



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la participación del receptor CCR9 y su ligando en la regulación del proceso inflamatorio de la alergia pulmonar.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Cynthia Paola López Pacheco

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Eduardo García Zepeda

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Ortega Soto

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dr. Rogelio Hernández Pando

[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"](#)

Ciudad de México. Enero, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Mención y agradecimiento especial

A la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo. Por la revisión detallada, oportuna y crítica de esta tesis de doctorado como revisora final.

El presente trabajo fue realizado por la M en C. Cynthia Paola López Pacheco, inscrita en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (UNAM), quien durante sus estudios de doctorado fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número CVU 289653 y número de beca 316675.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación sobre la Biología de las Quimiocinas y sus receptores (CBRL), del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). El Dr. Eduardo García Zepeda, recibió un financiamiento CONACyT, con número de proyecto 167913 para este proyecto de investigación.

Se agradece al Programa de Apoyo para los Estudios del Posgrado por el apoyo otorgado para asistir al Congreso Internacional de Inmunología. Celebrado en Milán, Italia del 22 al 27 de agosto de 2013.

Dedicado a la memoria de

El Dr. Eduardo

Por compartir en vida y su talento conmigo y por enseñarme con cariño y paciencia a no tener miedo y que el CBRL será siempre un lugar para soñar, ser creativos, compartirse y entregar con fuerza y sacrificio nuestro amor a la ciencia.

Mi Papa Carlos y mi abuelita Guille

Por enseñarme y permitirme hoy ser un legado de sus valores. Por su tiempo, su amor y sus cuidados, que me han enseñado que lo único que trasciende son los momentos que compartimos y lo que dejamos de nosotros en los demás.

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Eduardo García Zepeda por su invaluable apoyo y por su dirección. Por haberme incluido en su grupo de trabajo. Por su preocupación e interés en mi formación académica y por su contribución al diseño intelectual de este proyecto. También por haber sido un pilar indispensable en el establecimiento, desarrollo y conclusión del mismo. Además que su participación y compromiso con el manuscrito derivado de este trabajo, permitió exitosamente la publicación del mismo.

A la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, por su tiempo y su apoyo. Por su gran compromiso académico y por mostrarse responsable de mi crecimiento profesional. Su experiencia, contribución y colaboración fueron cruciales para mi formación académica y la generación, el desarrollo y publicación del manuscrito derivado de este proyecto de investigación. También a sus comentarios y críticas que han ido enriqueciendo día a día este trabajo y por haberme considerado parte de su grupo de investigación.

A la Q.F.B. Gisela Du Pont de Lara, por su invaluable apoyo técnico y ayuda con la disposición de materiales utilizados en esta tesis de doctorado y por la genotipificación de los ratones transgénicos empleados en este trabajo.

A los Dres. Enrique Ortega Soto y Rogelio Hernández Pando como miembros de mi Comité Tutoral, quienes con sus comentarios y opiniones críticas durante todos mis estudios de doctorado, favorecieron mi desarrollo y el del proyecto de investigación y quienes mostraron siempre interés en mi crecimiento académico. El apoyo del Dr. Rogelio con el análisis histológico, enriqueció la interpretación y conclusión de este trabajo.

Al Dr. Marc André Wurbel por haber proporcionado los ratones transgénicos CCR9 -/- en fondo genético C57BL/6 utilizados en este trabajo.

Al Dr. Leopoldo Flores Romo por su interés académico, colaboración, apoyo y su opinión crítica durante el desarrollo del mismo. Por brindar las herramientas experimentales y académicas para concluir este trabajo.

A la Dra. Elisa Cruz Morales, por su gran colaboración para el desarrollo de algunos experimentos que contribuyeron al análisis inmunohistoquímico y por su opinión y la discusión crítica de este trabajo.

A la M. en C. Karla Concepción López Pacheco, por su tiempo, sobretodo por su ayuda con el diseño de algunos oligonucleótidos utilizados y con el diseño algunos experimentos de biología molecular utilizados en este trabajo.

Al Dr. Luis Donis Maturano no sólo por su asesoría técnica, sino por su aportación científica y por su interés en mi formación académica. Debido a que la capacitación que me dio, la enseñanza de algunas técnicas empleadas en este trabajo y su ayuda con la discusión de éstas, contribuyeron a una mejor interpretación de algunos de los datos generados en esta tesis de doctorado.

A la Dra. Jaciel Medina Tamayo por haber ayudado experimentalmente con la realización de algunos experimentos y por haber enriquecido este trabajo con la enseñanza de algunas técnicas y la discusión de los resultados obtenidos en esta tesis de doctorado.

A la M.V.Z Georgina Díaz Herrera y al Dr. Victor Daniel Garzón Cortés, por su ayuda con los métodos y protocolos con animales de experimentación y las facilidades brindadas para realizar los experimentos reportados en este trabajo.

Al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba por la capacitación y apoyo con los protocolos de citometría de flujo.

A la Técnico en Histología Verónica Rodríguez Mata por su ayuda con el procesamiento de tejidos para el análisis histológico en este trabajo de investigación.

Al pBiol. José Antonio García Espinoza por ser un colaborador del proyecto de CCR9 en la inflamación pulmonar, ya que los resultados obtenidos en su tesis de licenciatura y las discusiones críticas han contribuido a enriquecer esta tesis de doctorado.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo, a la Dra. Claudia González Espinosa, al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, al Dr. Leopoldo Flores Romo, al Dr. Enrique Ortega Soto y al Dr. Rogelio Hernández Pando, como miembros del jurado de Candidatura por su evaluación, ya que sus aportaciones críticas y sus comentarios durante esta evaluación, mejoraron la discusión presentada en esta tesis de doctorado.

Al Dr. Fernando López Casillas, a la Dra. Paula Licon Limón, a la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo, al Dr. Leopoldo Flores Romo y a la Dra. Iris Citlali Estrada García, como miembros del jurado de examen de grado. Pues su revisión oportuna, su disposición y la discusión crítica de esta tesis. Ya que sus sugerencias sirvieron para el enriquecimiento de esta tesis de doctorado.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A DIOS por ser mi todo. Por ser un fuente inagotable de amor, el cual me ha regalado hasta hoy la bendición de sentirme viva.

A mis padres. Concepción Pacheco y Alberto López. Por demostrarme la mejor definición del amor cada día. Por apoyarme en las cosas que me apasionan a pesar de que no siempre las entiendan. Por ser los mejores padres y amorosos que me han hecho la mujer que soy hoy y por ser personas muy fuertes dignos de mi admiración y agradecimiento eterno. Y Mama Nirza por ser una persona alegre, contenta por vivir y que me ha enseñado a reír a pesar de las adversidades y a ser amorosa con los demás.

A mis hermanos: Karla López por ser siempre una hermana mayor que me ayuda, cuida, me escucha, me aconseja y me regaña cuando lo necesito y sin quien no podría haber llegado hasta hoy. Por su amor incondicional. Y a Alberto López por ser un hermanito que vela por mi y me apoya, me escucha cuando lo necesito, confía en mi y me enseña. Por ser una imagen a seguir para mi.

Al Dr. Eduardo. Por haber sido más que un mentor, un padre académico. Me brindó su confianza desde el primer día y me consideró como parte de su familia académica. Reforzó mis debilidades enseñándome a quitar la palabra "miedo" de mi vocabulario. Me regañaba por ser insegura, por desanimarme y por no explotar mi potencial. Celebró conmigo cada uno de mis logros. Le agradezco la confianza no sólo académica, sino personal y por cada uno de los momentos de su vida que compartió conmigo como una hija académica. El vacío imposible de llenar que hoy siento, fue porque él compartió su conocimiento, su espacio, su confianza, su tiempo y al final del camino, me dejó el regalo más bello que pude tener... No sólo un artículo publicado, sino sus todas sus fuerzas, su experiencia y su amor dedicado a las quimiocinas, expresados en éste. El Dr. Eduardo me enseñó a ser fuerte, que uno debe dejar hasta el alma en la ciencia y que todo, absolutamente todo en esta vida se puede lograr, con trabajo y dedicación.

A la Dra. Gloria porque ha sido un pilar crucial en mi desarrollo académico. La Dra. Gloria ha mostrado siempre interés en mi formación académica. Es una investigadora y maestra preocupada de que esta formación que recibamos los estudiantes sea de calidad y además ella ha contribuido con sus discusiones y su personalidad humana y empática, a que yo fortalezca mi vocación por la ciencia. Ella ha sido una digna imagen para mi y alguien a quien admiro mucho. No sólo por su fuerza y entereza, sino por su pasión, el brillo en sus ojos cada vez que habla de ésta y su vocación a la ciencia y a la docencia, todo lo cual es una fuente de inspiración muy grande para mi.

