferentes órganos</i>	15
<i>Tabla 3: Calificación histológica de colitis.</i>	21
<i>Tabla 4: Especificaciones para PCR tiempo real</i>	26

### III. RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que comprende la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU), es una enfermedad crónica multifactorial. En este estudio se evaluó el papel del receptor CCR9 de quimiocinas en la regulación del proceso inflamatorio, en un modelo murino de colitis inducida por dextran sulfato de sodio (DSS).

Se estudiaron dos grupos de ratones hembra C57BL/6, uno HT y el otro KO para el receptor de quimiocinas CCR9; ambos grupos fueron administrados con 1% de DSS en agua de bebida durante tres ciclos consecutivos (5 días DSS seguidos de 7 días de agua *ad libitum*). Se determinó el daño a la mucosa intestinal por análisis histopatológico. La expresión de CCR9 y de marcadores linfocitarios en ganglio linfático mesentérico (MLN), bazo y linfocitos intraepiteliales (IEL) y de lamina propia (LPL) se evaluó por citometría de flujo y la expresión de CCR9, CCL25 y FOXP3 mediante RT-PCR.

Los resultados mostraron un proceso inflamatorio intestinal al final del tercer ciclo, que se calificó mediante una escala de evaluación con 21 puntos para el grupo KO y 6 puntos para el grupo HT. Se observó que en los ratones KO el porcentaje de IEL CD8+ está disminuido y que la población de LPL CD8+ es mayor para este grupo que para el HT, aunque se conserva la relación CD4+ y CD8+. En cuanto a la expresión de CCR9, se observó que la población IEL presenta una mayor proporción de linfocitos CD8+ CCR9+ tanto para los grupos KO como HT, mientras que la población LPL presenta una mayor proporción de linfocitos CD4+CCR9+ para ambos grupos. Para la población T4Reg CD4+CD25+FOXP3+, se observó una mayor presencia de esta en los ratones KO que en los HT y para la población T8Reg CD8+CD25+FOXP3+, se encontró que la población T8Reg en LPL se encuentra incrementada en los ratones KO pero no así en la población IEL. La expresión relativa de CCR9-CCL25 en el epitelio del colon no había sido demostrada, hasta principios del 2012. El presente trabajo demuestra que tanto la quimiocina como su receptor no sólo se encuentran presentes en el intestino de los ratones tratados con DSS1%, sino que también la expresión de la quimiocina CCL25 se encuentra elevada en los ratones KO respecto a los HT y que ambas moléculas incrementan su expresión a lo largo del tratamiento, observándose mayor expresión en la fase crónica de la inflamación (36d) con respecto a la fase aguda (12d).

Lo anterior sugiere que CCR9 puede estar involucrado en la regulación de la respuesta inmune en el proceso inflamatorio intestinal (EII) y que la población CD8+ participa en este proceso.

## IV. INTRODUCCIÓN

### 4.1 El Sistema inmunológico

La principal función del sistema inmunológico es distinguir entre las moléculas propias, y las no propias, las cuales debe ser capaz de procesar y eliminar.<sup>1</sup> Por lo tanto la definición de respuesta inmune es la reacción del organismo, fisiológica o patológica, a los componentes de los microbios así como a las macromoléculas como proteínas y polisacáridos y químicos pequeños que son reconocidos como extraños.<sup>2</sup>

Para su estudio el sistema inmunológico se divide en sistema inmunológico sistémico, compuesto por médula ósea, bazo y nódulos linfoides; y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), integrado por el tejido linfoide asociado a nariz (NALT) y trompa de Eustaquio (TALT), tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), tejido linfoide asociado a laringe (LALT), tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y el tejido linfoide asociado al tracto genitourinario (GUALT).<sup>3</sup> A su vez, la respuesta inmune se clasifica para una mejor comprensión durante su estudio, de acuerdo con la velocidad con la que se desencadena y de los componentes celulares y moleculares involucrados, inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata o nativa brinda la respuesta temprana contra los microorganismos. Consiste en mecanismos de defensa de barrera (piel, epitelio de la mucosa), celulares (fagocitos, *natural killers*) y bioquímicos (péptidos antimicrobianos, complementos, citocinas y quimiocinas), que se encuentran en el sitio diana aún antes de que se desarrollen los procesos infecciosos permitiendo así una respuesta rápida a estos.<sup>2</sup> El mecanismo de acción de la inmunidad innata es específico para el reconocimiento de estructuras bacterianas relacionadas y es posible que no distinga diferencias entre sustancias extrañas.<sup>3</sup>

En contraste con la respuesta innata, la respuesta adaptativa es estimulada por la exposición a agentes infecciosos e incrementa su capacidad de respuesta con la exposición sucesiva a microorganismos particulares. Sus características son muy sofisticadas y específicas para las distintas moléculas antigénicas, así como también lo son a su capacidad de memoria y de respuesta exacerbada cuando existe exposición repetida al mismo microorganismo.<sup>2</sup> La respuesta inmune, involucra anticuerpos y receptores de linfocitos T como sistemas de reconocimiento que han evolucionando en respuesta a la alta tasa de mutación de patógenos y a la replicación intracelular. Los receptores antígeno – específicos están expresados por los linfocitos, población celular clave en la respuesta inmune adaptativa.<sup>4</sup>

## 4.2 Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

El MALT representa el área más grande del cuerpo, 900 m<sup>2</sup> de superficie corporal y ha desarrollado mecanismos que discriminan entre antígenos inofensivos como la comida, microorganismos comensales y los patógenos peligrosos, este mecanismo es conocido como tolerancia inmunológica. Por otro lado una serie de agentes y mecanismos no inmunológicos tales como la flora bacteriana normal, la peristasis y la función ciliar que disminuye la interacción de organismos patógenos con células epiteliales.<sup>1</sup>

El MALT funcionalmente se divide en sitios inductores y sitios efectores. Los sitios inductores son tejido linfoide secundario en donde los antígenos son captados desde la superficie de la mucosa (GALT, BALM y NALT) y estimulan a los linfocitos T y B *naive*. Una vez que ocurre la activación los linfocitos T y B, estos migran de los sitios inductores a los sitios efectores, los cuales están diseminados en todo el tejido y se distribuyen de manera difusa en la lámina propia<sup>2</sup>.

La composición celular principal del MALT consiste en agregados de tejido linfoide no encapsulado, así como de gran cantidad de células plasmáticas IgA, IgG e IgM, linfocitos B, células dendríticas y macrófagos.<sup>4</sup> La mucosa es uno de los sitios principales para la entrada de antígenos al organismo<sup>5</sup>. Específicamente, en la mucosa del tracto gastrointestinal, la población linfocitaria se concentra en el epitelio y en la lámina propia tanto del intestino delgado como del grueso. En la lámina propia, se encuentran presentes células plasmáticas secretoras de IgA y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresan TCR $\alpha\beta$ . Por otro lado, los linfocitos que se encuentran en el epitelio, son predominantemente linfocitos T que expresan tanto TCR $\alpha\beta$  como TCR $\gamma\delta$ , siendo las poblaciones predominantes CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> en el epitelio del intestino delgado, y CD4<sup>+</sup> en el epitelio del colon<sup>6,7</sup>.

Los linfocitos T de mucosa intestinal presentan un fenotipo de linfocitos efectores de memoria caracterizado por la expresión de las moléculas CD45RO, CD69, CD95 y CD28<sup>6,7,8</sup>. Estas células, a excepción de los linfocitos T CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> que provienen del timo, necesitan de un estímulo previo en los órganos linfoides secundarios para poder ingresar a la mucosa intestinal<sup>7</sup>. Dicho estímulo, mediado por metabolitos de ácido retinoico, induce la expresión del receptor de quimiocinas CCR9 y la integrina  $\alpha4\beta7$ , en la superficie de los linfocitos T<sup>9</sup>.

## 4.3 Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)

Las interacciones inmunológicas en este nivel se llevan a cabo inicialmente en el sitio inductor de la respuesta inmunitaria intestinal constituido por placas de Peyer (PP), folículos linfoides aislados y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM)<sup>3</sup>. Secundariamente se crea el sitio efector de la respuesta inmunitaria integrado por poblaciones de linfocitos intraepiteliales (IEL) y los linfocitos de la lámina propia (LPL)<sup>6,7</sup>.

Las PP están formadas por agregados linfoides situados en la cara anti-mesentérica de la mucosa intestinal; en el humano existen en mayor número en el área del íleon. Difieren del resto del tejido linfoide secundario en que no poseen vasos linfáticos aferentes en su estructura<sup>8</sup>. En ésta estructura, las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos luminales, carecen de recubrimiento de glicocáliz y en su superficie luminal presentan pliegues cortos, irregulares y desorganizados. Por debajo de la monocapa de células, se encuentra una región difusa denominada cúpula subepitelial o región del domo, integrada por células dendríticas y algunos macrófagos.<sup>6-8</sup>

Los folículos linfoides aislados, son estructuras de tejido linfoide que se encuentran en mayor cantidad en intestino delgado y en menor en el colon; son estructuras que contienen predominantemente linfocitos B en un 70% y linfocitos T en un 30%, que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo en estructuras que contienen un centro germinal.<sup>8</sup>

Los ganglios linfáticos mesentéricos se localizan en el mesenterio del intestino y se dividen, estructuralmente, en tres regiones con distinta composición celular: corteza, paracorteza y médula. La corteza contiene folículos primarios y secundarios ricos en linfocitos B y células dendríticas interdigitantes y foliculares.<sup>8</sup> Por el contrario, la paracorteza se caracteriza por una elevada proporción de linfocitos T<sup>10</sup>. La médula, región más interna del ganglio, está integrada por linfocitos B, linfocitos T y células plasmáticas<sup>8</sup>.

En la corteza, las células dendríticas residentes internalizan y procesan los antígenos que llegan a través de la linfa. Las células dendríticas maduras migran hacia la paracorteza donde presentan el antígeno a los linfocitos T cooperadores (Th) o T citotóxicos (Tc) vírgenes y de esta forma se originan células T especializadas y se inicia la respuesta inmunitaria adaptativa<sup>10</sup>. Mientras que los linfocitos efectores abandonan los ganglios linfáticos y migran hacia los tejidos no linfoides; algunos permanecen en el ganglio linfático como células de memoria o migran hacia los centros germinales de los folículos para promover el proceso final de diferenciación de los linfocitos B<sup>9</sup>.

Los IEL residen en los espacios intraepiteliales del intestino, bajo las uniones estrechas y por encima de la membrana basal. Aunque los IEL integran una población muy heterogénea, la mayor parte presenta un fenotipo supresor o citotóxico atípico y específico del compartimento de las mucosas, características que constituyen un fenotipo activado de células efectoras / y de memoria con capacidad inmunorreguladora, y que proporcionan una respuesta inmediata y muy efectiva sobre células epiteliales infectadas.<sup>10</sup>

Por otra parte, la lámina propia, comprendida entre el epitelio y la *muscularis* de la mucosa, contiene células plasmáticas maduras productoras de IgA, linfocitos T y otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Estas poblaciones se encuentran en estado continuo de migración, diferenciación y renovación. Las dos poblaciones efectoras a nivel de mucosas, IEL y LPL, se hallan bajo la influencia de bacterias comensales presentes en el intestino, las cuales contribuyen al desarrollo de la

función inmunitaria. La flora bacteriana intestinal promueve la expansión y adquisición de la actividad citotóxica de los linfocitos del epitelio intestinal y desarrolla un papel importante en la inducción y mantenimiento de la tolerancia oral frente a antígenos presentes en la dieta, mediante la potenciación de la producción de IgA por parte de los LPL.<sup>11</sup>

Los microorganismos comensales interactúan también con células presentadoras de antígeno (APC) del epitelio y lámina propia, promoviendo una interacción diferente en los linfocitos Th, induciendo así, la activación de células reguladoras y con ello se desarrolla la tolerancia ante estos microorganismos.<sup>12</sup>

#### **4.4 Quimiocinas y sus receptores.**

Las quimiocinas son un grupo de polipeptidos relacionados estructuralmente, que contienen entre 70 y 90 amino ácidos.<sup>13-15</sup> Tanto las quimiocinas como sus receptores, que se encuentran acoplados a proteínas G<sup>16,17</sup>, se clasifican en cuatro familias funcionales y estructurales, C, CC, CXC y CX3C. Esta clasificación se basa en el patrón de los residuos de cisteína de los ligandos. En donde C representa un residuo de cisteína y X/X3 representan de uno o tres residuos de amino ácidos no cisteínicos<sup>17</sup>. Los receptores de quimiocinas son todas moléculas ancladas a la membrana celular, compuestas por siete dominios transmembranales (7TM), acoplados a proteínas G principalmente heterodiméricas.<sup>18,19</sup>

En algunos casos, la interacción receptor-quimiocina es exclusiva de un solo ligando, para otros receptores de quimiocinas, su activación puede ser mediada por más de una quimiocina y de la misma manera, algunas quimiocinas pueden interactuar con más de un receptor<sup>20</sup>. El gen para el receptor de quimiocinas CCR9 se encuentra mapeado en la región F1-F4 del cromosoma murino 9 y su ortólogo humano en el cromosoma 3p21 – 3p22, al igual que todos los receptores de la familia CC<sup>20-22</sup>.

Las quimiocinas se encuentran presentes en el organismo tanto en condiciones homeostáticas como de inflamación; siendo importantes, en la regulación de enfermedades inflamatorias crónicas, como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)<sup>16</sup>.

##### **4.4.1 Clasificación de las quimiocinas.**

La expresión de las quimiocinas, especialmente durante la inflamación, se regula mediante transcripción inducible (generalmente por activación de receptores de citocinas), traducción, secreción y recambio. En el caso de las quimiocinas CXCL16 y CX3CL1, que son expresadas como componentes transmembranales y que son escindidas por metaloproteasas<sup>18</sup>. Estas quimiocinas también funcionan como moléculas de adhesión<sup>19</sup>.

La principal función que se ha descrito de las quimiocinas es conferida por su capacidad quimioatrayente. Inicialmente, participan en el proceso de arresto celular durante la extravasación y se encargan de mediar la agregación y la activación de las integrinas, lo cual da lugar a interacciones de alta afinidad y avidéz con sus ligandos expresados por el endotelio; sin embargo, regulan procesos como: angiogénesis, diferenciación Th1/Th2, organogénesis, sobrevivencia celular, apoptosis, metástasis y recientemente se descrito su función antimicrobiana<sup>18</sup>.

Las quimiocinas se clasifican tradicionalmente en cuatro familias, de acuerdo al patrón de residuos de cisteína que se encuentran presentes en su estructura:

#### ***Familia CXC***

La familia CXC contiene un subgrupo de quimiocinas que tienen tres aminoácidos entre el N-terminal y la primera cisteína (Glu-Leu-Arg) conocidas como ELR-quimiocinas. Se sugiere que esta secuencia es necesaria para atracción de neutrófilos y esencial para la activación de los receptores CXCR1 (solo en humano) y CXCR2. Otra propiedad importante que se les confiere, es la angiogénesis, mientras que las quimiocinas no-ELR, poseen la capacidad de quimioatraer monocitos y linfocitos y además son inhibitoras de la angiogénesis<sup>9</sup>.

#### ***Familia CC***

En este grupo se agrupan la mayoría de las quimiocinas conocidas hasta la fecha. Algunas de sus funciones son la quimiotaxis de monocitos, linfocitos T, eosinófilos, basófilos, células dendríticas, linfocitos B, timocitos, progenitores linfoides y megacariocíticos<sup>9</sup>. Las células que secretan estas quimiocinas son monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, células NK, mastocitos, linfocitos T, basófilos, plaquetas y células no inmunes como fibroblastos, células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales. Sus efectos biológicos son muy diversos: inducen activación del endotelio, son quimiotácticas, regulan la liberación de gránulos y enzimas, modulan la apoptosis, controlan crecimiento celular hematopoyético, etc. A quimiocinas como CCL11, CCL16 y CCL21 se les ha atribuido también un papel en la angiogénesis<sup>13</sup>.

#### ***Familias C y CX3C***

Son producidas por linfocitos T CD8, timocitos, mastocitos y células NK. Actúan principalmente sobre células NK y linfocitos T, induciendo su activación y quimiotaxis. La familia representada por fractalcina, tiene varias regiones, un dominio tipo quimiocina, una región tipo mucina y que le permite expresarse transmembranalmente con repeticiones serina-treonina y muchos polisacáridos laterales<sup>14</sup>.

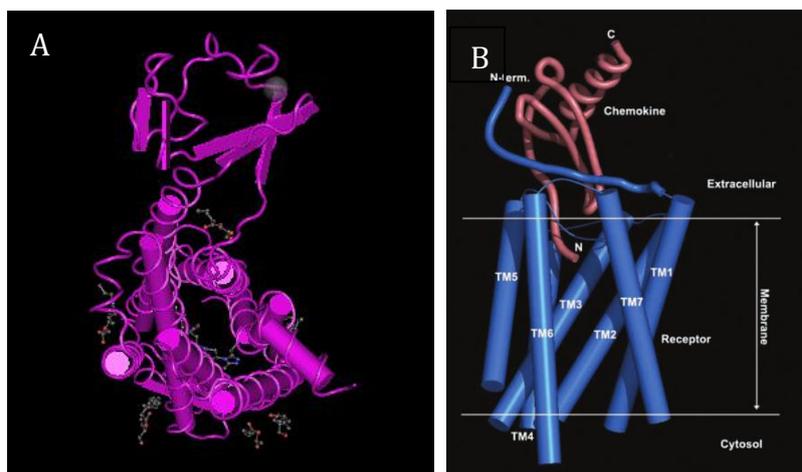
## 4.5 Receptor de quimiocinas CCR9.