A Luis Donis. Porque siempre se ha mostrado preocupado por mi avance académico y mi crecimiento personal y ha compartido hermosas partes de su esencia conmigo. Porque ha creído en mi y me ha impulsado para lograr más cosas. Por el tiempo que me ha dedicado como profesor y por ser un tipo pepino. Por cada uno de los momentos que me ha regalado y que han contribuido a cumplir hoy esta meta. Porque gracias a haberlo conocido he aprendido muchas cosas de la vida, incluso sobre la Catedral capitalina, sobretodo a admirarlo y a querer ser como él cuando sea grande.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio, los actuales y los pasados. A lo largo de estos 10 años de mi estancia en el laboratorio, he aprendido mucho de cada uno de ellos. No me alcanzaría el espacio, pero nombraré a la mayoría: Erika Haide porque gracias a ti aprendí y me apasioné por el asma y las quimiocinas. Porque fue mi maestra y porque me comprendió en todo este aprendizaje, fue tolerante conmigo y me enseñó a ser fuerte, a Gisela Du Pont que me recibió como una mamá desde el primer día y es una persona paciente que me escucha y me alienta a hacer más cosas y por su confianza, Jaciel Medina por ser una pelada tan tierna que se da a querer por muchas personas y por haberme ayudado con los experimentos maratónicos, pero más que todo agradezco su apoyo moral y su hombro para llorar. A Jazmín Hernández por ser una hermanita tan linda, una gran amiga, por su confianza y sus momentos de risa a carcajadas, porque ha sido una amiga amorosa y cuidadosa y porque me enseñó a creer que podía hacer nuevas cosas. A Oscar Ovando porque siempre me ha prestado su hombro para llorar, su oído para escucharme y porque me ha enseñado lo que significa la amistad incondicional. A Mónica Maya, porque a pesar de ser tan pequeñita, me ha enseñado muchas cosas, por su gran corazón y su inmensa capacidad para escuchar y compartirse. A Ismael Martínez por darme apoyo constante, por ser un tronco que me hace reír, por cuidarme como un hermano y por enseñarme muchas cosas de la vida y otras tantas académicas y por haberme hecho

parte de esta etapa de su vida, gracias por tu confianza. A Toñito García por darme la oportunidad de enseñarle lo poco que sé y por enseñarme a mi nuevas cosas y permitirme aprender junto con él. Muchas de las cosas buenas, de disciplina y de vocación las he aprendido de ti.

A Julio Valdivia, Oscar Salinas, Alejandro Rodríguez, Ana Rojas, Ana Rivas, Cecilia Franco, Alicia Rodríguez, Fernando Galicia, Mayte Cossio, Gloria Rodríguez, Ana Luisa Esparza, Daniel Torres, Sandra Guzmán, Elisa Cruz, Alberto Chinney, Vanessa Becerril, Jacobo Martínez, Josué Montes, Oscar Ovando, Ismael Martínez, Antonio García, Scarlett Ortega, Lino Gaytan, Josué Montes, Luis Zárate, Laura Fernández, Alonso Cruz, Nara Acevedo y Anaí Fuentes. En cada uno he encontrado alguien que en algún momento me ha ayudado y algunos de ustedes se convirtieron en excelentes amigos. A Alicia y a Rafita por ser unos excelentes compañeros y grandes personas que me quieren y me lo demuestran, que me han ayudado a crecer y a llegar hasta este día.

A mis compañeros pasados y presentes del GS lab, que las circunstancias de la vida nos ha fusionado más todavía. Ramsés Chávez, Carlos Mier, Erica Burgueño, Berenice Martínez, Xochitl Ambriz, Ebzadrel Carbajal, Arimelek Cortés, Roxana Olguín, Germán Alemán, Evelyn Álvarez, Nellycita Roa, Sandra Ortega, Marisol de la Fuente, Aleida Núñez, Flor Brena, Violeta Rayón, Oscar Hernández, Benjamín Vega y Violeta Jimenez. Cada uno de ustedes ha sido de mucha ayuda para mi desarrollo personal y académico y les agradezco su apoyo en los momentos difíciles, los buenos momentos compartidos y todas sus enseñanzas.

A mis compañeros del lab del Dr. Flores: A Juanita Calderón, A Raúl Maqueda por su ayuda y amistad. A mis compañeros de las Sección Estudiantil, Mariana Orozco, Marcia Campillo, Isis Gallegos, Edith Marcial, Elisa Cruz, Juan Carlos Yam, Noni Beristain, Aleida Núñez, Gloria Rodríguez, Bibiana Ruíz, Carlos Mier, Erica Burgueño, Erika Méndez por dejarme trabajar con ustedes y compartir todos esos momentos buenos y malos y por dejarme aprender de ustedes.

Agradezco a las personas que indirectamente me han apoyado cada momento y creen en mi y me motivan a seguir hacia adelante. José Alberto Martínez, por ser un amigo fiel, un gran maestro y un verdadero caballero capaz de amar y compartirse y porque me ha enseñado a escuchar a mi corazón y por su gran confianza y su humildad hacia mi. A Cynthia Navarro por ser mi mejor amiga mujer, por ser una gran confidente y una persona que llena de luz cada uno de mis días. Porque nunca me ha abandonado y porque me ha enseñado a luchar, a creer y a ser fuerte. A Berenice Pérez por ser la mejor persona del mundo mundial. Por ser una persona humilde pero con un gran corazón y una verdadera amiga que sabe estar en las buenas y en las malas, a enseñarme que la vida es tan efímera que debemos dejar el corazón en lo que hacemos. A Mahiomy López por enseñarme a ser amorosa y por ser una gran amiga que me hace reír, por demostrarme que cuando las personas son bellas por dentro, logran reunirse con otras que nos hacen mejorar y crecer.

A Alinna Ruíz y Alejandra Rivera por seguir siendo mis amigas y compartir mis momentos buenos y malos. Por su tiempo y por su gran confianza en mi. A Estefanía Gómez por ser una verdadera luz que me ha enseñado a ser disciplinada, por enseñarme que el talento no es suficiente para lograr metas, sino que es necesario trabajar, por mostrarme que el amor es el motor que mueve el mundo y que siendo fuertes y amorosos con nuestro arte podemos ser felices a pesar de ir en contra de la corriente.

A Fidartes y todos sus profesores: Christopher Hernández, José Pescina, Pamela Salinas, Ivonne Barbosa, Estefanía Gómez, Isaac Rodríguez y Ernesto Bernal. Cada uno ha influido tan positivamente en mi vida que me han enseñado la pasión, la entrega, la humildad, la disciplina, el amor, la gentileza y el respeto por el arte. Porque estas enseñanzas me permitieron encontrar mi verdadera vocación en la ciencia. Porque cada uno ha compartido su tiempo conmigo y sus enseñanzas por ese amor al arte.

A mis queridas Mujercitas que me han motivado desde que las conocí y que siendo tan jovencitas me han enseñado a ser apasionadas y a emocionarme con pequeñas-grandes cosas de la vida y estar las siete siempre juntas hasta el fin. En cada una de ustedes he aprendido a que todo puede ser SENSACIONAL: Edna Jaramillo, Yova Porras, Lau Gonzalez, Maik Vázquez, Pao Pimentel y Danna Cabrera, las quiero mucho.

Gracias nuevamente por todo, por hacerme cada día una mejor persona y gracias por acompañarnos en este pedacito de nuestros caminos por la vida.

ÍNDICE

Abreviaturas	12
Resumen	14
Abstract	16
1. Introducción	18
• <i>1.1 Generalidades del sistema inmune</i>	18
• <i>1.2 Sistema inmune innato</i>	18
• <i>Células del sistema inmune innato</i>	19
• <i>1.3 Sistema inmune adaptativo</i>	25
• <i>1.4 Sistema inmune de mucosas</i>	26
• <i>1.5 Estructura de las vías respiratorias</i>	27
• <i>1.6 Inmunidad de mucosas en el sistema respiratorio</i>	28
• <i>Inmunidad innata en las vías respiratorias</i>	28
• <i>Inmunidad adaptativa en las vías respiratorias</i>	29
• <i>1.7 Reacciones de hipersensibilidad</i>	30
• <i>1.8 Asma. Definición</i>	32
• <i>a)Epidemiología y generalidades del asma</i>	32
• <i>b) Factores genéticos asociados al asma</i>	33
• <i>c) Eventos importantes durante la alergia pulmonar</i>	34
• <i>1.9 Las quimiocinas y sus receptores</i>	35
• <i>1.9.1Las quimiocinas y su asociación con el asma</i>	36
2. Antecedentes	38
• <i>2.1 CCR9 y CCL25. Características genéticas y moleculares</i>	38
• <i>2.2 Expresión de CCR9 en homeostásis y enfermedad</i>	38
3. Planteamiento del problema	42
4. Hipótesis	42
5. Objetivo general	43
6. Objetivos específico	43
7. Metodología experimental	44

• 7.1 Genotipificación de ratones CCR9 -/-	44
• 7.2 Modelo agudo de inflamación alérgica pulmonar	45
• 7.3 Obtención y preparación de células para el análisis	45
• 7.4 Análisis histológico en tejido pulmonar	46
• 7.5 Análisis inmunohistoquímico	47
• 7.6 Ensayo de quimiotaxis	47
• 7.7 Conteo total y diferencial de células en lavados broncoalveolares	48
• 7.8 Ensayo enzimático para la detección de EPO en LBAs	48
• 7.9 Detección de IgE específica para OVA en suero	49
• 7.10 Detección de CCL25 en LBAs por ELISA	50
• 7.11 Análisis de las distintas poblaciones celulares por citometría de flujo (FACS)	51
• 7.12 Extracción de ARN de tejido pulmonar	51
• 7.13 Síntesis de cADN	52
• 7.14 RT-PCR semicuantitativa	53
• 7.15 RT-PCR en tiempo real	53
• 7.16 Análisis estadístico	54
8. Resultados	55
• 8.1 Validación del modelo de alergia pulmonar por OVA en ratones deficientes de CCR9	55
• a) Determinación de EPO, cuantificación de células en LBA y cuantificación de IgE en suero	55
• b) Análisis morfológico del proceso inflamatorio en pulmón en ausencia de CCR9	57
• 8.2 Evaluación de la actividad quimiotáctica de CCL25 en células provenientes de LBA	59
• 8.3 Análisis de la expresión de CCR9 a 6, 24, 48 horas después del último reto con OVA	60
• 8.4 Análisis de la expresión de CCL25 a 6, 24, 48 horas después del último reto con OVA	61
• 8.5 Análisis de la producción de CCL25 en tejido pulmonar y en LBA	62
• 8.6 Determinación de la expresión de mediadores proinflamatorios importantes durante la inflamación alérgica pulmonar.	65
• 8.6.1 Incremento de mRNA de CCR3, CCL11, IL-5 e IL-10	66
• 8.6.2 Expresión de citocinas proinflamatorias en LBA a diferentes tiempos de la inflamación alérgica pulmonar	66

• 8.7 Caracterización de las subpoblaciones celulares en lavados broncoalveolares a 6, 24, 48 horas después del estímulo con OVA	70
• 8.7.1 Caracterización de los eosinófilos CCR9+	70
• 8.7.2 Caracterización de los linfocitos T CCR9+	75
• 8.7.3 Determinación de las células CD11c+ MHCII+	79
9. Discusión	81
10. Conclusiones	88
11. Perspectivas	89
Apéndice 1	90
Apéndice 2	91
Apéndice 3	93
12. Referencias bibliográficas	95
13. Artículo publicado resultado de la investigación	104

ABREVIATURAS

1. **ADN** Ácido desoxirribonucleico
2. **ARN** Ácido ribonucleico
3. **Alum** Emulsión de hidróxido de aluminio y magnesio
4. **BCR** Receptor de linfocitos B
5. **CCR** Receptor de quimiocinas de la familia CC
6. **CPA** Célula presentadora de antígenos
7. **CXCR** Receptor de quimiocinas de la familia CXC
8. **cADN** Ácido desoxirribonucleico complementario
9. **DEPC** Dietilpirocarbonato
10. **EDTA** Ácido etilendiamino tetra acético
11. **FACS** Citómetro de flujo
12. **ELISA** Inmunoensayo ligado a enzima
13. **HBSS** Solución salina balanceada de Hanks
14. **HE** Hematoxilina/eosina
15. **HRP** Peroxidasa de rábano
16. **IAP** Inflamación alérgica pulmonar
17. **ILC** Célula linfoide innata
18. **LBA** Lavados broncoalveolares
19. **LTC4** Leucotrieno
20. **M-MLVRT** Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina-Moloney
21. **NKT** Células T que comparten características funcionales con las células “asesinas naturales”
22. **OVA** Proteína ovoalbúmina
23. **PAS** Ácido peryódico de Schiff
24. **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
25. **PGE2** Prostaglandina E2
26. **PRR** Receptores de reconocimiento de patrón
27. **RT PCR** Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa

28. SFB	Suero fetal bovino
29. TAE	Solución de tris-acetato EDTA
30. Taq	Enzima Taq polimerasa
31. TGF-β	Factor transformante de crecimiento beta
32. TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
33. TCR	Receptor de linfocito T
34. TSLP	Citocina linfopoyetina estromal tímica
35. TLR	Receptor tipo "Toll"

RESUMEN

El reclutamiento de células inflamatorias, es uno de los principales eventos que se llevan a cabo en la inflamación alérgica pulmonar. Las quimiocinas y sus receptores, son moléculas reguladoras de la inflamación tipo Th2, induciendo el reclutamiento y la activación de macrófagos, neutrófilos, células cebadas, basófilos, ILCs (células linfoides innatas), células iNKT (células T “asesinas naturales” de cadena invariante) y principalmente eosinófilos y subtipos de linfocitos T.

El receptor de quimiocinas CCR9, es un modulador crucial en el reclutamiento de células a intestino delgado en condiciones homeostáticas e inflamatorias. También se ha descrito a CCR9 como un regulador muy importante durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo. También, CCR9 es indispensable para la regulación del proceso inflamatorio en colon. Se conoce la regulación de otros receptores durante el asma, como CCR3, CCR4 y CCR8 y en el caso de CCR9 y su ligando y su papel en la inflamación pulmonar, no son claros aún. Nuestro objetivo es analizar la expresión de CCR9 durante el asma y su papel modulador del proceso inflamatorio en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.

En un modelo experimental de inflamación alérgica pulmonar, el análisis por RT-PCR demuestra que la expresión de CCR9 se induce en pulmón 6 horas después del reto con OVA y se incrementa a las 24h. Lo mismo ocurre en el caso del ligando CCL25, el cual, de acuerdo al análisis inmunohistoquímico es mayoritariamente producido por las células epiteliales. En los ratones CCR9 $-/-$, disminuye el infiltrado celular analizado en los lavados broncoalveolares (LBA) y cuantificado mediante análisis histológico y citometría de flujo. La determinación de citocinas involucradas en LBA o por RT-PCR de tejido pulmonar, indica que en ausencia de CCR9, desde las 6 horas y hasta las 24 horas, existe una disminución en la producción de aquellas que reclutan eosinófilos y linfocitos T, lo cual sugiere que la ausencia de CCR9 contribuye a disminuir la infiltración de eosinófilos y linfocitos T en el pulmón.

Finalmente, el análisis por citometría demuestra que en ausencia de CCR9, existe menor número en el porcentaje de linfocitos T CD4+, CD8+ y eosinófilos; sin embargo, la mayor expresión de CCR9 en los eosinófilos se observa en etapas tempranas (2-6 horas) y en los linfocitos T, el receptor se expresa en estas células solamente en etapas posteriores (48 horas).

Por otro lado, al analizar a las células CD11c+ MHCII+, se observó una disminución significativa de estas células en los ratones deficientes de CCR9.

En conjunto, estos resultados indican que la expresión de CCR9 y CCL25 es inducible en el pulmón durante la inflamación alérgica pulmonar y contribuyen al conocimiento de los mecanismos involucrados en la esta inflamación, los cuales puedan proponer alternativas terapéuticas para controlar la enfermedad. De tal manera que la contribución de este trabajo, es el aportar mecanismos de regulación ejercidos por el receptor CCR9 en etapa temprana de la inflamación en pulmón y en la cual, la expresión de este receptor de quimiocinas, que no había sido previamente analizado ni caracterizado en pulmón, tiene un impacto específico en poblaciones celulares determinantes en la inflamación pulmonar.