CCR9 es un receptor de quimiocinas perteneciente a la familia de receptores CC que se identificó en estudios analizando las moléculas participantes en el desarrollo de los linfocitos T en el timo<sup>20</sup>. Originalmente, fue llamado GPR-9-6 y su expresión se encontró restringida únicamente a timo. Su ligando único, la quimiocina TECK (CCL25), es expresada por las células dendríticas en la médula del timo, por las células estromales y por las células epiteliales y dendríticas en intestino delgado, por lo cual, a este receptor, también se le atribuye una función muy importante en el reclutamiento homeostático de células hacia intestino delgado<sup>21</sup>. Las subpoblaciones que responden en quimiotaxis mediante el estímulo con CCL25 son: timocitos CD4+ CD8+ dobles positivos(DP) y los timocitos CD4+ y CD8+ simples positivos (SP); los timocitos dobles negativos(DN) presentan una respuesta de migración en menor grado<sup>22, 23</sup>.

CCR9 es una proteína de 369 aminoácidos que por su homología estructural, se ubica filogenéticamente en la familia de los receptores CCR5 y CCR6<sup>24</sup>. Así mismo, se relaciona la expresión de CCR9 con su ligando CCL25, en linfocitos T maduros e inmaduros, por lo que participa de manera importante a CCR9 en el desarrollo de células T en timo<sup>25</sup>.

CCR9 se encuentra codificado por un gen único en el cromosoma 3<sup>23</sup>. Las modificaciones post-traduccionales que este como otros receptores de quimiocina puede tener, se realizan en los residuos ácidos cercanos al extremo N-terminal<sup>25</sup>. En este receptor se ha identificado un sitio blanco de N-glicosilación en la región N-terminal (Asn32). Asimismo, existen cisteínas conservadas en los loops intracelulares 1 (Cys119) y 2 (Cys198) (Figura 1). Además, contiene un residuo de cisteína en el extremo carboxilo terminal que puede ser palmitoinilado<sup>24</sup>.

Se conocen dos isoformas productos de *splicing* del receptor CCR9. La isoforma CCR9A contiene 12 aminoácidos adicionales en su extremo amino terminal en comparación a CCR9B. Otro aspecto importante de ambos receptores, es que existe una diferencia funcional entre ambas proteínas, la cual radica en la diferencia de concentración del ligando necesario para activar a CCR9A, la cual es menor e la requerida por CCR9B para activarse, lo cual proporciona un rango amplio de concentraciones sobre las cuales el receptor puede distinguir un aumento en la concentración de ligando. En linfocitos, la expresión de ambas isoformas se mantiene en una proporción de 10:1 (CCR9A :B)<sup>22</sup>. Para comprender los mecanismos de regulación del receptor, se desarrolló un ratón deficiente de CCR9, el cual es compatible con la vida, es fértil y no muestra anomalías morfológicas aparentes<sup>21</sup>.



**Figura 1. Estructura del receptor de quimiocina CCR5.**

A) Estructura del receptor de quimiocinas CCR5. Se muestra la estructura proteica del receptor CCR5, perteneciente a la misma familia del receptor CCR9, con la finalidad de ejemplificar la estructura del receptor CCR9 ya que su estructura aún no se ha dilucidado. B) Modelo hipotético de la interacción de una quimiocina (rosa) con su receptor (azul). El modelo ejemplifica dos interacciones hipotéticas: la interacción del dominio N terminal del ligando con el receptor y la interacción del dominio central del ligando con la región extracelular del receptor.

Las quimiocinas y sus receptores, principalmente aquellas agrupadas en la familia CC, presentan un alto grado de promiscuidad, lo que implica que una quimiocina pueda ser reconocida por más de un receptor y a su vez un mismo receptor puede unirse a varias quimiocinas. En función de lo anterior, cuando se estudia a los ratones *knock out* (KO) para algún receptor de quimiocinas, se suelen presentar efectos compensatorios en la actividad del receptor ausentes. En dichos casos, se observa que la respuesta se mantiene o disminuye por el efecto de la promiscuidad molecular. En el caso específico de los ratones KO para CCR9, no se han encontrado diferencias en la expresión de otros receptores de quimiocinas como eventos compensatorios<sup>19</sup>. A pesar que se ha demostrado una clara e importante participación de CCR9 en el desarrollo de los linfocitos T en el timo, en el ratón deficiente de CCR9 no hay diferencias número en las subpoblaciones de timocitos a pesar de que CCR9 es un receptor que se expresa en el cambio de dobles negativos a dobles positivos. Recientemente se ha buscado explicar este aspecto en la cooperación entre este receptor y el receptor CCR7, el cual pudiera compensar la ausencia de CCR9<sup>21-23,25</sup>.

En los ratones KO para CCR9, no se observaron diferencias importantes en el número de linfocitos  $T_{\alpha\beta}$  en periferia, dichos linfocitos son capaces de responder previa activación vía TCR. El porcentaje de linfocitos  $T_{\gamma\delta}$  en periferia es dos o tres veces mayor en el ratón CCR9 KO que en el ratón CCR9 +/+. En mucosa intestinal, existe una disminución en 2 veces del número de linfocitos T intraepiteliales del ratón CCR9 KO y el número de linfocitos  $T_{\gamma\delta}$  es 5 veces menos en el genotipo CCR9 KO. La ausencia de CCR9, limita temporalmente el desarrollo de linfocitos T durante el proceso de formación del embrión; sin embargo, no es indispensable para este efecto y en el desarrollo embrionario, las diferencias

en celularidad son compensados en el día 20 de gestación, lo que se repite para los linfocitos B en médula ósea, lo que se manifiesta en la disminución de células pre-proB ante la ausencia del receptor <sup>25</sup>.

La migración de las poblaciones celulares de linfocitos T hacia el intestino delgado está dirigida por la expresión específica en las células del epitelio de la quimiocina CCL25/TECK, único ligando del receptor CCR9<sup>27-30</sup>. De esta forma, virtualmente todos los linfocitos residentes de la mucosa del intestino delgado expresan el receptor CCR9<sup>29</sup>. En el caso del colon, se tienen antecedentes de que el 5% de las células plasmáticas y 15% de los linfocitos T expresan el receptor CCR9+ (Ver tabla 2); Sin embargo, hasta el momento, no se ha reportado la expresión de CCL25 /TECK por el epitelio del colon, únicamente en el feto murino quince días después de la concepción <sup>29</sup>(Ver tabla 1). En este tejido la migración de los linfocitos, esta mediada por otros receptores de quimiocinas como CCR6, CCR10 y CXCR3<sup>29,30</sup>.

**Tabla 1: Expresión del ligando de CCR9, CCL25 en diferentes órganos**

Expresión CCL25
<p><b>Intestino delgado:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Células Epiteliales(25)               <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Que se encuentran en el límite con la vili intestinal (31)</li> <li>b. Se expresan sobre todo en jejunio e ileum (29)</li> </ol> </li> <li>2) Células Endoteliales(31)</li> <li>3) Mayoría de IEL y LPL en humanos (31)</li> </ol>
<p><b>Timo:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Células epiteliales (corteza y médula) (25)</li> </ol>
<p><b>Células dendríticas:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) De medula ósea (25), predominantemente Cd11b- (51)</li> </ol>
<p><b>Intestino grueso:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) De fetos de 15d después de la concepción(25)</li> <li>2) Expresión baja en colón (31)</li> </ol>
<p><b>Otros</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Monocitos (25)</li> <li>2) Células epiteliales MHC clase II en feto (25)</li> </ol>

**Tabla 2: Expresión del receptor de quimiocinas CCR9, en diferentes órganos**

Expresión de CCR9
<b>Intestino delgado</b>
1) Virtualmente en todos los linfocitos T. (54)
2) En humanos todas la IEL expresan CCR9(23)
3) Linfocitos B (31)
<b>Timo:</b>
1) Timocitos doble positivo y simple positivos. (50)
<b>Intestino grueso:</b>
1) Sólo un pequeño subgrupo de linfocitos T en colón (29)
<b>Otros:</b>
1) En humanos con CD, se observa incremento de linfocitos T CCR9+ en sangre periférica (31)
2) Cél. Plasmáticas secretoras de IgA en MLN, Bazo y PP(54)
3) Subgrupo de Linfocitos T periféricos humanos lo expresan (31)
4) Todas la células CD8 vírgenes murinas (31)
5) Grupo de Linfocitos CD8+ y CD4+ de memoria( $\alpha 4\beta 7$ ) (6)

#### 4.6 Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), es una enfermedad recurrente, crónica mediada por el sistema inmune<sup>32</sup>. La EC y CU son las formas representativas de la EII. La EC se caracteriza por lesiones alternadas con inflamación transmural y epitelio sano a lo largo del tubo digestivo, mientras que la CU se extiende de manera continua cerca del recto y afecta a las capas mucosa y submucosa del intestino<sup>33</sup>. La etiología de ninguna de las dos formas es clara, y a pesar de que estas dos condiciones patológicas difieren morfológicamente, estudios recientes sugieren que la combinación de factores genéticos con la activación inapropiada y persistente de la respuesta inmune de mucosas, mediada por la flora intraluminal contribuyen a la iniciación y cronicidad de la patología<sup>32-34</sup>.

La CU, normalmente se presenta como un ataque agudo recurrente de diarrea mucosa con presencia de sangre, que puede persistir por un tiempo prolongado que va de semanas a meses. La incidencia de la enfermedad es de 0.01% en los países desarrollados y se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas<sup>35,36</sup>. En México no se conocen las cifras reales de la incidencia de la enfermedad debido principalmente al diagnóstico inadecuado de la misma.

La administración vía oral de Dextran Sulfato de Sodio (DSS), causa en los roedores una infiltración masiva de macrófagos y granulocitos, presencia de depósitos de colágeno, distorsión de la arquitectura glandular, ulceración en el colón, niveles altos de proteínas de fase aguda y producción local de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-20 e IL-17<sup>37-39</sup>. Lo anterior es

similar a lo observado en humanos en la fase aguda de la CU, por lo que es ampliamente utilizado como modelo animal de esta patogenia, particularmente en la fase de exacerbación<sup>39</sup>. Se ha descrito que los ratones C57BL/6 expuestos a consumo de DSS por cinco días, desarrollan inflamación aguda durante su administración, la cual progresivamente se transforma en inflamación crónica después de su remoción. Para estudiar la enfermedad en su etapa crónica, los ratones son sometidos entre 3 a 5 ciclos de DSS semanales, seguidos de un periodo de descanso de 1 o 2 semanas, en el que únicamente se administra agua a libre demanda<sup>38,39</sup>.

El mecanismo mediante el cual el DSS produce CU, aún no es claro. Se propone, que el agente químico es directamente tóxico para las células epiteliales evitando que estas entren a las fases G2 y M del ciclo celular<sup>37</sup> y afecta la integridad de la barrera mucosa<sup>39</sup>, generando alteraciones en la permeabilidad de la misma lo que permite que productos del metabolismo secundario de la flora normal luminal (LPS, endotoxinas, entre otros) permeen en la mucosa colonica, generando el proceso inflamatorio observado en el modelo<sup>38</sup>.

Se tiene información obtenida a partir de diversos estudios en modelos animales y en pacientes humanos con EII que involucran a linfocitos CCR9+ en el desarrollo de la patología en el intestino delgado<sup>34-36,42</sup>. Sin embargo, la participación de esta misma población en el proceso inflamatorio en el colon, aún no es clara. En trabajos anteriores se describe que este receptor en el intestino grueso no participa en el proceso inflamatorio local<sup>29,31,34,35,40,41</sup>.

Múltiples estudios también han demostrado, que tanto en condiciones homeostáticas como de inflamación, se induce la activación de linfocitos CCR9+ Foxp3+ en las placas de peyer<sup>43</sup> y en los nódulos mesentéricos del ratón, que migran hacia la lámina propia del intestino delgado<sup>46,48</sup>. Dicho fenotipo también es promovido por la producción de ácido retinoico por las células presentadoras de antígeno en el nódulo<sup>45</sup>.

Debido a qué en los primeros estudios sobre la participación de las células CCR9+ en la inmunidad de mucosas se descartó la expresión de CCL25 por el epitelio del colon, y dado a qué la evidencia actual muestra la expresión de esta quimiocina solo a nivel de RNA mensajero, el papel de estas células en la respuesta inmune asociada a la mucosa colonica no ha sido explorado de manera extensa. Recientemente se llevó a cabo un estudio en el cual se demuestra que la interacción CCL25-CCR9 regula la respuesta inflamatoria en el intestino grueso en un modelo agudo de colitis inducida por DSS. En este modelo se observa la regulación del proceso inflamatorio mediante el balance de distintos sub tipos de células dendríticas (CD), entre las cuales destacan, las células dendríticas plasmacitoides (pCD), que se dividen en dos subtipos de acuerdo a su expresión de CCR9. Las pCD CCR9+/+ tienen un fenotipo tolerigénico mientras que las pCD CCR9-/- presentan un fenotipo pro inflamatorio, demostrando así el papel de CCR9-CCL25 en la regulación del

proceso inflamatorio del colon<sup>44</sup>. Por otro lado se demostró que en los ratones TNFΔARE, la ausencia de CCR9 ocasiona ileitis exacerbada en comparación con lo observado en los ratones CCR9+/+, cuyo proceso inflamatorio es menor. La administración de un anticuerpo monoclonal contra CCR9 en los ratones TNFΔARE también exagera el proceso inflamatorio. Este estudio también permitió evidenciar el papel de los linfocitos T8Reg y T8efectores en la inflamación del intestino delgado, encontrándose que en ausencia de la población de linfocitos CD8+ CD44+ (efectoras) se disminuye ileitis. Y que en contraparte, la población CD8+ CD103+ inhibe la producción de linfocitos CD4+ *in vitro* e *in vivo* disminuyendo así la severidad de la ileitis<sup>51</sup>.

Se demostró también que la población CD8+ CD103+ expresa CCR9 en mayor proporción que los linfocitos CD8+ CD44+, sugiriendo así el papel de la población CD8+CCR9+ en la regulación del proceso inflamatorio en la mucosa intestinal<sup>50,51,62</sup>.

Existe evidencia de que la población de linfocitos T CCR9+ pudiese contribuir a la resolución de la respuesta inflamatoria observada en un modelo de colitis experimental. Datos preliminares obtenidos en el laboratorio, en estudio previo con un modelo murino amebiano en ratones CCR9 (-/-), demuestran que el receptor CCR9+, participa en la resolución de la inflamación; siendo específicamente la población linfocitaria CD8 + CCR9+ identificada como un participante importante en el desarrollo de colitis<sup>52</sup>. Aunado a los datos encontrados en nuestro laboratorio, en un estudio reciente en cáncer colorectal, se determinó que la población linfocitaria CD8+CD25+FOXP3+ (T8Reg) presenta propiedades inmunosupresivas *in vitro*, contribuyendo así en el escape del tumor a la respuesta inmune y a la progresión de la enfermedad. Así mismo, se observó que esta población es capaz de suprimir la proliferación de células T CD4+CD25- y la producción de citocinas TH1 *ex vivo*<sup>51,52</sup>.

La compañía *GlaxoSmithKline(GSK)* y la compañía *ChemoCentryxInc.*, se encuentran desarrollando un antagonista de CCR9 como tratamiento para la EC, llamado Traficet-EN™ (CCX282-B). Este se encuentra en fase clínica III, y ha demostrado que el bloqueo del receptor CCR9+ mejora el pronóstico y mantiene la remisión del proceso inflamatorio intestinal. Esto contrario a todos los antecedentes mostrados y a datos preliminares del presente estudio<sup>53</sup>.

## **V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El primer problema a estudiar es la presencia del receptor de quimiocinas CCR9 en el epitelio del colón. Estudios previos han demostrado que la ausencia del receptor de quimiocinas CCR9 incrementa la severidad de la inflamación intestinal, por lo que se infiere el papel regulador de este receptor; Sin embargo, aun no se conoce qué población linfocitaria que expresa el receptor, ejerce la función reguladora en el epitelio del colon.

## **VI. HIPOTESIS**

Los linfocitos CD8+ CCR9+FOXP3+, contribuyen a la regulación del proceso inflamatorio crónico en un modelo murino de colitis inducida por DSS.