ABSTRACT

Airway inflammation is the most common hallmark of allergic asthma. The study of the mechanisms underlying the inflammatory microenvironment, is important to understand the role of cells involved in the pathology and to suggest novel therapeutic targets. Chemokines and their receptors, which are involved in leukocyte recruitment, are closely related to the pathology in asthma inducing exacerbated recruitment and activation of macrophages, neutrophils, mast cells, basophils, iNKT cells, eosinophils and T lymphocytes.

Chemokine receptor CCR9 has been described as an homeostatic and an inflammatory chemokine receptor, which regulates cell migration in the gut. Moreover, it has been implicated in thymocytes differentiation during T cell ontogeny. The expression of CCR9 and its unique ligand (CCL25) in airways in inflammation *in vivo* is unclear. To analyse CCR9 as a modulator of an inflammatory process in lungs during airway inflammation, we established an OVA-induced inflammation model in CCR9-deficient mice.

Here, we report that in a lung inflammation model in mice, CCR9 and its ligand CCL25 are expressed in eosinophils and T-lymphocytes as early as 6 hours post-OVA challenge. Moreover, in OVA/Alum-challenged CCR9-deficient mice, we observed impaired cell recruitment at peribronchial and perivenular levels. OVA-administration in CCR9-deficient mice, leads diminished inflammatory cell recruitment, which modifies the expression of IL-10, CCL11 and CCL25 at 24 hours post-OVA challenge. However, the secretion of IL-4 and IL-5 were not affected in CCR9-deficient mice compared to WT mice. Surprisingly, our data suggest that CCR9 expression is important for cell recruitment as early as the first 2 hours after OVA-treatment.

We determined that eosinophils and T-lymphocytes depend on CCR9 expression to migrate to the lungs, as seen by LBA flow cytometry at 6 and 48 hours, respectively.

On the other hand, the analysis of MHCII⁺ CD11c⁺ cells, reflected that these cells are severely impaired following 2 hours of OVA administration in absence of CCR9.

Taken together, these results show that CCR9 and CCL25 expression could be induced in lungs under inflammatory conditions and this upregulation has an important role, modulating eosinophils and lymphocytes recruitment at the initial stage of the inflammatory process induced by OVA with Alum.

The contribution of this work is to suggest new mechanisms of the regulation of CCR9 during the early phase of inflammation in lung and the receptor expression that has not been analysed kinetically nor characterized in lung. Thus, this work has a specific impact in specific cell populations, which are crucial in lung inflammation development.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del sistema inmune.

Los seres vivos se encuentran en interacción constante con el medio ambiente. Esta exposición continua, en muchas ocasiones, compromete la homeostasis de los sistemas vivos.

En los mamíferos, el contacto con microorganismos patógenos, no patógenos o moléculas externas provenientes de éstos, perturba esta homeostasis. La consecuencia de esta invasión, es la activación de mecanismos biológicos que culminan en el reconocimiento y erradicación del organismo de estos agentes externos [1].

El conjunto de mecanismos moleculares y celulares encargado de este reconocimiento es el sistema inmune. Un requisito indispensable para la activación de los elementos del sistema inmune es el reconocimiento de secuencias específicas presentes en los microorganismos o sus componentes derivados. Para su estudio, el sistema inmune se divide en: Sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo [2].

1.2 Sistema inmune innato

Las primeras líneas de defensa en los mamíferos, son las barreras físicas, químicas y enzimáticas. Sin embargo, las moléculas que no pertenecen al hospedero, poseen patrones moleculares asociados a estos microorganismos (MAMPs). Estas moléculas, pueden ser reconocidas por receptores específicos -no clonales-, que se encuentran expresados en las células presentes en estas barreras o son reclutadas al sitio del daño [3]. Las células que se incluyen en el sistema inmune innato son: neutrófilos, basófilos, monocitos/macrófagos, células cebadas, eosinófilos, asesinas naturales (NK), las células linfoides innatas (ILC) y las células dendríticas [3].

Células del sistema inmune innato.

Las células de la inmunidad innata se encargan del reconocimiento primario en las áreas de mayor contacto antigénico. Estas células son responsables de detectar las moléculas expresadas por los microorganismos y de realizar funciones específicas que induzcan a la erradicación de ese microorganismo o de volver al estado de homeostasis. A continuación se describen algunas de estas células y sus funciones:

Basófilos: Son células que corresponden al 1% de leucocitos en circulación sanguínea y se encuentran presentes en todos los vertebrados. Es posible distinguir a estas células histoquímicamente, debido a que como su nombre lo indica, poseen gránulos afines a colorantes básicos. Por otro lado, la activación de estas células es mediada por el entrecruzamiento de la IgE a través de su reconocimiento por los receptores FcεRI de alta afinidad. Por estas características y por su incremento en los tejidos en infecciones helmínticas, se ha asociado a éstas con las células cebadas [4]; sin embargo, los basófilos son células cuyo origen hematopoyético que no maduran en el tejido conectivo sino en la médula ósea y su vida media es de 4-6 días. Además de activarse a través del entrecruzamiento de la IgE, los basófilos se encargan de liberar el contenido de sus gránulos, el cual está constituido principalmente por mediadores como prostaglandinas, leucotrienos e histamina [4, 5]. El fenotipo de estas células se caracteriza por la expresión de CD11b, CD11c, CCR2, CCR3, FcεRI, CD35, CD88, IL-3R, IL-5R, GM-SCF-R principalmente [6]. Actualmente no se conoce a detalle la función fisiológica de estas células; sin embargo están muy relacionadas con procesos patológicos de alergia e hipersensibilidad por la secreción de citocinas tipo Th2 estas células se encuentran incrementadas en pacientes con asma [5].

Neutrófilos: Son los leucocitos más abundantes en la circulación sanguínea. Deben su nombre a los gránulos azurófilos que contienen en su citoplasma. Estas células polimorfonucleares son reclutadas al sitio de inflamación mediante diapédesis, que es el proceso a través del cual, estas células ingresan a los tejidos atravesando las células endoteliales y regulan las primeras etapas de la inflamación mediante fagocitosis,

liberación de moléculas citotóxicas, estallido respiratorio y degradación de microorganismos mediante péptidos antimicrobianos y otras moléculas microbicidas como las especies reactivas de oxígeno [7]. Además, en condiciones infecciosas e inflamatorias, son capaces de liberar redes extracelulares de ADN (NETs por sus siglas en inglés). Después del estímulo inflamatorio, el endotelio y el epitelio secretan moléculas de complemento, citocinas y quimiocinas que activan a estos neutrófilos e inducen su reclutamiento, tal es el caso de C5a, IL-1 y CXCL8 respectivamente. En ciertas situaciones neoplásicas son la fuente principal de mediadores inflamatorios y metaloproteinasas. [7, 8].

Macrófagos. Son células mononucleares cuya función principal es la fagocitosis y la inducción de muerte de los microorganismos. Se encuentran en la circulación sanguínea en estado inmaduro como monocitos y concluyen su maduración en los tejidos. En tejido, reciben diferentes nombres dependiendo del sitio en el que se encuentran. Los ejemplos características de esto son las células de Kupffer (hígado), microglía (sistema nervioso central) y macrófagos alveolares (tejido pulmonar). Se encargan de ingerir y destruir no solo microorganismos, sino células senescentes y también son encargados de secretar citocinas inmunorregulatorias que favorecen el proceso inflamatorio, su resolución y la reparación del tejido. Los procesos que regulan pueden ser infecciones con microorganismos intracelulares, procesos neoplásicos y enfermedades autoinmunes. En el caso de los pacientes alérgicos, la activación de estos macrófagos es alternativa y se les llama macrófagos M2, debido a que contribuyen a la reparación de tejidos mediante la secreción de citocinas tipo T2 [9, 10]. Es indispensable la activación de estos macrófagos para que combatan infecciones bacterianas y virales. La activación de los macrófagos conlleva a la secreción de citocinas y la fagocitosis de las células infectadas o cancerosas. Debido a que las funciones de los macrófagos son heterogéneas, existen macrófagos responsables de inducir tolerancia. Estos macrófagos presentan un fenotipo M2, lo que significa que producen citocinas como IL-4 e IL-10 que inducen un microambiente tolerogénico.

Eosinófilos. Estas células se consideran diferenciadas completamente. Morfológicamente, son células de núcleo bilobulado o multilobulado (en ratón o humano respectivamente). Contienen gránulos acidófilos en su citoplasma. Estas células tienen una vida media de 4-5 días. Su proceso de diferenciación y maduración lo concluyen en la médula ósea y de ahí salen a la circulación periférica para llegar los diferentes tejidos; sin embargo, el porcentaje de estas células en condiciones normales no rebasa el 4% en circulación sanguínea y en los diferentes tejidos cumplen funciones más relacionadas con la tolerancia o la inmunovigilancia [11]. Específicamente, en el caso del bazo y del intestino, estas células llegan en condiciones normales y residen la mayor parte de su vida media. Sin embargo, la función principal de estas células, es contribuir a la regulación de eventos inflamatorios, infecciosos e incluso neoplásicos.