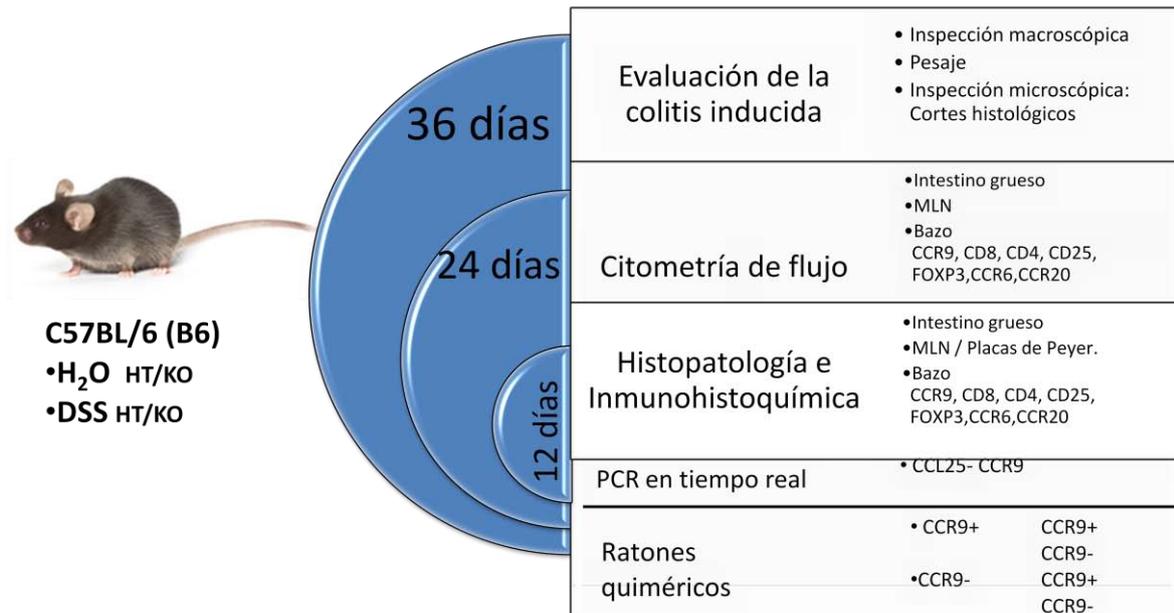
## **VII. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la participación de la población de linfocitos CD8+ CCR9+FOXP3+ en la regulación del proceso inflamatorio, en el modelo murino de colitis inducida por dextran sulfato de sodio.

## **VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar un modelo de colitis murina inducida por dextran sulfato de sodio, en ratones CCR9 (-/-) y CCR9 (+/-)
2. Evidenciar la presencia de la población CD8+ CCR 9 +FOXP3+ en células IEL y LPL, mediante citometria de flujo.
3. Realizar análisis histopatológico e inmunohistoquímico en intestino grueso, para evidenciar la presencia de la población celular en estudio.
4. Evaluar la expresión de CCL25-CCR9 mediante PCR en tiempo real en intestino grueso.

## **IX. MATERIALES Y MÉTODOS**



**Figura 2: Esquema descriptivo de la metodología propuesta.**

Se observa de manera progresiva la metodología seguida para la realización del presente trabajo de investigación durante la inducción del modelo de CU por DSS durante el ciclo 1 (12 días), ciclo 2(24 días) y ciclo 3(36 días).

## 9.1 Ratones de experimentación.

Ratones hembras libres de patógenos, del fondo genético C57BL/6 (B6) de 9 a 11 semanas de edad, tanto CCR9 (+/-) como CCR9 KO, que se obtuvieron y mantuvieron en las instalaciones del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas [IIB], hasta su sacrificio. En cada experimento, los ratones se distribuyeron en dos grupos de 6 a 8 individuos cada uno: CCR9 (+/-) y CCR9 KO; además, del grupo de ratones control, al cual únicamente se le administró agua *ad libitum* siendo mantenido bajo las mismas condiciones ambientales que los grupos de DSS, para asegurar que los resultados no se encuentran bajo alguna influencia ambiental.

## 9.2 Tipificación ratones de experimentación

### 9.2.1 Obtención de ADN de ratón CCR9 HT y CCR9 KO

Se obtuvieron las colas de ratones de 4 semanas de edad y se colocaron en un tubo *ependorf*, posteriormente se agregaron 500  $\mu$ L de amortiguador de lisis con proteinasa K (Invitrogen) y se agitó la mezcla. Se digirieron a 55°C en un baño de agua durante 2 horas o toda la noche dependiendo del grosor de la cola. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos para separar huesos y pelo. Al sobrenadante se le agregaron 500  $\mu$ L de fenol:cloroformo (1:1) con agitación. Se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 13,000

rpm. Se separó la fase acuosa y se agitó suavemente. Se dejó incubar durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  y después se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm. Se dejó evaporar el etanol y el DNA se re suspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril. Se disolvió el DNA calentando a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis por PCR.

### **9.2.2 Análisis de genotipo CCR9 KO por PCR**

Para el análisis del genotipo de los ratones en estudio, se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de ADN extraído a partir de la cola. Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción para la Taq Polimerasa sin  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 de mezcla de nucleótidos, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 1  $\mu\text{L}$  de primer específico para amplificar sentido, 1  $\mu\text{L}$  de primer antisentido, 1  $\mu\text{L}$  de primer central, 0.1  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerasa (Invitrogen) y agua libre de RNAsas y DNAsas para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Las muestras se amplificaron en un termociclador (*MyCycler BioRad*) a las condiciones especificadas para los oligonucleótidos (ver anexo I). Se corrieron 15  $\mu\text{L}$  de las muestras con 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X para comparar el tamaño del producto con el marcado de peso molecular 100 - 2052 pb (Invitrogen).

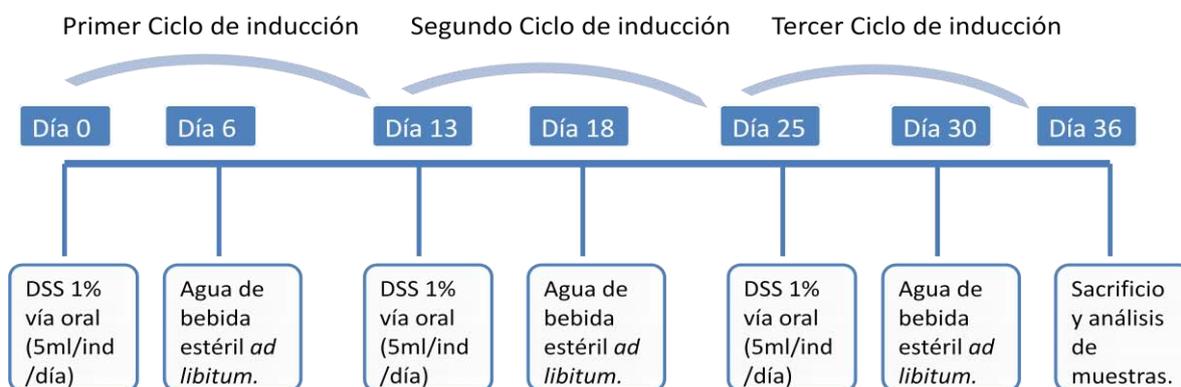
### **9.3 Reactivos y anticuerpos**

Dextran Sulfato de Sódio (DSS), con peso molecular 36,000 a 50,000 procedente del laboratorio USB Corporation.

Los anticuerpos utilizados fueron anti CCR9, CD8, CD4, CD25, FoxP3 en ratón, marcados como FITC-, PE-, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7-, APC (Ver Anexo de reactivos)

### **9.4 Inducción y evaluación del proceso inflamatorio intestinal.**

La inducción de colitis, en ambos grupos, se realizó mediante la administración oral de 5mL de dextran sulfato de sodio al 1% (p/v) por individuo, por día, en un lapso de cinco días continuos, seguidos de la administración de agua potable filtrada durante siete días más (fase de recuperación), por tres ciclos consecutivos (Ver figura 3)<sup>30</sup>. Los ratones de ambos grupos fueron alimentados con alimento *Teklad Global* para roedores, pesados diariamente y evaluados en la consistencia de las heces y la presencia de sangre de acuerdo a lo reportado en protocolos de inducción de colitis en modelos murinos<sup>31</sup>.



**Figura 3. Descripción del modelo murino de inducción de colitis utilizando DSS al 1%.** Se observa la administración de tres ciclos de DSS al 1% vía oral, en los días 0, 13 y 25 del modelo. Al finalizar los cinco días de administración de DSS se administró agua ad libitum en los días 6, 18 y 30. La duración de cada ciclo de inducción de CU es de 12 días. Para la generación del proceso inflamatorio crónico se administran tres ciclos de 12 días cada uno, teniendo así tiempo total de inducción de la CU de 36 días.

Para la evaluación del grado de inflamación en el proceso de CU y para evaluar su evolución, los ratones de cada grupo se sacrificaron de manera escalonada para realizar análisis de histopatología e inmunohistoquímica, a los días 12(fin del primer ciclo), 24(fin del segundo ciclo) y 36(fin del tercer ciclo) a partir del inicio de la administración de DSS. La inflamación se determinó mediante estudios inmunohistológicos y la búsqueda orientada a infiltrado de macrófagos y granulocitos y la presencia de moco, mediante las tinciones de Eosina-hematoxilina (HE) y Ácido Peryodico de Schiff (PAS) respectivamente. Mediante estas tinciones, se otorgó una calificación a la inflamación observada que en este caso se reportó como “Si” o “No”. El grado de la inflamación se calculó asignándole una calificación a la severidad de la inflamación (0-3), la extensión de la inflamación (0-3) y el daño en las criptas (0-4). La suma de las calificaciones, se multiplicó por el porcentaje tisular involucrado al cual se le asignó una calificación de 0 -4. Los valores mínimos y máximos obtenidos van de 0 a 40 (Ver tabla 3.)<sup>42</sup>

**Tabla 3: Calificación histológica de colitis.**

Se muestra la escala de evaluación para el grado de daño histológico en el proceso inflamatorio de CU.

Parámetro	Calificación	Descripción
Severidad de la inflamación	0	Ninguna
	1	Poca
	2	Moderada
	3	Severa
Extensión de la	0	Ninguna
	1	Mucosa

<b>inflamación</b>	2	Mucosa y Submucosa
	3	Transmural
<b>Daño en las criptas</b>	0	Ninguno
	1	1/3 dañado
	2	2/3 dañados
	3	Pérdida de criptas, epitelio presente
<b>Porcentaje del colon involucrado</b>	4	Pérdida de criptas y epitelio
	0	0
	1	1-25
	2	26-50
	3	51-75
	4	76-100

Una vez estandarizado el modelo, se hicieron nuevos grupos de ratones a los que se les indujo colitis con el procedimiento antes descrito, sacrificándolos en diferentes tiempos para la medición de poblaciones celulares infiltrantes (inmunohistoquímica y citometría de flujo), evaluación de la funcionalidad CCR9 respecto a CCL25 (quimiotaxis) y medición de citocinas a nivel local (TR-PCR).

## 9.5 Recolección de muestras.

Al término de cada ciclo de DSS, los ratones fueron anestesiados con una mezcla 1:2 xilacina: ketamina, y sacrificados mediante punción cardiaca que se aprovecha para la obtención de sangre, de donde se extrae el suero para medición de la concentración de marcadores a nivel sistémico. Además, se practica una incisión media abdominal y se extrae el intestino grueso que es segmentado en cinco porciones, el ciego, el colon ascendente, colon transverso, el colon descendente y recto ; así mismo, se obtienen muestras de bazo y ganglios mesentéricos.

Los tejidos obtenidos pueden ser utilizados en fresco, incluidos en parafina o congelados mediante Tissue-Tek O.C.T, según al estudio al que estén destinados. Los tejidos congelados se almacenan a -70 C o preferentemente en nitrógeno líquido.

## 9.6 Obtención de células para su análisis

### 9.6.1 Obtención de IELs y LPLs

Para la extracción de las células IEL y LPL, se extrajo el intestino completo de ciego al recto de cada ratón y se colocó en una caja de cultivo con 5 ml de CMF frío. Se cortó longitudinalmente y se eliminaron totalmente las heces, utilizando PBS 1X frío. Se

transfirieron las porciones del intestino a un tubo *falcon* de 50 ml con 20 ml de CMF frío y se lavó el tejido agitando por inversión.

Para la extracción de los IEL, se agregó de 15 a 20ml de la solución de CMF, EDTA y DTT y se agitó el tejido a 37 C por 30 min, este paso se repitió de dos a tres veces. Una vez recolectado el sobrenadante, este se colocó en hielo para ayudar a la precipitación del moco intestinal. Una vez precipitado el moco, la suspensión de células se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en 4ml de CMF.

Una vez extraídos los IEL, se procede a la extracción de los LPL. Para ello se utilizó el tejido sobrante en la extracción de IEL, el cual se lavó con 10mL de RPMI sin colagensa con 5% de FBS, se incubó por 10 minutos para eliminar EDTA. Se eliminó el sobrenadante y al tejido se le colocó 20 ml de RPMI suplementado con 10% de SFB con colagenasa. El tejido se incubó en agitación a 37 C por 45 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se centrifugó a 1500rpm por 5min. El *pellet* celular obtenido se resuspendió en 4 ml de CMF.

### **9.6.2 Obtención de linfocitos de bazo y ganglio linfático mesentérico (MLN)**

El bazo y el MLN, fueron macerados por separado mediante un embolo y con adición de la solución *buffer* CMF. El macerado de ambos órganos, fue recolectado en un tubo *falcon* y centrifugado a 1500 rpm durante 5 min.

Los linfocitos de MLN únicamente se resuspendieron en un volumen conocido de *buffer* CMF y las células fueron contadas. Los linfocitos de bazo, se separaron de los eritrocitos mediante el proceso de lisis celular, para lo cual el *pellet* resultante de la centrifugación, se resuspendió en *buffer* de lisis y se dejó reposar por 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación a 1500rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en una concentración conocida de CMF y las células fueron contadas.

### **9.6.3 Conteo celular**

El conteo celular se realizó en un hemocitómetro, aplicando una dilución 1:4 de células en azul de tripan (30µl colorante por 10µl de células). Se aplicó la siguiente fórmula para conocer el número de células por mililitro.

$$No. de células = \frac{Células\ contadas \times factor\ de\ dilución \times 10\ 000}{4\ cuadrantes}$$

## 9.7 Análisis de distintas poblaciones celulares por Citometria de Flujo.

Las células obtenidas de MLN, bazo, IEL y LPL, se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo cóncavo. Posteriormente, se centrifugan a 2500 rpm y se resuspendieron en amortiguador para FACS. Se ajustó en cada pozo el número de células a  $1 \times 10^6$  y se centrifugaron a 4,000 rpm a 4°C durante 15 segundos. Se lavaron en 150  $\mu$ L de amortiguador de FACS y se centrifugaron nuevamente a 4,000 rpm y 4°C. Se resuspendieron en 20  $\mu$ L de dilución de Fc *Block BD Pharmingen rat anti mouse* (CD16/CD32); (para bloquear uniones inespecíficas de los anticuerpos a utilizar), se dejó incubar con el bloqueador durante 30 minutos, posteriormente se realizó un lavado con 150  $\mu$ L de amortiguador para FACS. Se resuspendieron en 20  $\mu$ L de dilución de anticuerpos primarios específicos para las moléculas CD4, CD8, CD25, FOXP3, CCR9, CCR6, CCR10y se incubaron a 4°C y en la oscuridad durante 20 minutos. Se centrifugaron a 4°C y 4,000 rpm durante menos de 1 minuto y se lavaron las células con 150 $\mu$ L de amortiguador de FACS. Se centrifugaron de la misma manera por última vez y finalmente se resuspendieron en 150 $\mu$ L de PBS 1X, con 50 $\mu$ L de paraformaldehído al 4%.

Posteriormente se analizaron las muestras en un citómetro de flujo *FACS Calibur* (BD) y utilizando el software *Cell Quest*. Para realizar el análisis de datos se utilizó el software *FlowJo*. Por cada muestra se analizaron 10,000 células y para realizar el análisis se crearon las regiones que contiene a los linfocitos y a la región de granulocitos-monocitos. Los porcentajes obtenidos se relacionaron con los números totales y los datos se reportan como número de células totales.

## 9.8 Reacción en cadena de la polimerasa

### 9.8.1 Extracción de RNA

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

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

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

Se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y de esta dilución se tomaron 2  $\mu\text{L}$  para cuantificar en dilución 1:500 y se congeló el resto. Para cuantificar, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (*Ultraspec Biochrom*) a una longitud de onda de 260 nm, y se obtuvo la relación Abs 280/ 260 para verificar la pureza ya que relaciones cercanas a 2 contienen alto grado de pureza de RNA.

Posteriormente se analizaron las muestras de RNA obtenido, mediante la adición de 2  $\mu\text{L}$  de RNA resuspendido en 8  $\mu\text{L}$  de amortiguador TAE en un gel de agarosa 2% en TAE 1X. La integridad del RNA se verificó en el gel observando que las 3 bandas de RNA correspondientes a los 3 tipos de RNA se encontraban bien definidas.

### **9.8.2 Síntesis de cDNA.**

Para la síntesis de cDNA, se mezclaron los siguientes componentes: 1 $\mu\text{L}$  de cebadores oligo dT (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 5  $\mu\text{g}$  de RNA no degradado, 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dinucleótidos trifosfato dATP, dCTP, dTTP y dGTP (10 mM) y H<sub>2</sub>O libre de RNAsas cbp 12  $\mu\text{L}$  y se calentaron a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar las cadenas de RNA. Posteriormente, se llevaron rápidamente a hielo. Se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador para la enzima 5X (*Promega*). Se mezclaron los componentes y se incubaron 2 minutos a 37°C. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de enzima MMLV- RT (*Promega*). Se mezcló la reacción y se incubó 60 minutos a 37°C. Al finalizar la incubación, se inactivó la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos. Al terminar la inactivación, se almacenó a -20°C hasta su uso en PCR.