La activación de los eosinófilos es inducida principalmente por IL-5 y su migración por las es mediada por las quimiocinas CCL11 (eotaxina), CCL5 y CCL3.

La función natural de estas células es combatir las infecciones helmínticas, aunque también tienen un papel importante en regulación de etapas reproductivas femeninas. De manera normal, estas células se localizan en el tracto reproductivo y el mayor número se alcanza durante el estro. Se localizan primordialmente en el estroma endometrial subyacente a la glándula luminal y al epitelio glandular.

Como se menciona previamente, estas células cumplen gran parte de sus funciones mediante la liberación del contenido de sus gránulos citoplasmáticos. Estos gránulos son los principales reservorios de citocinas inflamatorias. Se ha visto que el proceso de degranulación es bastante selectivo y regulado, de tal manera que dependiendo del estímulo que reciban, serán las citocinas liberadas al microambiente inflamatorio [11, 12]. El contenido de estos gránulos está formado mayoritariamente por citocinas acidófilas con naturaleza citotóxica. Estas proteínas son: proteína básica principal (MBP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y la proteína catiónica de eosinófilos (ECP) [12]. El contenido molecular de estos gránulos es muy variado. En la **figura 1** se muestra un esquema en donde se representan todas las moléculas expresadas por los eosinófilos y su localización. Las cuales contribuyen a las funciones descritas en este apartado. (**Fig. 1**).

Los mecanismos que permiten la migración de estas células hacia distintos sitios, depende de cada tejido; sin embargo, la expresión de CCR3, CCR5 y la expresión de algunas integrinas, es indispensable para la salida de estas células de la médula ósea hacia la circulación [13].

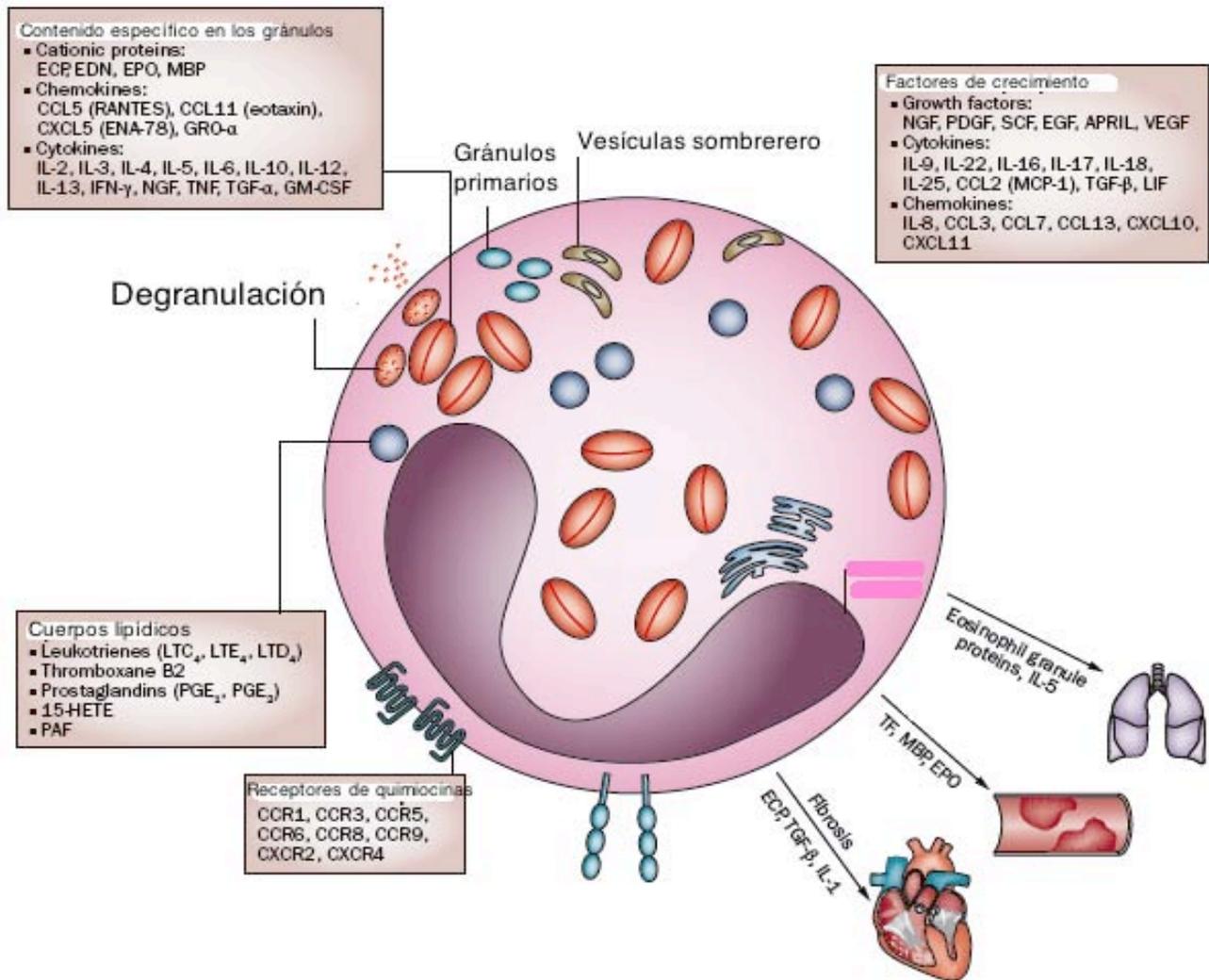


Figura 1. Características de los eosinófilos. En el esquema se indican las moléculas que son almacenadas en los gránulos y otros compartimentos intracelulares y en membrana de los eosinófilos. Modificado de *Khoury P. 2014. Nat. Rev Rheumatol.*[13]

Células linfoides innatas (ILCs). Se consideran parte del sistema inmune innato por sus funciones moduladoras de otras células y porque no poseen especificidad clonal; sin embargo, morfológicamente son semejantes a los linfocitos. Estas células se comunican con una gran variedad de células para regular inflamación, inmunidad y homeostasis de múltiples organismos [14].

Las ILCs son reguladas por una gran variedad de factores solubles provenientes de otras células, tales como alarminas, neuropéptidos, hormonas, eicosanoides y citocinas. Por su localización, estas células se pueden clasificar en tres grandes grupos: ILC1, ILC2 e ILC3 [15] de acuerdo a las citocinas que producen y a las funciones que realizan. Las células con características de ILC2, se describieron en 2010 como células no B ni T, que se expanden en respuesta a la administración de IL-25 [16] y fueron asociadas a la respuesta tipo Th2 y al incremento en los niveles de IgE. Además se ha descrito que producen grandes niveles de IL-5, IL-9 e IL-13. Aunque la administración de IL-25 permitió el descubrimiento de estas células, son mucho más responsivas hacia IL-33, citocina que además de expandirlas, las activa. Por lo cual, la asociación de estas células con la patogénesis del asma, se ha descrito muy recientemente y se sabe son indispensables para el desarrollo de la hiperreactividad e inflamación [17].

Células cebadas. A pesar de que estas células son consideradas como las principales mediadoras de las etapas tempranas en las reacciones alérgicas, actualmente se les han descrito otras funciones fisiológicas. La morfología de estas células revela que son mononucleadas y que contienen una gran cantidad de gránulos en su citoplasma, afines a colorantes histoquímicos como el azul de Toluidina [18].

El contenido de estos gránulos en su mayoría corresponde a gran cantidad de mediadores como histamina, prostaglandinas como la PGE2, leucotrienos como el LTC4, y diversas citocinas proinflamatorias. La vía clásica de activación de estas células es el entrecruzamiento del receptor FcεRI por las IgE reconociendo sus antígenos y para las cuales, estos receptores que expresan poseen una alta afinidad.

El análisis detallado del contenido granular, indica que las enzimas triptasa y quimasa, contenidas en estos gránulos varían dependiendo del tipo de célula cebada, es decir, el

sitio anatómico en dónde ésta se encuentra. Otro mecanismo regulador de la activación de estas células son las citocinas como IL-3, IL-4, TSLP, SCF, CCL3 e incluso la activación de algunos TLRs como TLR2 y TLR4. [18, 19].