### **9.8.3 RT-PCR Semicuantitativa**

Para verificar la expresión de actina en todas las muestras, se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción para la Taq Polimerasa sin MgCl<sub>2</sub>, 0.75  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de primer específico para amplificar sentido, 0.5  $\mu\text{L}$  de primer antisentido, 0.1  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerasa (*Invitrogen*) y agua libre de RNAsas y DNAsas hasta un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Se amplificaron en un termociclador (*MyCycler BioRad*) a las condiciones especificadas para los cebadores (ver anexo I). Se

corrieron 10  $\mu$ L de las muestras con 1  $\mu$ L de amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X para comprobar el tamaño del producto con el marcador de peso molecular 100-2072 pb (*Invitrogen*).

#### 9.8.4 RT-PCR Tiempo Real

Para cuantificar la expresión del RNA mensajero (mRNA), se utilizaron 2  $\mu$ L de cDNA obtenido por muestra y el reactivo SYBR green [Master Mix] (*Applied Biosystems*). Para la reacción, se utilizó el equipo ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems*) con el software correspondiente para hacer el análisis. Se utilizaron placas con cubiertas ópticas (*Applied Biosystems*)

**Tabla 4: Especificaciones para PCR tiempo real**

Reactivo	Para una reacción de 10 ml
<i>SYBR Green (Applied Biosystems)</i>	5
Agua libre de endonucleasas	3.6
Oligonucleotidos 10 $\mu$ M c/u	0.2
cDNA	1

#### 9.9 Análisis estadístico

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

## X. RESULTADOS y DISCUSIÓN

El primer reporte sobre Enfermedad Inflamatoria Granulomatosa Intestinal (EII), fue publicado en 1932, en un artículo titulado "*Regional Ileitis*", los autores de este artículo fueron Burrill B. Crohn, Leon Ginzburg y Gordon D. Oppenheimer<sup>54</sup>. Fue a raíz del investigador principal de este estudio, que se acuñó el epónimo "Crohn" para referirse al padecimiento. Una vez que la enfermedad fue mejor entendida, este se separó en Enfermedad de Crohn (EC) y en Colitis Ulcerativa Crónica Ideopática (CUCI o CU), para aquellos casos en los que el colón se encontraba también implicado<sup>54</sup>.

La EII representa un problema de salud pública importante, ya que afecta la calidad de vida de quienes la padecen, además de que cada vez afecta a individuos más jóvenes. Entre sus factores de riesgo se encuentran los genéticos y los ambientales; sobre este último factor, diversos estudios, demuestran que se observa mayor incidencia en los países más industrializados <sup>55</sup>.

Un estudio realizado en un hospital especializado de la ciudad de México, donde se realizó un cohorte de 20 años, se encontró un aumento estadísticamente significativo de CU en los últimos 10 años del estudio, que comprendió de 1996 a 2006 <sup>56</sup>.

Para realizar el proceso de diagnóstico y evaluación de la EII y específicamente de la CU, que es considerada como una enfermedad recidivante no transmural con afectación exclusiva colónica, es necesario, tomar en cuenta los siguientes signos clínicos, los cuales dependen del lugar de la afectación, pudiendo presentarse diarrea crónica, dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso, datos de obstrucción intestinal y evacuaciones diarreas mucosanguinolentas.

- a) Pérdida de peso: se presenta principalmente en pacientes que presentan actividad de moderada a grave de la enfermedad <sup>57</sup>.
- b) Características de las evacuaciones: las heces son líquidas, sanguinolentas acompañadas de moco, pujo y tenesmo rectal con dolor abdominal en cada movimiento intestinal <sup>57</sup>
- c) Extensión de la enfermedad: esta puede variar en forma importante, 40% de los pacientes adultos tienen afectación exclusivamente rectal, 40% padecen afección del colon izquierdo y 20% presentan pancolitis, la afectación al íleon terminal, se presenta en aproximadamente 15% de las pancolitis y se debe al reflujo del contenido cecal al íleon, por afección de la válvula ileocecal. El apéndice cecal se afecta en 40% de los casos de pancolitis <sup>57</sup>.
- d) Alteración en las criptas: la morfología de las criptas de Lieberkühn se ve afectada en el 80% de los pacientes <sup>57</sup>.
- e) Tamaño y cambios en el colon: los individuos sufren acortamiento del intestino y engrosamiento de las paredes, lo que disminuye la motilidad <sup>58</sup>.

### **10.1 Inducción y evaluación del modelo de colitis inducida por DSS.**

Para el modelo de CU inducido por DSS, en este trabajo, se siguieron los siguientes criterios de evaluación del mismo. Primero se estandarizó el modelo en ratones CCR9 KO y CCR9 HT se realizó la administración de DSS como se describe en el apartado de materiales y métodos en la **figura 3**. Se incluyó en el estudio a grupos de ratones macho y hembra, para determinar las características del modelo con respecto al sexo y determinar

los criterios de inclusión de los ratones en los estudios. De acuerdo a lo reportado por diversos autores, la frecuencia del padecimiento entre hombres y mujeres es 1:1<sup>59</sup>.

### **10.1.1 Peso.**

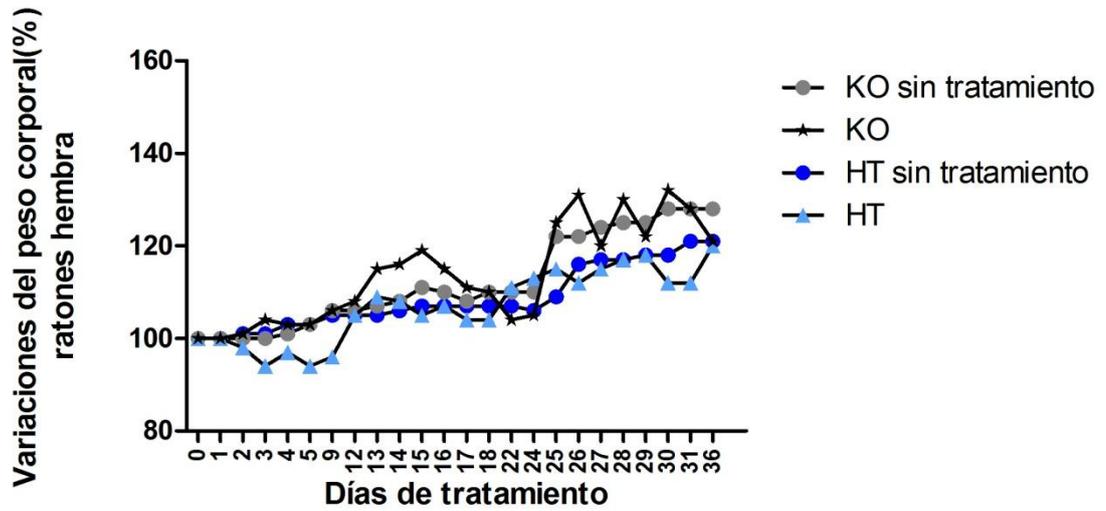
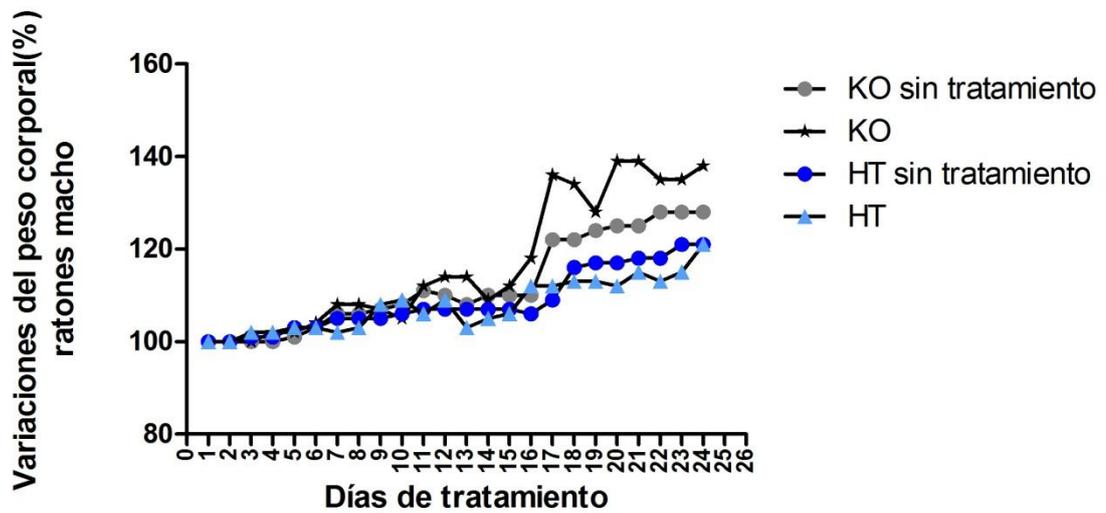
Se administró DSS a dos grupos de ratones, uno conformado por individuos del sexo masculino y otro por individuos del sexo femenino. Una vez administrado el DSS, se evaluó la pérdida de peso entre los individuos comparando a los dos grupos tal como se muestra en la **figura 4**.

No se obtuvieron diferencias significativas en la variación de peso entre ambos sexos **figura 4 A y B**; sin embargo, se observó un comportamiento que si bien no es significativo, permite describir diferencias entre los grupos HT y KO para cada sexo. En el caso de las hembras se observó que tanto el grupo KO como el HT sin tratamiento mantuvieron un aumento de peso constante sin variaciones abruptas. Mientras que las hembras KO aunque aumentaron de peso durante el proceso de inducción de la inflamación, presentaron variaciones repentinas de ganancia y pérdida de peso, sobre todo durante el tercer ciclo de administración de DSS (entre el día 25 y 36), que es el periodo en el que se establece el proceso inflamatorio crónico (**Figura 4A**). En el caso de los machos, al igual que para las hembras, los grupos sin tratamiento mantuvieron un aumento constante de peso y al igual que lo observado en las hembras, en el grupo KO tratado con DSS al 1% se observaron cambios repentinos en el porcentaje de pérdida o ganancia de peso, a diferencia de lo que se observa en el grupo HT (**Figura 4B**).

Al no observarse diferencias significativas en el porcentaje de variación de peso corporal entre los grupos de ratones clasificados de acuerdo a su sexo, se asumió que se pueden utilizar de manera indistinta uno u otro para el modelo de CU inducida por DSS. Esto correlaciona con lo reportado en la incidencia de la CU en humanos, en donde la relación de prevalencia reportada hombre: mujer es 1:1<sup>59</sup>.

Para el presente trabajo se utilizaron únicamente hembras, ya que si bien es cierto que ambos grupos mantuvieron un aumento de peso a lo largo de la administración del DSS, las hembras aumentaron en promedio 20% de su peso corporal, mientras que los machos alcanzaron un porcentaje de aumento de peso superior al 35% con respecto a su peso inicial.

Por otro lado el porcentaje pérdida de peso observado en ambos grupos, no es significativo, debido a que el modelo es un modelo crónico, en donde únicamente se administró DSS al 1%, suficiente para que los individuos presenten una actividad leve a moderada de la enfermedad, en cuyo caso no se presenta pérdida de peso considerable<sup>57</sup>.

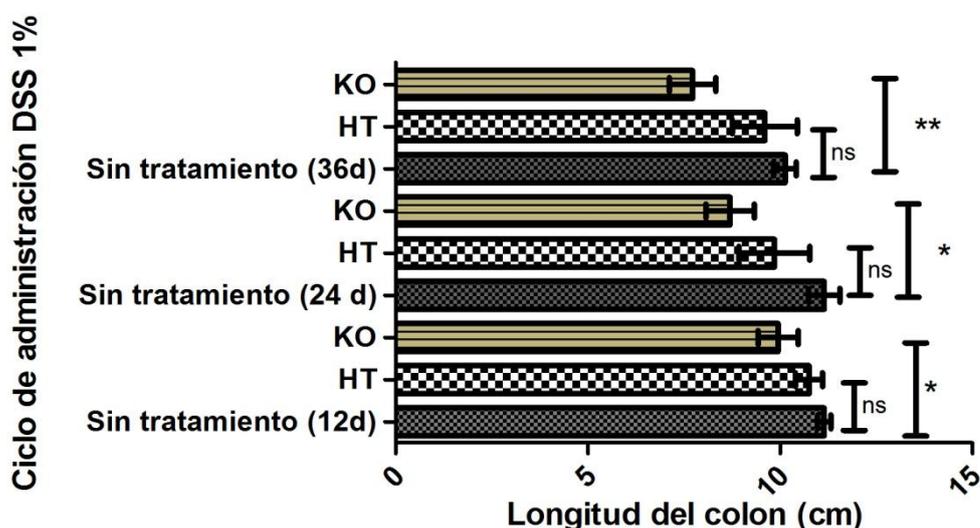
**A****B**

**Figura 4. Variaciones del peso corporal (%).**

A) en ratones hembra tanto KO como HT para CCR9, durante tres ciclos de administración de DSS al 1%. n=16 para el grupo HT y para el grupo KO, n=6 para el grupo control, B) en ratones macho tanto KO como HT para CCR9, durante tres ciclos de administración de DSS al 1%. n=16 para el grupo HT y para el grupo KO, n=6 para el grupo control.

### 10.1.2 Longitud de colon

Otro de los parámetros a evaluar en el modelo de inducción de colitis es la longitud del intestino grueso murino. El colon fue removido a los tiempos indicados (12, 24, 26 días) y se midió del ciego hasta el recto (cm). Se encontró una disminución progresiva de la longitud del colon tanto en los ratones HT, como en los ratones KO, siendo esta disminución significativa solamente para el grupo KO (**figura 5**). Al final del tercer ciclo se observa una disminución de 5% para el grupo HT y de 23% para el grupo KO, con respecto a la longitud del colon del grupo control. Se muestra una imagen representativa de los cambios en la longitud del intestino grueso durante el establecimiento de la CU murina (**figura 6**).



**Figura 5. Variaciones de longitud del colon durante tres ciclos de administración de DSS al 1%.** Se muestran las mediciones para ratones hembras sin tratamiento, administrados con agua de bebida; ratones hembra HT y ratones hembra KO ambos grupos administrados con 1% de DSS durante el mismo periodo de tiempo (12, 24 y 36 días). n=12 para cada grupo. Se sacrifican cuatro ratones por grupo por ciclo. Se observan diferencias significativas para el grupo KO durante los tres ciclos de administración  $P < 0.05$

El acortamiento observado principalmente en el colon de los ratones del grupo KO, es un signo claro del establecimiento del proceso inflamatorio, el cual de acuerdo a los datos mostrados es más evidente en este grupo, sugiriendo que el receptor de quimiocinas CCR9 puede estar implicado en el proceso inflamatorio intestinal. En los humanos que han presentado episodios de CU por varios años, la mucosa se observa atrófica y las células constituyentes pierden su función además de que el colón se acorta y la luz intestinal se vuelve más angosta <sup>59</sup>.



**Figura 6. Variaciones de longitud del colon ratones HT y KO al finalizar la inducción del proceso inflamatorio crónico.**

A) Se muestra la medición para ratones HT hembra al final del tercer ciclo de administración de DSS(10cm) B) Se muestra la medición para ratones KO hembra al final del tercer ciclo de administración de DSS (8cm)

## 10.2 Observaciones macroscópicas de las heces

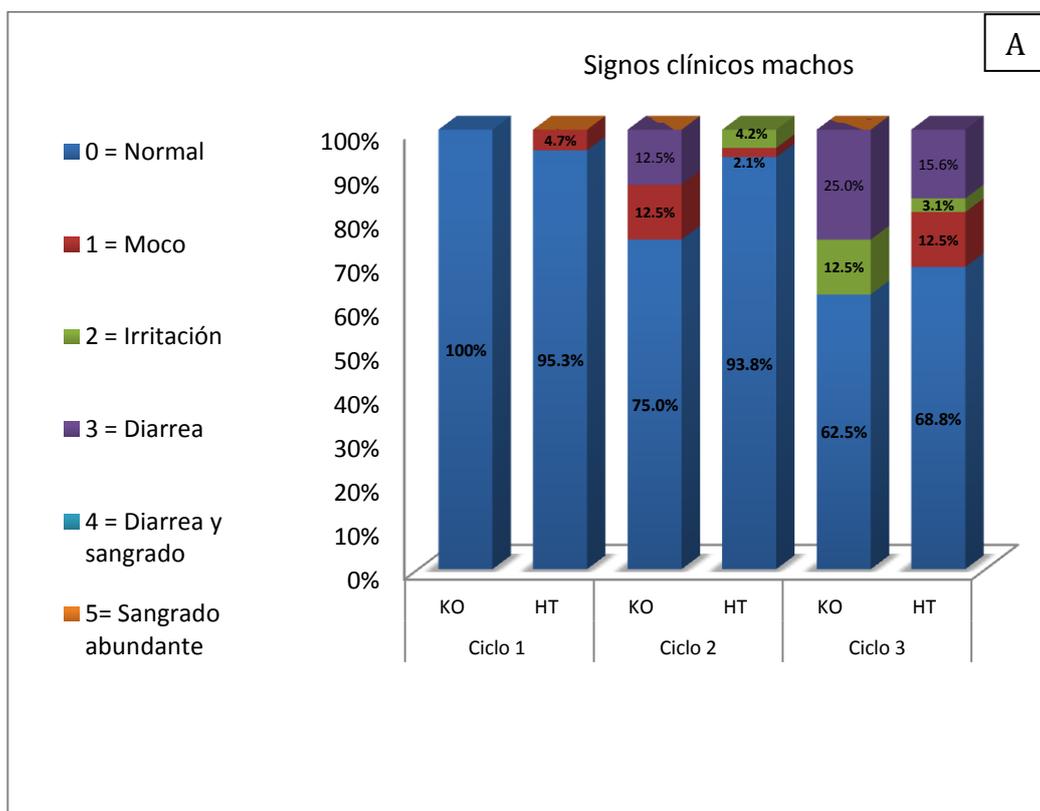
La consistencia de las heces es otro de los parámetros de evaluación macroscópica para el establecimiento del modelo de inflamación en el intestino grueso murino. Al igual que en el modelo, este parámetro se utiliza para diagnosticar CU en humanos haciendo uso de diversas escalas clínicas, las cuales correlacionan el grado de actividad de la enfermedad con los cambios observados en las evacuaciones de los pacientes. Se reporta que en la etapa activa, las heces son líquidas, sanguinolentas acompañadas de moco, pujo y tenesmo rectal<sup>57</sup>. Pero estos síntomas pueden variar si el grado de actividad de la enfermedad es de leve a moderada, en cuyo caso, la presencia de moco y sangre en las heces puede pasar desapercibida<sup>58</sup>.

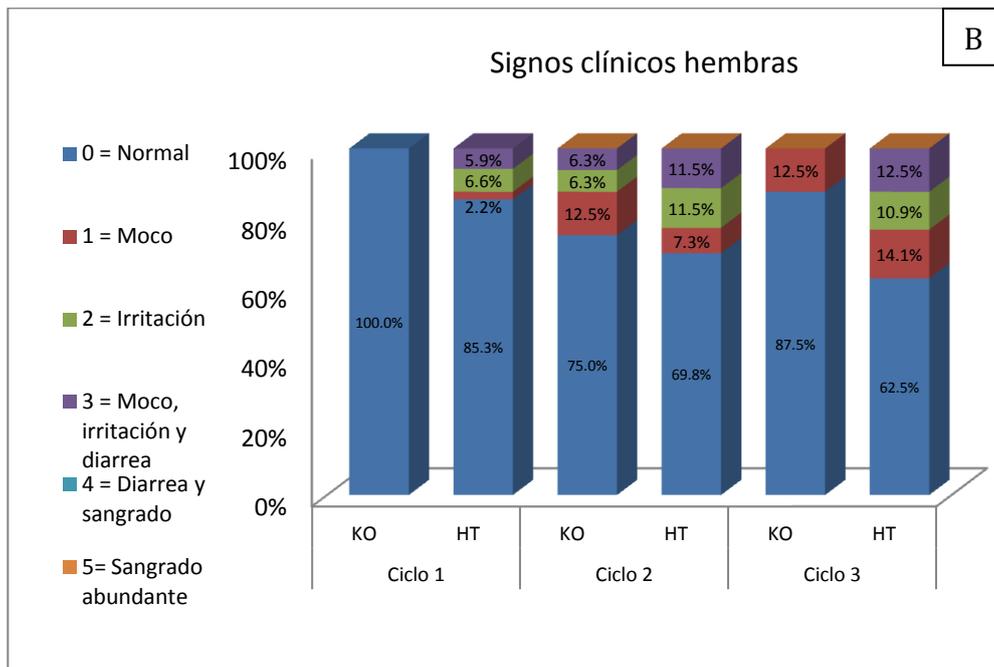
En los grupos de ratones en estudio, se observaron cambios en la consistencia de las heces, moco, irritación y sangrado desde el primer ciclo de administración de DSS, pero ya hacia el inicio del segundo ciclo de administración en ambos grupos. Los ratones HT presentaron con mayor frecuencia moco, irritación y diarrea, tanto para los individuos de sexo masculino como femenino (**figura 7**). Por otro lado, los ratones KO, presentan con menor frecuencia irritación y diarrea, pero frecuentemente tienen presencia de moco en sus evacuaciones. En ningún caso se observa un proceso inflamatorio severo. Lo anterior se debe al modelo de inducción utilizado. El DSS, administrado en concentraciones superiores al 2% y por periodos cortos de tiempo, genera un proceso inflamatorio agudo, con síntomas de severos a graves; mientras que, si se administra a una concentración menor a 2% y por periodos prolongados, se genera un proceso inflamatorio crónico, con síntomas de moderados a leves<sup>37</sup>. Se propone que esto se debe a que el agente químico es directamente tóxico para las células epiteliales evitando que estas entren a las fases G2 y M del ciclo celular<sup>37</sup> y afecta la integridad de la barrera mucosa<sup>39</sup>, generando alteraciones en la permeabilidad de la misma lo que permite que productos del metabolismo secundario de

la flora normal luminal (LPS, endotoxinas, entre otros) permeen en la mucosa colonica. Por lo que a mayor concentración de DSS mayor es el daño tisular que se traduce en heces más líquidas con presencia de moco y sangrado.

El hecho de que los ratones presenten los primeros signos clínicos a finales del primer ciclo, durante la fase de recuperación, coincide con el mecanismo de acción propuesto para el DSS; el cuál primero ocasiona cambios en la permeabilidad de la membrana y posteriormente origina el proceso inflamatorio.

Por otro lado cuando el proceso inflamatorio es severo, se destruye el epitelio intestinal por lo que se observa un sangrado abundante<sup>59</sup>. En el caso particular del presente trabajo, se pretendió establecer un modelo crónico con actividad de leve a moderada, para asemejar lo que sucede en los primeros 10 años de enfermedad en los humanos<sup>58</sup>.





**Figura 7. Signos clínicos observados en ratones KO y HT durante los tres ciclos de administración de 1% DDS.**

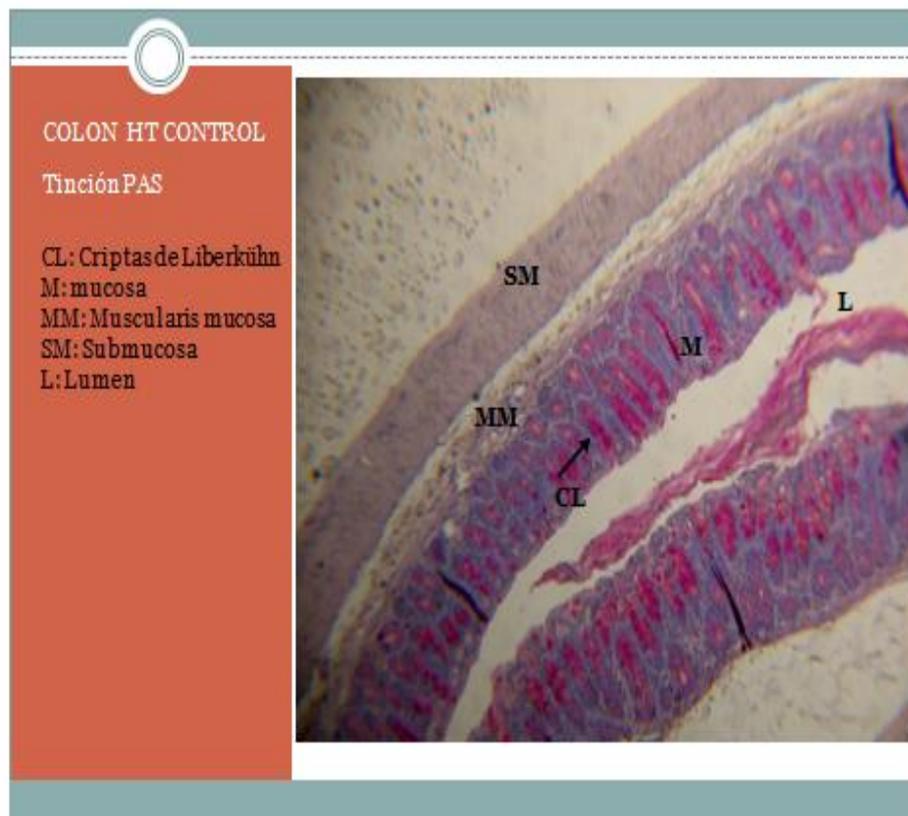
A) Signos clínicos en machos. B) Signos clínicos en hembras. Los datos se reportan en porcentaje. n=12 en los grupos KO y n=12 en los grupos HT (se sacrifican cuatro ratones por grupo por ciclo)

### 10.3 Observaciones microscópicas del proceso inflamatorio

Para observar la celularidad y el proceso inflamatorio en cortes histológicos, se removió el colon de los individuos en estudio, que fue procesado para ser teñido por técnicas histoquímicas de PAS (*Periodic Acid Schiff*), la cual es utilizada para la detección de hidratos de carbono, libres o conjugados, cuando están en cantidades relativamente grandes en los tejidos, en este caso para la detección de moco producido por las células caliciformes del intestino (**figura 8**); y por la técnica de HE (hematoxilina-eosina) que se utiliza para teñir de diferente color a las estructuras ácidas y básicas de la célula. El intestino grueso fue fragmentado en cinco porciones anatómicas para caracterizar la inflamación y para determinar si había variaciones entre estas. Las secciones fueron: Ciego (C), colon descendente (CD), colon transverso (CT), colon ascendente (CA) y recto (R). Se muestran únicamente las secciones del ciego y el recto, ya que en procesos inflamatorios crónicos con actividad leve de la enfermedad, la región del recto es la que se encuentra comúnmente afectada por la enfermedad<sup>56,57,59</sup>.

Los hallazgos histológicos, se correlacionan con el desarrollo clínico de la CU. El proceso se limita a la mucosa, con implicación leve de la submucosa<sup>56</sup>. Las capas más profundas no se ven afectadas, salvo en los casos de enfermedad fulminante<sup>59</sup>. Tal como se observa en la **Figura 9**, indicado con el símbolo (\*), en los individuos sometidos a tres ciclos de administración de DSS al 1%, tanto del grupo KO como HT, la afectación se mantiene

únicamente en la mucosa intestinal, lo que se correlaciona con los signos clínicos observados anteriormente.

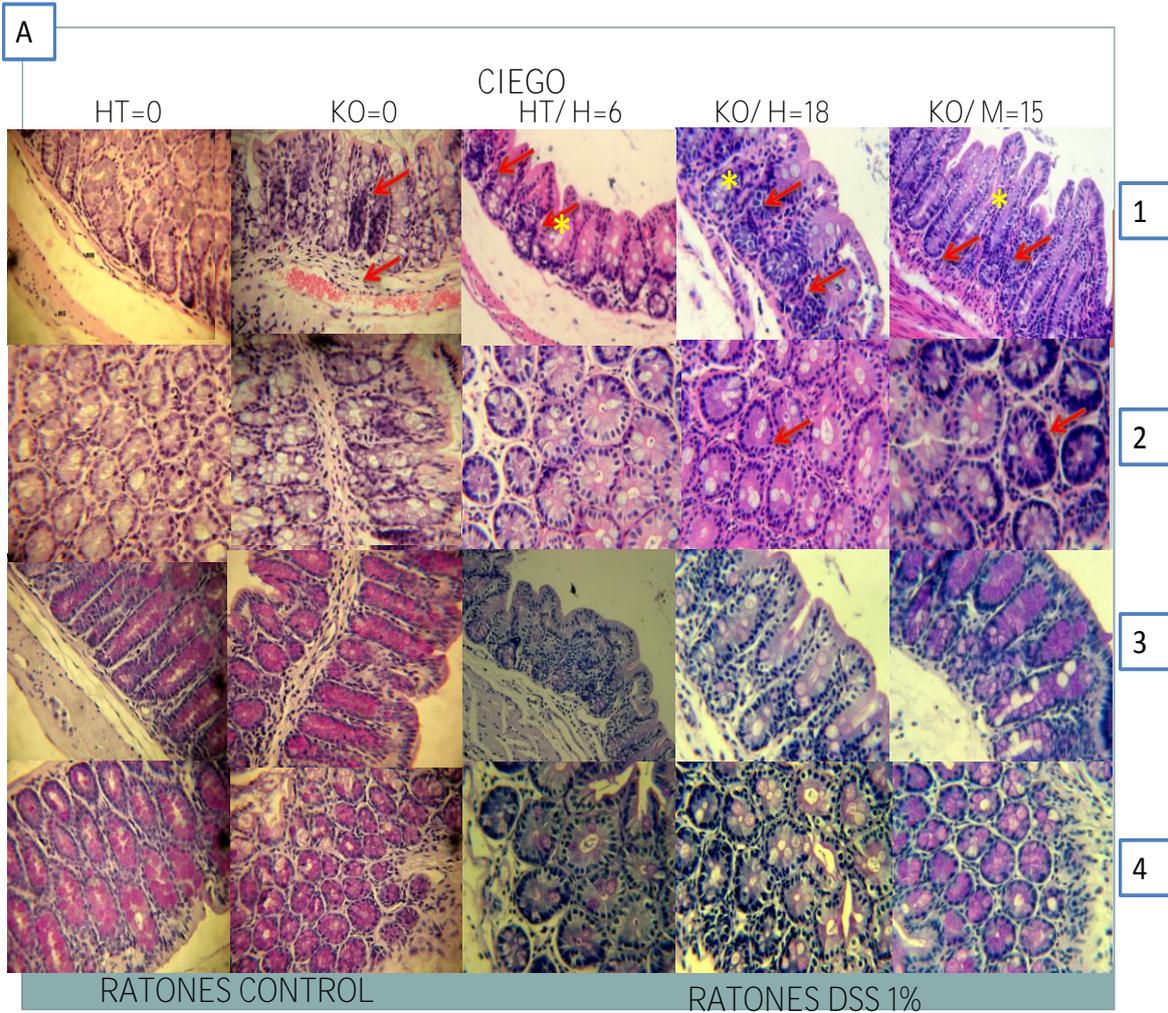


**Figura 8. Corte histológico teñido con PAS.**

Se muestra un fragmento de intestino murino sano en donde se señalan las diferentes regiones estructurales (CL: Criptas de Liberkun; M: mucosa; MM: *Muscularis mucosa*; SM: Submucosa; L: lumen)

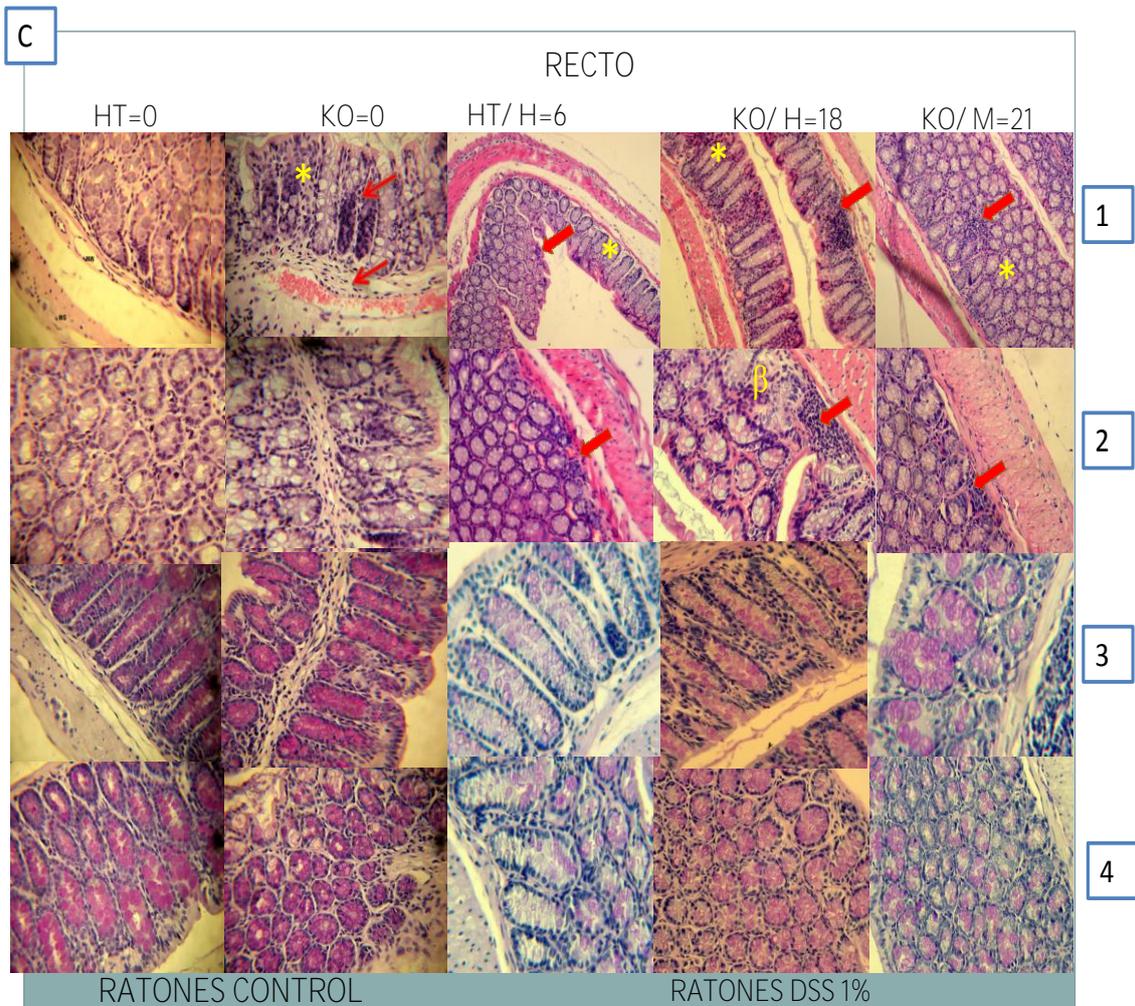
Para el caso de la CU, existen dos características histológicas que sugieren cronicidad y que permiten diferenciar el proceso autoinmune de un proceso infeccioso. La primera es la distorsión de la arquitectura de las criptas y en los casos de enfermedad severa, se observa también una separación entre la base de las criptas y la *muscularis mucosa*. La segunda es la presencia de agregados linfoides<sup>59</sup>. Los resultados del presente trabajo muestran distorsión leve pero visible en las criptas en todo el tejido intestinal (datos no mostrados), siendo esta más intensa en la región del recto en ambos grupos tratados, pero principalmente en el grupo KO hembras, tal como se muestra en la **Figura 9 C2**, indicada por el símbolo ( $\beta$ ). Así mismo, la presencia de agregados linfoides se observa tanto en los cortes del ciego como del recto de ambos grupos de ratones tratados, en la **Figura 9A y 9C** indicados con flechas. Siendo más evidente en el recto de las hembras KO.