Células dendríticas. Por sus características funcionales, se considera que estas células son el puente de unión entre la inmunidad innata y adaptativa. Las células dendríticas son células mononucleares que se diferencian en médula ósea y aunque el origen de estas células es heterogéneo, pueden provenir de precursores de monocitos o de precursores propios [20]. Estas células poseen gran actividad fagocítica cuando son inmaduras y se encuentran en prácticamente todo el organismo como centinelas. Cuando estas células se encuentran con partículas que reconocen como extrañas, estas células se encargan de activarlas, fagocitarlas, procesarlas, producir varios péptidos a partir de un solo microorganismo, viajar al órgano linfóide secundario más cercano y presentarlo a los linfocitos T para inducir una respuesta inmune [21].

Por otro lado, es muy importante mencionar, que en algunos tejidos, también se les conoce por su mayor papel como inductoras de tolerancia, ya que en ciertas condiciones, son capaces de llegar a un estado de semi-maduración y por lo tanto, inducir tolerancia en los linfocitos T, al no expresar moléculas de coestimulación o a ellas mismas a través de la secreción de citocinas como IL-6 e IL-12 [22].

Existen varias clasificaciones de las células dendríticas. De acuerdo a su función, se clasifican en células dendríticas convencionales, las células residentes de tejido, las células CD11b+, las células dendríticas foliculares y las células dendríticas plasmacitoides, las cuales comparten características morfológicas similares a las células plasmáticas [2, 22] pero que poseen función de secreción de citocinas más que de presentación antigénica.

1.3 Sistema inmune adaptativo.

Las células del sistema inmune adaptativo dependen de la especificidad clonal. Esta especificidad está dada por los receptores para antígenos expresados en la membrana

de los linfocitos T y B. Estos linfocitos T y B se encuentran en los órganos linfoides secundarios.

Los linfocitos T son células cuyo núcleo ocupa casi todo el citoplasma. Se caracterizan por la expresión del receptor de linfocitos T (TCR), el cual es rearrreglado durante su maduración en el timo y posteriormente estos linfocitos emigran a la periferia a residir principalmente en los órganos linfoides secundarios. Estos linfocitos son encargados de responder a segmentos peptídicos de cierto tamaño. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen péptidos de 13-16 aminoácidos a través del MHC-II expresando por las células presentadoras de antígenos (CPA) y los linfocitos T CD8⁺, que reconocen péptidos de 8-10 aminoácidos a través del MHC-I expresado por las CPA. Este reconocimiento les permite expandirse de manera antígeno-específica, proliferar y secretar citocinas cooperadoras que favorecen las funciones de las células del sistema inmune innato y de colaborar a la diferenciación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos.

Por su parte los linfocitos B, son células que se diferencian en la médula ósea y poseen el receptor de linfocitos B (BCR). Son capaces de reconocer la conformación espacial de los antígenos y responder hacia ellos madurando la afinidad y secretando citocinas e inmunoglobulinas antígeno-específicas. La comunicación entre estas células y las de la inmunidad innata, dependen de las células presentadoras de antígenos, las cuales pueden transportar a los antígenos hacia los órganos linfoides secundarios [2, 23]. Los péptidos derivados de patógenos intracelulares, son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I a los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) cuyo blanco son células infectadas o tumorales. Los péptidos de moléculas extracelulares o provenientes de vesículas intracelulares, son acarreadas a la superficie celular por el MHC clase II y presentado a las células TCD4⁺ [24]. Estas células pueden diferenciarse a células efectoras tipo Th1, Th2, Th3, Th9, Th17, Tfh, Th22, Th35 o T reguladoras (Treg).

- Las células efectoras tipo Th1 activan a los macrófagos e inducen la producción de anticuerpos clase IgG por la secreción de IFN- γ y TNF- α , y favorecen el cambio de isotipo a IgG2a en ratón y IgG1 e IgG3 en humano. Algunos receptores de quimiocinas relacionados con estas células son CCR5, CCR1, CCR2 y CXCR3. [25].

- Las células Th2 inician la respuesta humoral activando a las células B antígeno-específicas para producir anticuerpos tipo IgG, IgA, IgE por la producción de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, estas citocinas favorecen el cambio de isotipo hacia inmunoglobulinas de la clase IgE e IgG1 en ratón e IgG4 e IgE en humano. Los linfocitos Th2 expresan diferencialmente receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 y CCR8 [25]. Se relacionan principalmente con la activación de linfocitos B y el desarrollo de respuesta humoral protectora contra patógenos extracelulares y respuestas alérgicas, esta subpoblación se caracteriza por la secreción de: IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 [25].
- Los linfocitos Th9 han sido descritos recientemente como células que pueden ser inducidas por la IL-4 pero además el TGF- β . Son grandes productoras de IL-9 e IL-22. La inducción de estas células depende en gran parte de la coestimulación a través de CD28. Se ha analizado su participación ante infecciones parasitarias y la más reciente, procesos autoinmunes, en alérgicas y cáncer y aunque producen IL-10, se ha determinado que estas células tienen una función proinflamatoria [26].
- La inducción de linfocitos Th22 depende de la producción de TNF- α e IL-6. Producen grandes cantidades de IL-22 y expresan AHR (receptor de aril-hidrocarburos). Se han relacionado con la homeostasis y también la inflamación en piel [27].
- Los linfocitos Th17 favorecen procesos inflamatorios. Son inducidas por IL-6 y TGF- β (en ratón) y por IL-1 e IL-23 (en humanos). Estas células producen IL-17, la cual promueve la producción de otras citocinas como IL-6, IL-8, GM-CSF y CCL2 en fibroblastos, células epiteliales y endoteliales. La función de esta subpoblación de linfocitos se ha relacionado con procesos de autoinmunidad, o ante infecciones por hongos y algunas bacterias intracelulares y se distinguen por la expresión del factor de transcripción ROR γ t [28, 29].
- Las células T reguladoras se conocen por su capacidad de regular la activación y la función de otros linfocitos T. Estas pueden ser generadas en el timo (T reguladoras naturales) o en la periferia (T reguladoras inducidas). El fenotipo de las células reguladoras naturales (n-Tregs), es la expresión de CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ [30, 31].

- La otra subpoblación de células reguladoras denominadas Treg1 (CD4+ CD25-), adquieren el fenotipo regulador en periferia, debido a la estimulación por IL-10, citocina que posteriormente producen ellas mismas, además del TGF- β , a diferencia de las células T reguladoras naturales o inducidas, aunque producen grandes cantidades de IL-10, estas células carecen de la expresión de FoxP3 [32].
- Otra subpoblación de células reguladoras que se conocen son los linfocitos Th3, pueden ser inducidas también por IL-27; sin embargo la activación mediante IL-27 también puede diferenciar otras subpoblaciones de linfocitos T. estas células se caracterizan por la producción de TGF- β , y al igual que las células Treg1 son importantes para mantener la tolerancia hacia antígenos orales [30].
- Los linfocitos Th35, son una subpoblación de células T reguladoras que ejercen la actividad inmunosupresora a través de IL-35 y no IL-10 ni TGF- β . Además estas células son FoxP3- y su diferenciación depende de otras poblaciones de células T reguladoras [33].

1.4 Sistema inmune de mucosas

La mucosa pulmonar e intestinal es la superficie epitelial más grande en los mamíferos. Son los sitios en los cuales el sistema inmune normalmente se expone a los microorganismos. El epitelio de mucosas en un adulto humano, cubre aproximadamente 400 m² [34]. Como en estos sitios, la comunicación con el medio ambiente externo es continua, la discriminación entre lo peligroso y lo inofensivo es de vital importancia para el organismo. Por tanto, los mecanismos de tolerancia son los más importantes en estos sitios. El sistema inmune de mucosas es uno de los sitios en donde puede ocurrir la activación de linfocitos, incluyendo células plasmáticas productoras de IgA, linfocitos B y T de memoria, efectores y linfocitos T $\gamma\delta$, a estos sitios se les llama tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

En el caso de la mucosa pulmonar, el BALT (Tejido linfoide asociado a bronquios), puede inducirse mientras se monta una respuesta inmune. El BALT se conforma por elementos linfoides que se pueden dividir morfológica y funcionalmente en dos partes: La mucosa organizada asociada al tejido linfoide (que consiste en folículos linfoides, los cuales son

responsable de la fase de inducción y el tejido linfoide difuso), el cual comprende a los leucocitos distribuidos a lo largo del epitelio y en la lámina propia pulmonar [34, 35]. La localización de estas células está regulada por la expresión de los receptores de quimiocinas CCR6, CCR9 y CCR10. Los cuales son cruciales para esta migración y para su localización en el tejido [36].