Debido al proceso regenerativo de la mucosa, hay disminución de células caliciformes, con la consiguientes disminución en la producción de moco<sup>56</sup>. Esto es evidente en las **figuras 9A3, 9A4, 9C3 y 9C4**. En donde se observa disminución de la producción de mucina por las células caliciformes, mediante tinción de PAS.



**B**

Parámetro	Calificación HT	Calificación KO H	Calificación KO M
Severidad de la inflamación	1	2	2
Extensión de la inflamación	1	2	2
Daño en las criptas	0	2	1
Porcentaje involucrado	3	3	3
Total	6	18	15



**D**

Parámetro	Calificación HT	Calificación KO H	Calificación KO M
Severidad de la inflamación	1	2	2
Extensión de la inflamación	1	2	2
Daño en las criptas	0	3	2
Porcentaje involucrado	3	3	3
Total	6	21	18

**Figura 9. Comparación de cambios histológicos en colon murino.**  
 (A) Cortes de ratones tratados con DSS al 1% de grupos HT, KO y control de la región del ciego, (1) Tinción HE 10X; (2) Tinción HE 20X; (3) Tinción PAS 10x; (4) Tinción PAS 20X; (B) Se muestra la tabla de evaluación del proceso inflamatorio intestinal en la región del ciego; (C) Cortes de ratones tratados con DSS al 1% de grupos HT, KO y control de la región del recto, (1) Tinción HE 10X; (2) Tinción HE 20X; (3) Tinción PAS 10x; (4) Tinción PAS 20X; (D) Se muestra la tabla de evaluación del proceso inflamatorio intestinal en la región del recto.

Lo anterior es aún más evidente para las hembras y más aún para aquellas del tipo KO para CCR9.

Para evaluar el conjunto de hallazgos histológicos, se utilizó una tabla de evaluación de la inflamación, en donde se midieron cuatro parámetros, severidad de la inflamación, extensión de la inflamación en las diferentes regiones, daño en las criptas y porcentaje del colón que presenta daño debido al proceso inflamatorio. A los dos primeros parámetros se les asignó una calificación que va de 0 a 3, al tercero y cuarto parámetros se les evaluó de 0 a 4. Se sumaron las calificaciones obtenidas en los tres primeros parámetros y el resultado se multiplicó por el valor asignado al porcentaje involucrado de acuerdo a la **Tabla 3**.

En los ratones control, se observa una diferencia mínima entre los grupos HT y KO en la evaluación del proceso inflamatorio intestinal de acuerdo a los parámetros de evaluación mostrados en la **figura 9B y 9D**, aún cuando ninguno de los dos grupos fue sometido a estímulos de inducción del proceso inflamatorio es en estos últimos donde se observa infiltrado celular (**figura A1 y C1**).

Los ratones hembras CCR9 KO presentan en la región del ciego infiltración celular y pérdida moderada de la estructura de las criptas así como poca producción de moco, la infiltración celular se extiende hasta la submucosa; recibiendo una calificación histológica de 18 puntos (**figura 9B**). Por otro lado en el recto en el mismo grupo de ratones, se observa una mayor infiltración celular, la cual se acumula en la región cercana a la submucosa y se extiende de igual manera a la submucosa, se observa mayor pérdida de la estructura de las criptas, no se observa mayor producción de moco; recibiendo una calificación histológica de 21 puntos (**figura 9C**).

En los ratones machos CCR9 KO se observa en el ciego infiltración celular y pérdida moderada de la estructura de las criptas así como producción moderada de moco, la infiltración celular se extiende hasta la submucosa; recibiendo una calificación histológica de 15 puntos (**figura 9B**). Por otro lado en recto se observa una mayor infiltración celular, la cual se acumula en la región cercana a la submucosa y se extiende de igual manera a la submucosa, se observa mayor pérdida de la estructura de las criptas a comparación de la observada en el ciego, no se observa mayor producción de moco; recibiendo una calificación histológica de 18 puntos (**figura 9B**).

Por lo anterior se concluye que son los ratones CCR9 KO tanto hembras como machos quienes al ser sometidos a tres ciclos de DSS presentan mayor inflamación en el intestino grueso, principalmente en su porción terminal (recto) a comparación del los ratones HT para el receptor CCR9.

#### **10.4 Análisis de las poblaciones linfocitarias de interés mediante citometría de flujo**

Para mantener la homeostasis intestinal es necesario que exista un balance entre las células T efectoras y las T reguladoras (Treg). Para regular la inmunidad, los linfocitos T migran al intestino utilizando una combinación de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas. A la fecha se desconoce si las rutas de migración de los linfocitos T efectoras y las de los Treg son distintas o se comparten<sup>62</sup>.

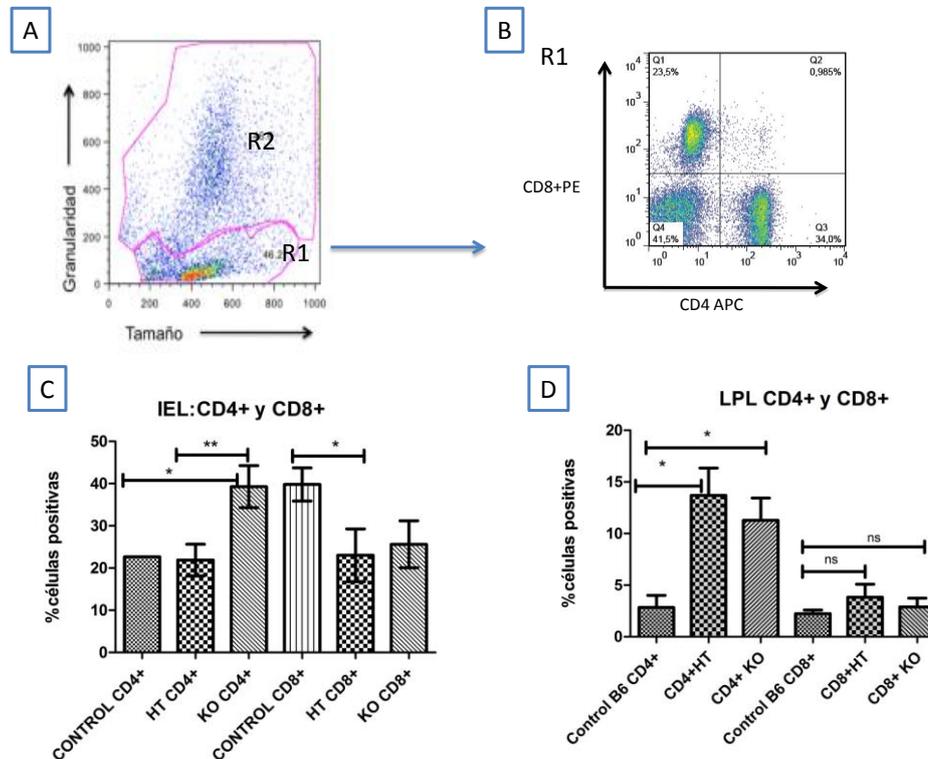
La CU, resulta de un desbalance entre los linfocitos T efectoras y los Treg. La recirculación de los linfocitos al intestino, se encuentra mediada por la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , que interactúa con la molécula de adhesión MAdCAM-1<sup>63</sup>; sin embargo, no se sabe como los linfocitos T que migran hacia el colon, reconocen específicamente este microambiente ni como el proceso inflamatorio observado en la CU, se mantiene localizado únicamente en esta región. La expresión de CCL25 se observa principalmente en el intestino delgado y en el timo, la restricción en la expresión de este ligando, proporciona un mecanismo molecular potencial para el tráfico linfocitario al intestino delgado y según datos encontrados en el presente trabajo, probablemente también al intestino grueso<sup>29-36</sup>.

CCL25 atrae células que expresan a su receptor CCR9. Esto podría ser relevante clínicamente, al encontrarse que los pacientes que presentan EC tienen un número elevado de linfocitos T CCR9+ en sangre periférica<sup>63</sup>. CCL25 también se encuentra elevado en el hígado de pacientes que presentan colangitis<sup>62</sup>. Por lo que es probable que CCL25 sea un quimioatrayente para linfocitos T efectoras CCR9+, o alternativamente, puede reclutar Tregs para ayudar en los procesos inflamatorios<sup>62</sup>.

Para comprobar lo anterior, se sacrificaron a los ratones de los grupos HT y KO el día 36, al finalizar el tercer ciclo de agua en el protocolo de DSS; se removió el MLN, el bazo y el intestino completo desde el ciego hasta el recto. El ganglio y el bazo se disgregan mecánicamente, mientras que el intestino se sometió a tratamientos con incubación en medio DTT/EDTA/CMF a 37°C para obtener los IEL posteriormente se somete a un último tratamiento con colagensa IV en medio RPMI para la obtención de LPL, como se describe en la sección de materiales y métodos. Se utilizó un ratón HT no tratado como grupo control.

Una vez obtenidas las células se realizó el procedimiento de tinción para la técnica de citometría de flujo utilizando las siguientes mezclas M1 CCR9-FITC/CD4-APC/CD8-PE/CD103-Cy5; M2 CCR6-FITC/CD4-APC/CD8-PE/CD103-Cy5; M3 CCR9-FITC/CD4-APC/CD25-PE/ FOXP3-Cy5; M4 CCR9-FITC/CD8-APC/CD25-PE/ FOXP3-Cy5. Se muestran los resultados obtenidos.

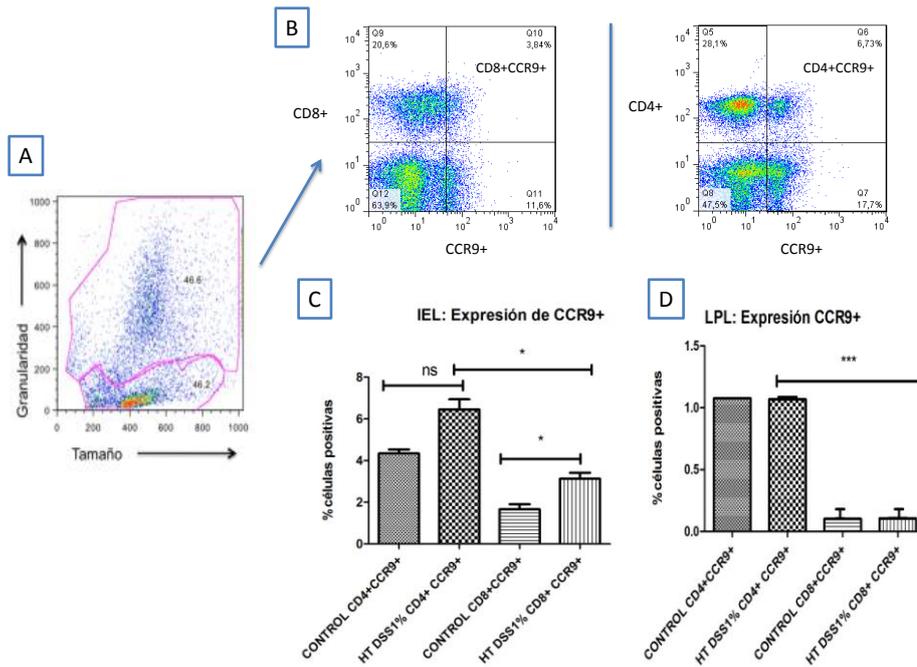
Para analizar a cada población se realizaron subregiones de acuerdo al tamaño y granularidad a las que se llamaron R1= Linfocitos y R2= Granulocitos/macrófagos. De acuerdo a la selección de la región R1 y se monitoreo el porcentaje de linfocitos IEL y de LPL CD4 y CD8 (**figura 10**).



**Figura 10. Porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ en compartimento intraepitelial y en lamina propia.**

A) Subregiones de acuerdo al tamaño y granularidad a las que se nombró R1, Linfocitos y R2, Granulocitos/macrófagos, B) Se muestra un *dot blot* representativo para la población analizada, C) Porcentaje de células CD4+ y CD8+ en el compartimento intraepitelial, D) Porcentaje de células CD4+ y CD8+ en el compartimento de lamina propia. n=9 ratones por grupo HT y KO y n=3 por grupo control ( $p < 0.05$ )

Se observó que la población IEL presenta una mayor proporción de linfocitos CD8+ para el grupo HT y para el grupo control, con respecto a los linfocitos CD4+ (**figura 10C**) tal como se espera para este tipo de población linfocitaria, en la región intraepitelial<sup>62,63</sup>; sin embargo, en los ratones KO no se observa este comportamiento, por el contrario, se observa que es la población CD4+ la que se encuentra en mayor porcentaje respecto a la población CD8+, lo que sugiere que existe un desbalance en esta población. Por otro lado en la población LPL se observó una mayor proporción de linfocitos CD4+ con respecto a los linfocitos CD8+ para todos los grupos (**figura 10D**), lo que es un comportamiento esperado para esta región intestinal<sup>62,63</sup>. Cabe mencionar que la población de linfocitos CD8+ es mayor para el grupo KO que para el HT, aunque se conserva la relación CD4+/CD8+. Lo cual sigue sugiriendo un posible desbalance en la población CD8+ en los ratones KO, lo cual puede relacionarse con el mayor proceso inflamatorio observado en este grupo.

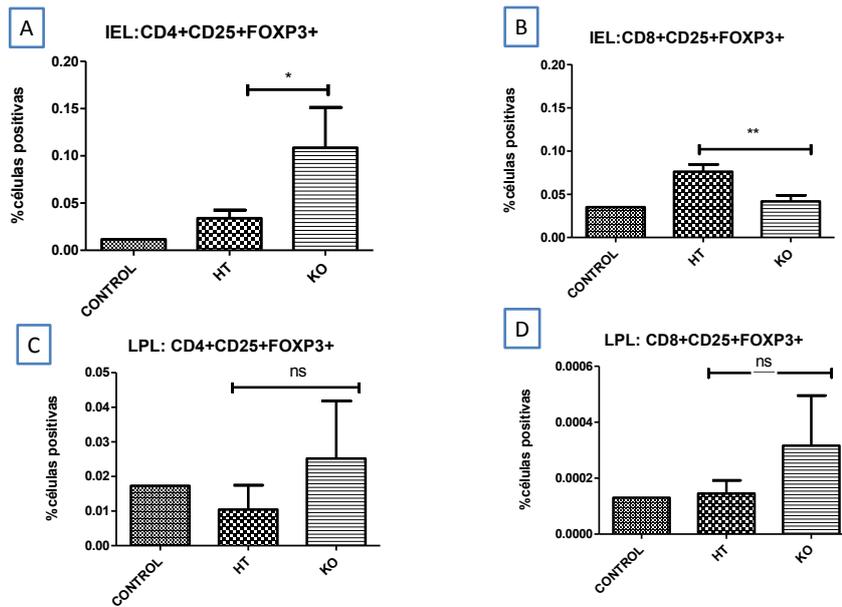


**Figura 11. Expresión del receptor de quimiocinas CCR9+ en linfocitos CD8+ y CD4+ del compartimento intraepitelial y de lámina propia.**

A) Subregiones de acuerdo al tamaño y granularidad a las que se nombró, B) Se muestra un *dot blot* representativo para la población de IEL, C) Porcentaje de células CD4+CCR9+ y CD8+CCR9+ en el compartimento intraepitelial, D) Porcentaje de células CD4+CCR9+ y CD8+CCR9+ en el compartimento de lamina propia.

n=9 ratones por grupo para HT / n=3 ratón para grupo control para LPL  
n=8 ratones por grupo para HT / n=3 ratón para grupo control para IEL (p<0.05)

Posteriormente se determinó la expresión del receptor de quimiocinas CCR9+ en linfocitos CD8+ y CD4+ del compartimento intraepitelial y de lámina propia para los grupos HT y control (**figura 11**). Se encontró que la población IEL presenta una mayor proporción de linfocitos CD4+ CCR9+ tanto para el grupo sin tratamiento (control) como para el grupo de ratones HT tratado con 1% de DSS (**figura 11C**); así mismo, se observó que la población LPL presenta una mayor proporción de linfocitos CD4+CCR9+ para ambos grupos (**figura 11D**).



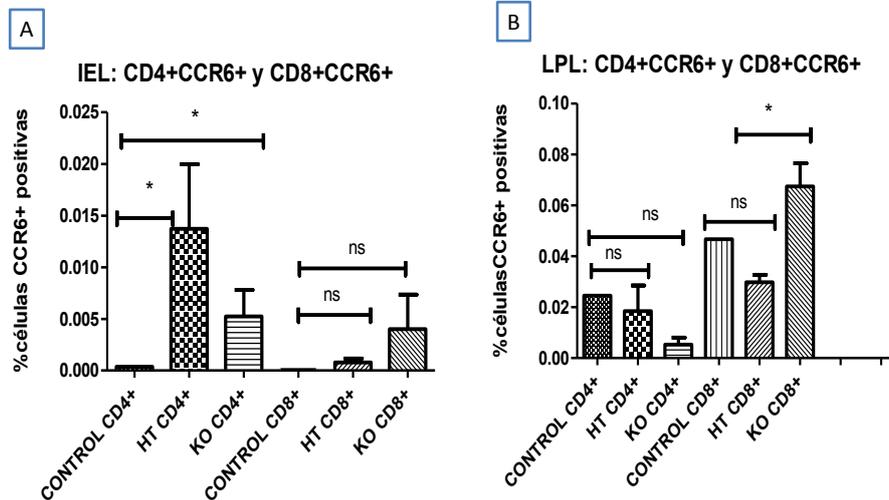
**Figura 12. Porcentaje de linfocitos T4Reg y T8Reg en el compartimento intraepitelial y en lamina propia.**

A) Porcentaje de células CD4+CD25+FOXP3+ en el compartimento intraepitelial, B) Porcentaje de células CD8+CD25+FOXP3+ en el compartimento intraepitelial, C) Porcentaje de células CD4+CD25+FOXP3+ en el compartimento de lamina propia, D) Porcentaje de células CD8+CD25+FOXP3+ en el compartimento de lamina propia. n=3 ratones por grupo para KO y HT / n=1 ratón para grupo control para LPL. n=7 ratones por grupo para KO y HT / n=1 ratón para grupo control para IEL. (p<0.05)

Para identificar la presencia de la población T4Reg CD4+CD25+FOXP3+, se utilizó a la población intraepitelial y de lámina propia observándose una mayor presencia de esta en los ratones KO que en los HT para ambas poblaciones (**figura 12**). Posteriormente se examinó también a la población T8Reg CD8+CD25+FOXP3+ (**figura 12 B y E**), la cual se ha descrito recientemente en distintos tipos de cáncer principalmente de mama y próstata, con características fenotípicas y funcionales similares a las de la población T4Reg. Encontrándose que la población T8Reg en LPL se encuentra incrementada en los ratones KO pero no así en la población IEL.

En general la presencia elevada de la población reguladora en los ratones KO sugiere que existe un desbalance entre la población de linfocitos reguladores respecto a los efectores, lo cual se asocia con un proceso inflamatorio exacerbado en el epitelio intestinal de los ratones KO a comparación de los ratones HT<sup>62</sup>. El hecho de que en los IEL no se observe elevada la población T8Reg en los ratones KO podría asociarse a que el proceso inflamatorio con la administración de 1% de DSS no destruye el epitelio intestinal como se observa con la administración de concentraciones más elevadas de DSS (2-5%), generándose daño principalmente en las capas mucosa, submucosa y por ende en la lámina

propria del intestino, por lo que el daño es menor en esta región; sin embargo, se debe repetir el experimento para descartar el hecho de la pérdida de marcadores de superficie debido al proceso de permeabilización de membrana para la tinción intracelular de FOXP3.

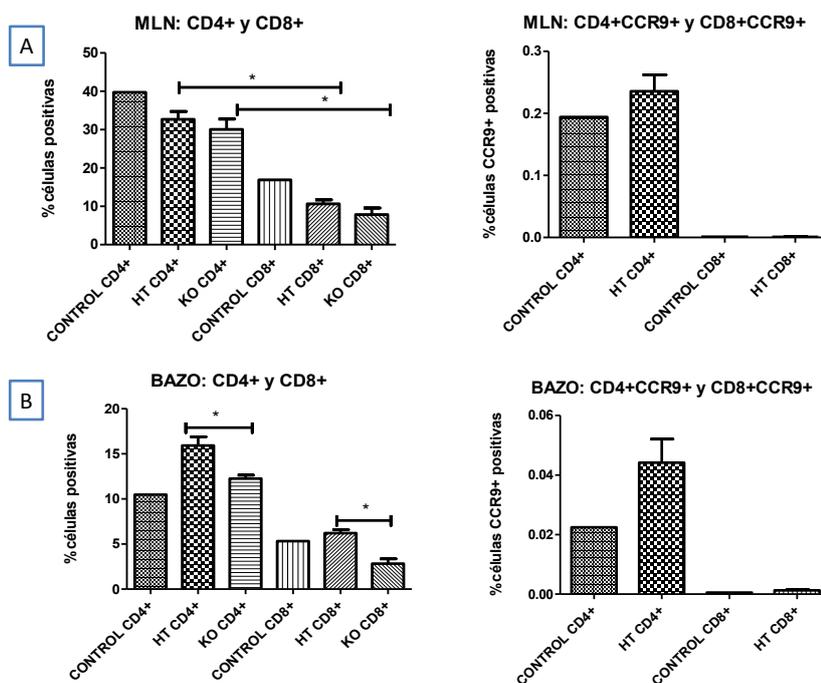


**Figura 13. Expresión del receptor de quimiocinas CCR6.**

A) Porcentaje de células CD4+CCR6+ y CD8+CCR6+ en el compartimiento intraepitelial, B) Porcentaje de células CD4+CCR6+ y CD8+CCR6+ en el compartimiento de lamina propia, n=3 ratones por grupo para KO y HT / n=1 ratón para grupo control ( $p < 0.05$ )

Se utilizó al receptor de quimiocinas CCR6 para examinar la expresión de otro receptor cuya participación en el proceso inflamatorio intestinal se ha reportado<sup>47</sup>. Se observó que en la lámina propia los linfocitos CD8+ expresa más CCR6+ (**figura 13B**); mientras que los linfocitos intraepiteliales CD4+ expresan más CCR6+ (**figura 13A**). En contraste los LPL CD4+ y los IEL CD8+ son los que expresan más CCR9+.

Para analizar las poblaciones linfocitarias CD8+ y CD4+ en los órganos linfoides secundarios (bazo y MLN), se determinó la proporción existente de estos dos marcadores en la población linfocitaria. Se observó que se conserva la proporción de linfocitos CD4+ y CD8+ como en condiciones de homeostasis. No se observan diferencias entre el grupo KO y el HT (**figura 14**). Por otro lado se determinó la expresión de linfocitos CD8+CCR9+ y CD4+CCR9+ (datos no mostrados) encontrándose estos en muy baja cantidad en dichos órganos.



**Figura14. Porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ que expresan el receptor CCR9+ en órganos linfoides secundarios (MLN y bazo)**  
 ,n=3 ratones por grupo para KO y HT / n=1 ratón para grupo control (p<0.05)

### 10.5 Expresión de CCL25 y de CCR9 en colón

CCL25, es altamente expresado en timo e intestino delgado a nivel de mRNA, mientras que su receptor CCR9 no se expresa en colon en condiciones de homeostasis<sup>23,29</sup> y consistentemente es expresado por linfocitos aislados a partir de intestino delgado<sup>20-23</sup>. Para analizar la expresión relativa de este receptor y de su ligando CCL25 en condiciones de enfermedad, específicamente en el modelo murino de CU inducido por 1% de DSS, se realizó la cuantificación de los transcritos de CCL25 y CCR9 utilizando *Syber green* mediante el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7300. Cada reacción fue realizada por duplicado. Las secuencias de los *primers* utilizados fueron CCL25 Forward: 5'-ccaaggtgcctttgaagact-3', CCL25 Reverse: 5'-tcctccagctggtggttact-3', CCR9 Forward: 5'-ccaggaaatctctggtctgc-3', CCR9 Reverse: 5'-ctgtggaagcagtgaggtagca,  $\beta$ -actina Forward: 5'-gctgtattcccctccatcgt -3',  $\beta$ -actina Reverse: 5'-gccatgttcaatgggttact -5'.

Se determinó la expresión relativa tanto de CCR9 como de su ligando CCL25 en el recto de ratones tratados con el DSS 1% y sacrificados a los 12, 24 y 36 días (correspondientes al final de cada ciclo de tratamiento de DSS). Recientes reportes, demuestran que la expresión de CCL25 en intestino grueso incrementa a medida que avanza el ciclo de administración de DSS en un modelo murino de CU aguda<sup>60</sup>. Por lo

anterior se pretende determinar si existe una relación directa entre la progresión del proceso inflamatorio crónico con la expresión de la quimiocina y su receptor.

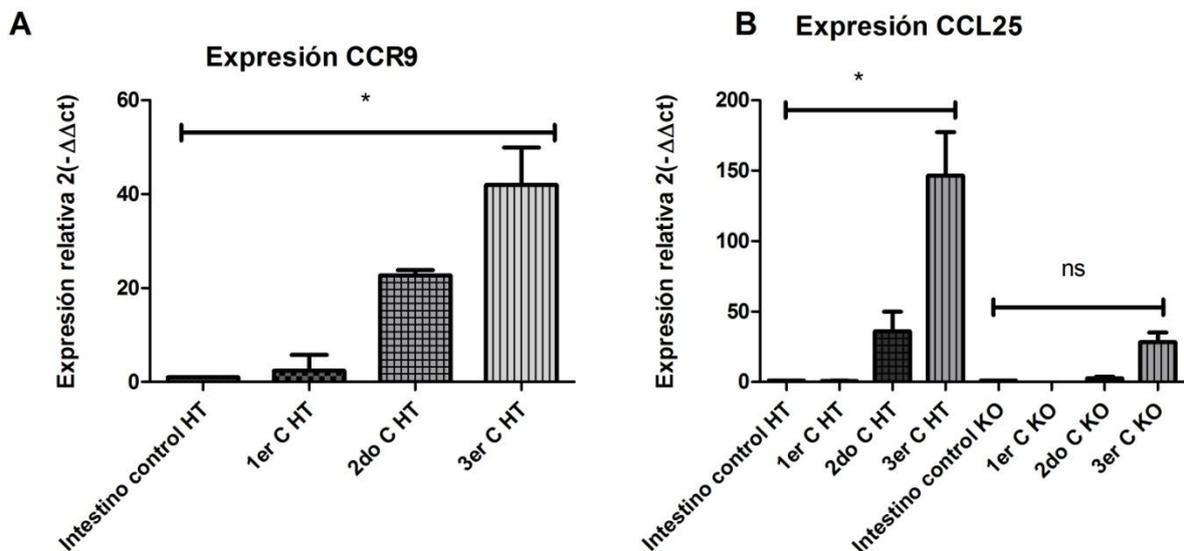
Se utilizó tejido de timo como control positivo de la expresión de CCR9. El resultado de este análisis demostró que en condiciones de inflamación existe una sobreexpresión tanto de CCL25 como de CCR9, a comparación de lo observado en condiciones homeostáticas en el colon **Figura 15**. Se observó que aún en ausencia de CCR9 existe expresión de su ligando en el tejido analizado y que a medida que el proceso inflamatorio se estableció como crónico la expresión relativa de CCL25 también se fue incrementando (**figura 15 B**); aún cuando este dato no es significativo, sugiere una regulación basal del ligando por su receptor. Para el caso de los ratones CCR9 HT, la expresión relativa de CCL25, también se incrementó a medida que el proceso inflamatorio se volvió crónico, observándose una diferencia significativa entre la expresión relativa de CCL25 en el primer ciclo de administración de DSS con respecto a la expresión relativa de CCL25 en el tercer ciclo de administración de DSS (**figura 15 B**). El que la expresión de CCL25 sea mayor en los ratones HT que en los KO, concuerda con lo observado no sólo en los ratones KO para CCR9, sino en otros ratones KO para diferentes receptores de quimiocinas donde se observa un incremento en la expresión relativa de él o los ligandos correspondientes<sup>31</sup>.

Se observó que existe expresión a nivel de mRNA de CCR9 en el intestino grueso en el proceso inflamatorio inducido (**figura 15A**). Lo anterior, es en sí un hallazgo importante, ya que no se había demostrado la presencia de CCR9 en colón ni en condiciones de homeostasis ni en condiciones patológicas<sup>20-23</sup>.

La expresión relativa de CCR9 en los ratones HT, se incrementó con cada ciclo de administración de DSS, tal y como ocurrió con CCL25 (**figura 15B**). Siendo esta diferencia significativa entre el primer y el tercer ciclo de administración de DSS.

Una vez demostrada la presencia del receptor el tejido inflamado, es importante notar también que la expresión de este se incrementa a medida que el proceso inflamatorio evoluciona y se establece su cronicidad.

En conjunto estos resultados sugieren que CCR9 y CCL25 tienen un papel en el compartimiento inmune del intestino grueso, pero el grado en el cual participan en la regulación del proceso inflamatorio, aún es poco claro.



**Figura 15. Expresión relativa de CCR9 y CCL25 en colón**

A los días 12 (fin del primer ciclo de DSS 1%), 24 (fin del segundo ciclo de DSS 1%), y 36 (fin del tercer ciclo de DSS 1%) de tratamiento. n=3, para cada grupo excepto para el 1er ciclo HT para CCR9 donde n=8 (p<0.05)

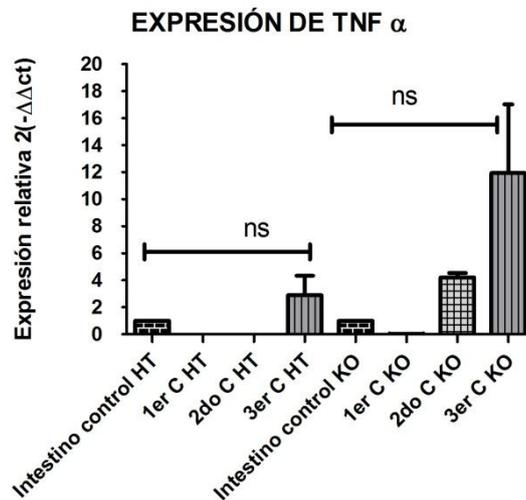
### 10.6 Expresión de $TNF\alpha$ en colón durante el proceso inflamatorio intestinal.

El tratamiento convencional de la EII se basa principalmente en la inhibición de la producción del factor nuclear kappa B y recientemente en el bloqueo de numerosas citocinas proinflamatorias e inflamatorias. Las guías actuales recomendadas para su tratamiento, incluyen el uso de 5-aminosalicilatos (5-ASA), corticosteroides e inmunomoduladores. Siendo el 5-ASA el tratamiento de primera línea en los casos de actividad leve a moderada de la CU <sup>61</sup>.

La era de la terapia biológica para la CU, se inició en el 2006 cuando se aprobó el uso de un anticuerpo monoclonal quimérico (75% de origen humano y 25% de origen murino), dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ). La mayoría de las evidencias clínicas se enfocan a los fármacos biológicos dirigidos contra este factor <sup>56,61</sup>. Lo anterior se debe a que el  $TNF-\alpha$  es una citocina proinflamatoria que se incrementa en la CU ya que se encuentra asociada con el reclutamiento de nuevas células inflamatorias <sup>56</sup>.

Se determinó la expresión relativa de  $TNF-\alpha$  en ambos grupos de ratones, observándose una mayor expresión de  $TNF-\alpha$  en ratones KO con respecto a los ratones HT (**figura 16**), lo que indica una mayor respuesta inflamatoria en estos, probablemente en función del reclutamiento de células inflamatorias en el colon mediado por esta citocina; sin embargo,

aunque el número de ratones por experimento se incrementó se sigue observando una desviación estándar elevada. A pesar de lo anterior, se observa una tendencia que indica que la expresión relativa del TNF- $\alpha$  es mayor en los ratones KO y que esta se incrementa a medida que se administra más de un ciclo de DSS, lo que sugiere que en ausencia del receptor CCR9 el proceso inflamatorio se exagera.



**Figura 16. Expresión relativa de TNF $\alpha$  en colón (porción del recto)**

A los días 12(fin del primer ciclo de DSS 1%), 24 (fin del segundo ciclo de DSS 1%), y 36 (fin del tercer ciclo de DSS 1%) de tratamiento  
n=5, para cada grupo (p<0.05)

Por otro lado se determina también la expresión relativa de Foxp3, tanto en ratones HT como KO ambos tratados con el 1% de DSS, para confirmar la tendencia observada en los experimentos realizados mediante citometría de flujo donde se determina tanto el porcentaje de linfocitos CD4+ Foxp3+ como de linfocitos CD8+Foxp3+ y en donde se observa que existe un mayor porcentaje de linfocitos CD4+Foxp3+ en los ratones HT con respecto a los ratones CCR9 KO, lo cual sugiere que la presencia de esta población reguladora elevada en los ratones HT podría ayudarles a resolver más rápido el proceso inflamatorio inducido por el DSS.