1.5 Estructura de las vías respiratorias.

La principal función fisiológica de las vías respiratorias es el intercambio gaseoso de CO₂ a O₂ en los capilares alveolares que se describirán de manera más profunda a continuación.

Después de su acceso por la nariz o boca, el aire entra a la faringe, laringe y llega al árbol bronquial. Ingresando por la tráquea, el aire atraviesa por a menos 10 o hasta 23 generaciones de bronquios antes de llegar a los alveolos, que es el sitio anatómico donde ocurre el intercambio gaseoso [37]. Las primeras 16 ramificaciones corresponden a la zona conductora, en la cual no hay alveolos y por tanto, son anatómicamente incapaces de realizar intercambio gaseoso. Los alveolos comienzan a observarse desde la ramificación 17 y hasta la generación 19, en los bronquiolos respiratorios, los cuales constituyen la zona transicional. La generación 20 y hasta la 22 están completamente delineadas por alveolos. Estos ductos alveolares y sacos alveolares corresponden a la zona respiratoria [37].

Los bronquiolos también tienen alveolos. Cada bronquiolo respiratorio se ramifica en al menos 100 ductos alveolares y 2000 sacos alveolares en el pulmón adulto. La unidad respiratoria, conocida como *acinus*, contiene 10 a 12 de estas ramificaciones.

La entidad alveolo-capilar, es el sitio de intercambio gaseoso en el pulmón. De estos alveolos, se considera que existen alrededor de 300 millones en el adulto y están prácticamente cubiertos de vénulas capilares.

Deben existir al menos 280 billones de estas vénulas, aproximadamente 500 a 1000 capilares por cada alveolo. Se calcula que aproximadamente existen 50 a 100 m² de área disponible para intercambio gaseoso por difusión. Estos alveolos son aproximadamente de 200 a 250 µm de diámetro en el humano [37].

1.6 Inmunidad de mucosas en el sistema respiratorio

Como se menciona en el apartado anterior, la función primordial de este sistema respiratorio, es el intercambio gaseoso. El cual consiste en la salida de dióxido de carbono e ingreso de oxígeno molecular, el cual es acarreado a todas las células del organismo. Por este contacto estrecho con las partículas y microorganismos ambientales, una función vital para los sistemas vivos, es mantener la barrera hacia estos microorganismos y partículas que puedan ser dañinas para las demás células. La inhalación de aire, expone a esta mucosa a una gran variedad de antígenos y sustancias que comprometen la integridad de este sistema.

Por otro lado, la microbiota de las vías aéreas, la cual está en proceso de ser caracterizada; se ha definido que es un poco menos densa y diversa que en intestino y además, las vías aéreas inferiores son prácticamente estériles. Pero, e manera similar que en intestino, el sistema inmune de mucosas en el pulmón ha evolucionado de tal manera que se pueda mantener una regulación exquisita entre la protección inducida y los mecanismos de tolerancia que eviten se activen respuestas nocivas en el pulmón. Las fallas del sistema inmune para mantener este balance puede dar lugar a infecciones o procesos inflamatorios excesivos y son de las causas principales de morbilidad y mortalidad en todo el mundo [23].

Inmunidad innata en las vías respiratorias

El epitelio de la mucosa respiratoria pulmonar es columnar, ciliado y pseudoestratificado y comprende las fosas nasales, faringe y árbol bronquial. Estas células llevan a cabo funciones de barrera similares al epitelio intestinal, ya que expresa moléculas de unión estrecha, moco, defensinas y catelicidinas. El moco en las vías aéreas captura sustancias externas como microorganismos y los cilios epiteliales se encargan de mover este moco hacia fuera con todo su contenido capturado.

La importancia de estas sustancias secretadas como parte de la defensa innata, pueden comprenderse mejor en pacientes con deficiencia en la producción de estos péptidos antimicrobianos o con deficiencias en el movimiento ciliar, en los cuales, el incremento de

infecciones u otros procesos patológicos se asocia a otros padecimientos como la fibrosis quística [37].

Los macrófagos alveolares representan la mayoría de células dentro de los espacios alveolares. Estas células se comportan diferente de otros macrófagos tisulares. Expresan IL-10, óxido nítrico, TGF- β y poseen baja capacidad fagocítica a comparación de los macrófagos en el bazo o hígado. Los macrófagos alveolares inhiben las respuestas de linfocitos T y la función presentadora de antígenos de las células dendríticas CD103+.

Cuando algún microorganismo es capturado, las células dendríticas y los macrófagos alveolares, se encargan de capturar los componentes microbianos y contribuir a la respuesta mediante la secreción de citocinas y quimiocinas que mantienen esta respuesta hasta que estos microorganismos son erradicados. La activación de los PRRs, contribuye a la inducción de respuesta adaptativa a través de la maduración de estas células presentadoras de antígenos y la coestimulación a los linfocitos T.

Los mediadores inflamatorios reclutan células del sistema inmune innato, incluyendo: neutrófilos y células NK, las cuales tienen la habilidad de inducir citotoxicidad en células infectadas por mecanismos dependientes de FasL o perforina-granzima [37].

Inmunidad adaptativa en las vías respiratorias.

Los mecanismos que previenen respuestas exacerbadas en el pulmón hacia antígenos ambientales, son: La expresión de CD200 como molécula señal de no fagocitosis, la mucina MUC-1 y proteínas surfactantes, así como una expresión baja de TLRs.

La inmunidad protectora en la mucosas respiratoria es predominantemente IgA, aunque en menos proporción que en mucosa intestinal. Esta inmunoglobulina tiene un papel muy importante en las vías aéreas superiores, ya que los sitios anatómicos en donde se lleva a cabo la activación de linfocitos B vírgenes, su diferenciación y el cambio de isotipo hacia IgA ocurren mayoritariamente en anginas y adenoides y en vías aéreas inferiores, en los ganglios linfáticos mediastinales. Existen relativamente pocos folículos linfoides en la lámina propia pulmonar a comparación del intestino [37].

La migración de las células plasmáticas secretoras de IgA, depende de la secreción de CCL28, la cuál es expresada por el epitelio respiratorio y su receptor CCR10, el cual es

expresado por las células plasmáticas inmigrantes. Las IgA e IgG son transportadas hacia el lumen por el mismo receptor de poli-Ig y movilización transcelular como ocurre en el epitelio intestinal. En el caso de las respuestas a alérgenos, la IgE es de los principales mediadores. El principal mecanismo por el cual producen reacciones alérgicas es a través su interacción con los receptores de alta afinidad expresados en las células cebadas y en los basófilos, los cuáles son muy abundantes en las vías aéreas [37].

1.7 Reacciones de hipersensibilidad

El sistema inmune normalmente posee mecanismos de regulación que evitan que los procesos inflamatorios se activen descontroladamente. Estos mecanismos en algunas ocasiones fallan y dan lugar a procesos patológicos llamados reacciones de hipersensibilidad. Estos procesos son efecto de una respuesta excesiva e indeseable y se clasifican en 4 tipos de acuerdo a los mecanismos efectores que dan lugar a ellos [38]. Estos tipos son:

Hipersensibilidad tipo I. Se conoce como inmediata o anafiláctica. Es mediada por IgE y puede involucrar tejidos como piel (urticaria y eczema), ojos (conjuntivitis), nasofaringe (rinitis o rinorrea), sistema gastrointestinal (gastroenteritis) y vías aéreas (asma). Se reconocen dos fases de esta reacción, la aguda que va desde los 15-30 minutos hasta las primeras horas y la tardía que dura hasta 12 horas o más. Las células cebadas son las responsables de desencadenar los eventos inflamatorios a través de su degranulación y liberación de mediadores clásicos de vasodilatación y broncoconstricción como histamina y leucotrienos. Además, estos mediadores favorecen la liberación de otras moléculas quimiotácticas que reclutan células inflamatorias [38, 39].

Hipersensibilidad tipo II. Es de tipo inmediata también y es citotóxica y es mediada por inmunoglobulinas de la clase IgG o IgM en respuesta a antígenos endógenos o a algunos haptenos. La reacción es mediada por fagocitos y neutrófilos. El tratamiento involucra la administración de inmunosupresores [38, 39].