## **XI. CONCLUSIONES GENERALES**

- 1) Se observan claras diferencias en el proceso inflamatorio intestinal de los ratones CCR9 KO con respecto a los ratones HT para el receptor.
- 2) Los hallazgos histopatológicos anteriores demuestran que la respuesta inflamatoria es más severa en los ratones KO que en los ratones HT, y a su vez que esta es más severa en los ratones KO hembra que en los ratones KO macho. Lo cual permitió determinar que para el resto de los experimentos únicamente se utilizaran ratones C57BL/6 hembra.
- 3) Los datos de citometría de flujo sugieren que existe un desbalance en las poblaciones linfocitarias CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> tanto del epitelio como en la lámina propia, apuntando hacia la población CD8<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup>.
- 4) La expresión relativa de CCR9 en el epitelio del colon se encuentra presente en el intestino de los ratones tratados con DSS1%, y a su vez la quimiocina CCL25 se encuentra elevada en los ratones KO respecto a los HT. Se observó que tanto la quimiocina como el ligando incrementan su expresión a lo largo del tratamiento, observándose mayor expresión en la fase crónica de la inflamación (36d) con respecto a la fase aguda (12d). Esto correlaciona perfectamente con el grado de inflamación observado en los cortes histológicos de cada ciclo de la administración de DSS.
- 5) Lo anterior sugiere que el receptor de quimiocinas CCR9 puede estar involucrado en la regulación de la respuesta inmune en el proceso inflamatorio intestinal (EII) y que la población CD8<sup>+</sup> participa en este proceso cuando este se encuentra disminuido en los ratones HT.

## XII. REFERENCIAS

1. Mowat. (2003). Anatomical basics of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev Immunol.* 1: 331-341.
2. Janeway C y Medzhitov R.( 2002) Innate immune recognition. *Annual review of immunology.* 20(2):197-216.
3. Fehervari Z y Kiyono H. (2008).The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends in immunology.* 29(11):503-4.
4. Moser, Muriel, y Oberdan. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine* 28:3, 2-13. doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.022. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713253>.
5. Salmonte, M. (2012). Efecto de la adrenalectomía sobre la producción de plgR y secreción de IgA en el intestino delgado de ratones Balb/c sometidos a estrés. Tesis de maestría no publicada. IPN, México Distrito Federal, México.
6. Zaldívar. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2002; 5: 5-12.
7. MacDonald. The mucosal immune system. *Parasite Immunol* 2003; 25:235–246.
8. Cesta. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 599.
9. Allen, Samantha J, Susan E Crown, and Tracy M Handel. 2007. “Chemokine : Receptor Structure , Interactions , and Antagonism.” *Annual Review of Immunology.* doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529.
10. Crivellato, Vacca and Ribatti. Setting the stage: An anatomist’s view of the immune system. *Trends immunol* 2004; 25: 210-217.
11. Cheroutre, H., (2005). IELs : enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium. *Immunological Reviews.* 206: 114-131
12. Nagler-Anderson, C.,(2001). Man the barrier! strategic defenses in the intestinal mucosa . *Nat. Rev. Immunol.*1:59-67
13. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity.* 2009;31(5):711-21.
14. Bordon Y. Chemokines: A class apart — uncovering a role for the C-chemokine. *Nature Reviews Immunology.* 2010;10(1):5-5.
15. Allen, S., Crown, S., y Handel, T.,(2007). Chemokine: Receptor Structure , Interactions , and Antagonism. *Annual Review of Immunology.* 25:787-820.
16. Gerard C,y Rollins B. Chemokines and disease. *Nature immunology.* 2001;2(2):108-15.
17. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Critical Care.* 2007.

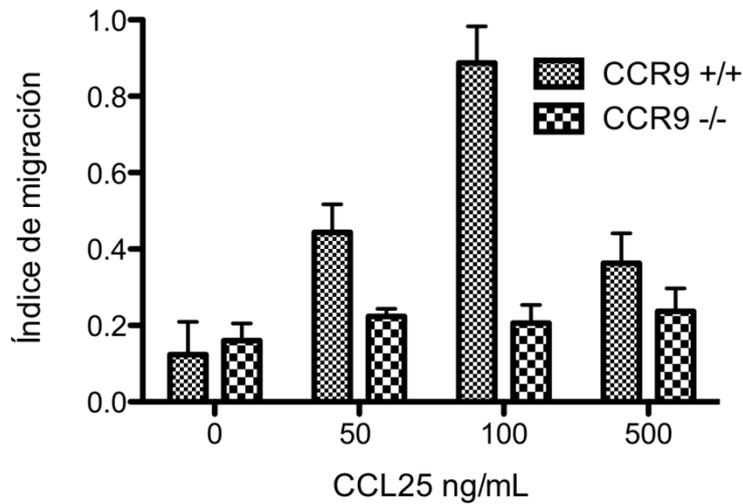
18. Förster, R., Pabst, O., y Bernhardt, G. (2008). Homeostatic chemokines in development, plasticity, and functional organization of the intestinal immune system. *Seminars in immunology*. 20(3):80-171
19. Viola, A., y Luster, A. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 48: 171-97
20. Zaballos, A., Gutiérrez J, Varona R, Ardavin C, Márquez G. Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1999;162(10):5671-5.
21. Youn, B., Kim, C., Smith, F., y Broxmeyer, H. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood*. 1999; 94(7):2533
22. Yu, C., Peden, K., Zaitseva, M., Golding, H., y Farber JM. (2000). CCR9A and CCR9B: two receptors for the chemokine CCL25/TECK/Ck  $\beta$ -15 that differ in their sensitivities to ligand. *The Journal of Immunology*. 164(3):1293.
23. Wurbel M. (2001). Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta + gut intraepithelial lymphocytes. *Blood*. 98(9):2626-2632.
24. Zlotoff D., Sambandam, A., Logan, T., Bell, J., Schwarz, B., y Bhandoola, A. (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood*. 115(10):1897-905.
25. Wurbel, M., Philippe, J., Nguyen, C., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Jordan, B., Malissen, B., Carrier, A., y Naquet, P. (2000). The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *European journal of immunology*. 30(1): 262-271.
26. Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Brodén, T., Márquez, G., y Agace, W. (2002). CCL25 mediates the localization to the small-intestinal mucosa Rapid Publication. *Journal of Clinical Investigation*. 110(8):1113-1121.
27. Letsch, A., Keilholz, A., Schadendorf A., Assfalg, G., Asemissen, A., y Thiel, E., (2004). Functional CCR9 Expression Is Associated with Small Intestinal Metastasis. *American Journal of Gastroenterology*. 685-690.
28. Elgueta, R, Sepulveda, F., Vilches, F., Vargas, L., Mora, J., Bono, M., y Roseblatt, M. (2001). Mesenteric Lymph Node Dendritic Cells 1. *The Journal of Immunology*. 1-15.
29. Kunkel, E., Campbell, y Butcher, E. (2003). Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 10:313-323.

30. Kunkel, E. J., C. H. Kim, N. H. Lazarus, M. A. Vierra, D. Soler, E. P. Bowman, and E. C. Butcher. 2003. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* 111:1001-1010.
31. Apostolaki, M., Manoloukos, M., Roulis, M., Wurbel, M., Müller, W., Papadakis, K., Kontoyiannis, D., Malissen, B., y Kollias, G. (2008). Role of beta7 integrin and the chemokine/chemokine receptor pair CCL25/CCR9 in modeled TNF-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology*. 134(7): 2025-2035.
32. Pathmakanthan, S., y Hawkey, C., (2000). A lay doctor ' s guide to the inflammatory process in the gastrointestinal tract A lay doctor ' s guide to the inflammatory process in the gastrointestinal tract. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 76: 611-617
33. Nakamura, K., Honda, K., Mizutani, T., Akiho, y H., Harada, N.,(2006). Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World journal of gastroenterology*. 12(29): 4628:4635.
34. Papadakis, K., Prehn, S., Moreno, L., Cheng, E., Kouroumalis, R., Deem, T., Breaverman, P., Ponath, D., Andrew, P., Green, M., Hodge, S., y Targan, B., (2001). CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology* 121:246-254.
35. Papadakis, K., Prehn, V., Nelson, L., Cheng, S., Binder, P., Ponath, D yTargan, S., (2000). TheS role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J Immunol*. 165:5069-5076.
36. Saruta, M., Yu, A., Avanesyan, P., Fleshner,Targan, S., y Papadakis. K.(2007). Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol* 178:3293-3300.
37. Boismenu, R., Chen, Y., (2000). Insights from mouse models of colitis Abstract : Emerging studies using mouse models. *Journal of Leukocyte Biology*. 67:267-278.
38. Cho, J., Chang, H., Lee, S., y cols. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. *Life sciences*. 80(10):932-939.
39. Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B.,y Neurath, M., (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*. 2(3):541-546
40. Papadakis, K. A., C. Landers, J. Prehn, E. A. Kouroumalis, S. T. Moreno, J. C. Gutierrez-Ramos, M. R. Hodge, and S. R. Targan. 2003. CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *J Immunol* 171:159-165.

41. Rivera-Nieves, J., J. Ho, G. Bamias, N. Ivashkina, K. Ley, M. Oppermann, and F. Cominelli. (2006). Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis. *Gastroenterology* 131:1518-1529.
42. Teramoto, K., S. Miura, Y. Tsuzuki, R. Hokari, C. Watanabe, T. Inamura, T. Ogawa, N. Hosoe, H. Nagata, H. Ishii, and T. Hibi. 2005. Increased lymphocyte trafficking to colonic microvessels is dependent on MAdCAM-1 and C-C chemokine mLAR/CCL20 in DSS-induced mice colitis. *Clin Exp Immunol* 139:421-428.
43. Lee, J., Kang, and C. H. Kim. (2007). FoxP3<sup>+</sup> T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues. *J Immunol* 178:301-311.
44. Wendland, M., N. Czeloth, N. Mach, B. Malissen, E. Kremmer, O. Pabst, and R. Forster. 2007. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6347-6352.
45. Yu, S., D. Bruce, M. Froicu, V. Weaver, and M. T. Cantorna. 2008. Failure of T cell homing, reduced CD4/CD8 $\alpha$  $\alpha$  intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut of vitamin D receptor KO mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20834-20839.
46. Schaefer, J.S., Mountafar-Solis, D., Vigneswaran, N., and Klein, R. 2010. ICOS promotes IL-17 synthesis in colonic intraepithelial lymphocytes in IL-10<sup>-/-</sup> mice. *Leukoc. Biol.* 87
47. Wang, C., Kang, S.G., Lee, J., Sun, Z., and Kim, C.H. 2009. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T cell balance in the gut. *Mucosal Immunology* 2:173-187
48. Nagatani, K., K. Sagawa, Y. Komagata, and K. Yamamoto. 2004. Peyer's patch dendritic cells capturing oral antigen interact with antigen-specific T cells and induce gut-homing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Peyer's patches. *Ann N Y Acad Sci* 1029:366-370.
49. Williams, I. R. 2004. Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. *Immunol Res* 29:283-292.
50. Wurbel, M. A., J. M. Philippe, C. Nguyen, G. Victorero, T. Freeman, P. Wooding, A. Miazek, M. G. Mattei, M. Malissen, B. R. Jordan, B. Malissen, A. Carrier, and P. Naquet. 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 30:262-271.
51. Wermers, J., McNamee, E., Wurbel, M., Jedlicka, P., y Rivera-Nieves, J., (2011). The Chemokine Receptor CCR9 Is Required for the T-Cell-Mediated Regulation of Chronic Ileitis in Mice. *Gastroenterology*.140(5):1526-1535

52. Rojas A., García-Zepeda (2013). Regulación de la respuesta inflamatoria mediada por el receptor de quimiocina CCR9+ en la respuesta inmune a *Entamoeba histolytica*. Tesis Doctoral, no publicada. UNAM, Ciudad de México, México
53. Walters, M., y cols. (2010). Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease. *335*(1):61-69
54. Aufses, H., (2001). The history of Crohn's disease. *Surg Clin N Am.* 81(1).
55. Lakatos, L., y Lakatos, P., (2006). Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease increasing in Eastern Europe?. *Postgrad Med J.* 82:332-337
56. Yamamoto, F., (2008). Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico. A single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *J, Clinical Gastroenterol.*
57. Baumgart, D., y Sandborn, W., (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 369:1641-1657.
58. Goldam, H., (1994), Interpretation of large intestinal mucosal biopsies. *Human Pathology.* 25:1150-1159.
59. Fauci, A., Kasper, D., Longo, D., Braunwald, E., Hauser, S., Jameson, J., y Loscalzo, J., (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine.* Mc Graw Hill. (17): 1886-1887
60. Wurbel, M. A., J. M. Philippe, C. Nguyen, G. Victorero, T. Freeman, P. Wooding, A. Miazek, M. G. Mattei, M. Malissen, B. R. Jordan, B. Malissen, A. Carrier, and P. Naquet. 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 30:262-271.
61. Hanauer, S., (2004). Medical therapy for ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 126:1582-1592
62. Wermers, J., McNamee, Marc-André Wurbel, Paul Jedlicka, and Jesús Rivera-Nieves. 2011. "The Chemokine Receptor CCR9 Is Required for the T-Cell-Mediated Regulation of Chronic Ileitis in Mice." *Gastroenterology* (February 4). doi:10.1053/j.gastro.2011.01.044. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300065>.
63. Butcher E, M. Williams, K. Youngman, L. Rott, M. Briskin. *Lymphocyte trafficking and regional immunity.* *Adv. Immunol* 1999;72:209.

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



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

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

**Condiciones de reacción:**

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

<p><b>B-Actina</b></p> <p>Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG  Antisentido: GGTCTCAAACATGATGTGGG</p> <p>Tamaño del producto: 218pb  Temperatura de disociación: 83.8°C</p>	<p><b>CCR3</b></p> <p>Sentido:  TTCTCACCAGGAAGAAACGGA</p> <p>Antisentido:  GGAGGTGACTGAGGTGATTGC</p> <p>Tamaño del producto: 135 pb  Temperatura de disociación: 77°C</p>
<p><b>CCL11</b></p> <p>Sentido:  CTGAAGAGCTACAAAAGAATCACCAACA</p> <p>Antisentido:  GACCCCAAGAAGAAGTGGGTCCAGGATG</p> <p>Tamaño del producto: 135 pb  Temperatura de disociación: 78.3°C</p>	<p><b>IL-5</b></p> <p>Sentido  ACCTTGCACTGCTTTCTACTCAT</p> <p>Antisentido:  AGAACTCTTGCAGGTAGTCTAGG</p> <p>Temperatura de disociación: 82.3°C</p>
<p><b>CCR9</b></p> <p>Sentido:  TCCGAAGGGATCTGGTGAAG</p> <p>Antisentido: GAATGAAACCCACTGGGCC</p> <p>Temperatura de disociación: 78 °C</p>	<p><b>CCL25</b></p> <p>Sentido:  GCCTGGTTGCCTGTTTTGTT</p> <p>Antisentido:  CAGCAGTCTTCAAAGGCACCT</p> <p>Temperatura de disociación: 77°C</p>

## APÉNDICE II SOLUCIONES Y REACTIVOS

### SOLUCIONES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

- Amortiguador para FACS
- PBS 1X esteril    cbp    100 mL
- SFB                            2 mL

Azida de sodio      0.5 mL

### **SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE DNA**

- Buffer de lisis
  - Tris 1M pH 8.5    100 mL
  - NaCl 5 M            10 mL
  - SDS 10%            4 mL
  - EDTA 0.5 M        2 mL
  - H<sub>2</sub>O                  cbp 200 mL
  - Proteinasa K        20 mg
  
- Proteinasa K
  - Proteinasa K 20 mg
  - H<sub>2</sub>O                  10 mL

### **SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA**

- PBS 10x
  - KCl            200mg/L
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>    200mg/L
  - NaCl          8000mg/L
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1150mg/L
  - Agua desionizada
- Agua tratada con DEPC
  - 0.05% de DEPC en H<sub>2</sub>O tridestilada se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se esteriliza por autoclave.

### **REACTIVOS**

- Proteinasa K
- Suero fetal bovino (Hyclone)
- Etanol absoluto
- Agarosa (BIO-RAD)

- Bromuro de Etidio.
- Heparina (Sigma)
- Azul de tripano
- Anestésico Ketamina
- Poli L-lisina (Sigma)
- Peroxido de Hidrógeno 1X (Pierce)
- TMB microwell (BD Optics)
- Oligo dT. (Promega)
- MMLV-reverse transcriptase (Promega)
- dGTP, dATP, dCTP, dTTP (100 mM) (Promega).
- SYBR green Master Mix 2X (Applied Biosystems).

## **ANTICUERPOS**

- Anticuerpos murinos para FACS: Anti- mCD4-Cy, Anti-mCD8-Pe, Anti- mCCR6Cy, Anti-mCCR9-FitC (R&D), Anti-FOXP3 , Anti-CD25 (Biolegend)
- Anticuerpo conejo anti ratón IgE biotinilado (BioLegend, anti mouse I ) (Dilución 1:150).
- Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG2a (ZyMed) (Dilución 1:1000)
- Anticuerpo HRP-Rabbit anti-mouse IgG1 (ZyMed) (Dilución 1:1000)