Hipersensibilidad tipo III. Hipersensibilidad de complejos inmunes. Esta reacción ocurre entre 3-10 horas después del contacto con el antígeno. Los antígenos pueden ser

derivados de microorganismos o pueden ser endógenos y los mediadores son complejos inmunes de IgG y complemento dirigidos a componentes propios y los neutrófilos son las células efectoras. En etapas tardías pueden ser también macrófagos [23].

Hipersensibilidad tipo IV. Hipersensibilidad de tipo retardado. Es parte de la patología de algunas enfermedades autoinmunes o infecciosas. Los mecanismos efectores se manifiestan 48 horas después del contacto e involucran linfocitos Th1 que favorecen la activación de linfocitos T citotóxicos y algunos macrófagos. El ejemplo clásico de estas reacciones es la administración de tuberculina como diagnóstico del contacto con *Mycobacterium tuberculosis* [39, 40].

Como se mencionó previamente en este escrito, los antígenos reconocidos de manera exacerbada en la mucosa broncopulmonar, en individuos susceptibles con IgE incrementada, pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad tipo I conocidas como asma.

1.8 El asma. Definición

El asma es un padecimiento crónico inflamatorio que se desarrolla en las vías respiratorias. De acuerdo al reporte anual de la Iniciativa Global para el asma (GINA por sus siglas en inglés), el asma es un padecimiento heterogéneo caracterizado por inflamación crónica de las vías aéreas. Los síntomas que la definen son sibilancias (sonido que indica dificultad en el paso del aire), dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos [41]. Los cuales varían en tiempo e intensidad en cada paciente [41].

a) Epidemiología y generalidades del asma

Se ha reportado que existen cerca de 300 millones de personas afectadas por este padecimiento [42]. Cada año, la incidencia de esta enfermedad se incrementa. Debido a que el desarrollo de esta enfermedad se ha asociado a la industrialización por el incremento en la urbanización del 45% al 59%, se estima que para el año 2025, existirán 400 millones de personas con asma. Aunque en comparación de otras enfermedades el asma no está dentro de las primeras causas mundiales de mortalidad, se encuentra

dentro de los 25 lugares de padecimientos que generan mayores pérdidas laborales por incapacidad. Además, se encuentra en las 10 primeras causas de consultas médicas. Por lo cual es un problema de salud mundial muy importante [43].

En México, el asma tiene una incidencia de 2.78 por cada 1000 habitantes. Los estados de mayor incidencia son Colima, Tabasco, Chihuahua y Yucatán.

El número de defunciones que se calcula es de 1 por cada 250 fallecimientos al año en todo el mundo. Aunque México no ocupa los lugares de mayor incidencia a nivel mundial, si se encuentra dentro de los primeros lugares de mortalidad a causa de enfermedad [42, 43].

De este padecimiento, se han identificado algunos fenotipos. Los más comunes son:

- Asma intrínseca o alérgica. Este padecimiento se desarrolla principalmente durante la infancia. Los pacientes este tipo de asma cuentan con un historial clínico familiar de alguna enfermedad alérgica. Se ha identificado el principal componente como inflamación eosinofílica en las vías aéreas [44].
- Asma no alérgica. El perfil celular que se ha encontrado en el esputo de los pacientes puede ser de neutrófilos o eosinófilos. Los pacientes responden menos eficientemente al tratamiento con corticoesteroides [44].
- Asma tardía. Algunos pacientes manifiestan síntomas de asma hasta la edad adulta. En estos pacientes el componente es no alérgico y generalmente presentan resistencia al tratamiento con corticoesteroides, por lo requieren mayores dosis que otras manifestaciones del asma.
- Asma con flujo limitado crónico. En estos pacientes de asma durante muchos años, se genera una limitación constante del flujo respiratorio debido a la manifestación de la remodelación bronquial.
- Asma asociada a obesidad. Algunos pacientes con obesidad tienen síntomas de asma recurrentes y poca eosinofilia asociada a esta enfermedad [41].

b) Factores genéticos asociados a la inflamación alérgica.

Se estima que existen 40% de personas con atopia (predisposición de los pacientes a generar IgE con capacidad de reconocer alérgenos ambientales con una respuesta Th2). Sin embargo, de éstas sólo 7% desarrollan la atopia en asma [45].

Predisposición epitelial para el asma

Diversos estudios han asociado al asma con una predisposición genética. Se estima que 50% de los factores que la desencadenan es por predisposición genética y el otro 50 % por los factores ambientales.

Existen moléculas que se encuentran identificadas como ADAM33, DDP10, PHFA, GRPA y SPINK5, las cuáles se han relacionado con la predisposición para desarrollar el asma. Aun no está claro el papel de todos en el desarrollo del asma, sin embargo 4 de estas moléculas están relacionadas con la diferenciación terminal de las células epiteliales, por lo que podrían inducir la predisposición de estas células a reconocer ciertas moléculas como alérgenos.

c) Eventos importantes durante la inflamación alérgica pulmonar.

El epitelio pulmonar. Las células epiteliales en el pulmón representan una barrera física que impide el ingreso de moléculas de cierto tamaño, entre ellas, microorganismos y sus derivados. Sin embargo, estas células cumplen otras funciones importantes en eventos inflamatorios. Las células epiteliales en pulmón expresan TLRs, mediante estos receptores, reconocen moléculas provenientes del polvo que acarrean derivados de microorganismos como ADN y pared celular. Estos productos microbianos activan a los TLR3, TLR4, TLR7 y TLR8 y producen TSLP.

Fase aguda: La activación de las células cebadas ocurre a través de Fc ϵ RI por la interacción de la IgE con su respectivo alérgeno, induciendo la liberación de mediadores preformados y la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico, [46] sintetizados en respuesta a SCF (*Stem Cell Factor*), secretado por las células epiteliales.[47]

Estos mediadores son espasmógenos y vasoactivos: histamina, leucotrienos C₄, D₄, E₄, prostaglandina D₂ y enzimas recién sintetizadas (triptasa, quimasa y carboxipeptidasa). Estas moléculas inducen hipersensibilidad inmediata y actividad espasmogénica en músculo liso, causando broncoconstricción, edema, secreción de moco y la producción de citocinas y quimiocinas las cuales favorecen el reclutamiento de otras células al sitio de inflamación y provocan remodelación. [47]

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

Estos procesos inflamatorios son mediados por moléculas encargadas de dirigir el tráfico leucocitario hacia la mucosa pulmonar, como son las quimiocinas.

1.9 Las quimiocinas

Las quimiocinas son citocinas de un peso molecular de 8-10 KDa, cuya función mejor descrita es la inducción del reclutamiento celular a sitios específicos [48]. Ejercen esta función mediante su interacción con receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G [48, 49]. Estas moléculas comparten características estructurales, lo cual permite clasificarlas en 4 subgrupos de acuerdo a la presencia de dos residuos del aminoácido cisteína, que se encuentran altamente conservados en la región amino-terminal [48, 49]. De tal manera, que en la familia β o CC, las moléculas contienen estos dos residuos de cisteína adyacentes. De esta familia, se han descrito cerca de 28 miembros y se han dado nombres sistemáticos como CCL1, CCL2, CCL3... etc., aunque también se les conoce por el nombre común que se les dio cuando fueron identificadas. Tal es el caso de la quimiocina CCL25 o TECK (Thymus Expressed Chemokine, la cual se nombró así porque la expresión fue descrita primero en el timo y su acción principal fue asignada en los timocitos [50], o la quimiocina CCL5 o RANTES (Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted), cuyo nombre se le asignó porque se descubrió como una quimiocina producida por células T (un tipo específico de célula del sistema inmune), una subpoblación de células de la respuesta

inmune, que al ser activadas, pueden secretar otras citocinas y atraer más células al sitio de inflamación [48, 49, 51].

En la familia α o CXC, hay clasificadas alrededor de 16 (CXCL1-CXCL16) miembros y existe un subgrupo de quimiocinas conocidas como “ELR”, las cuales poseen este motivo de aminoácidos (Ac Glutámico-Leucina- Arginina) cerca del motivo CXC. Una característica singular de estas quimiocinas es que son factores pro-angiogénicos, es decir, que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos. Son los principales inductores de migración en los neutrófilos y la mayoría de éstas interaccionan con los receptores CXCR1 y CXCR2, que se encuentran en la membrana celular [52].

La subfamilia C o γ , contiene a la fractalcina. Esta quimiocina es la única que se encuentra integrada a la membrana celular y contiene un dominio de mucina, y por lo tanto puede también funcionar como una molécula de adhesión. El resto de las quimiocinas son secretadas hacia el medio extracelular [49].

Finalmente, la cuarta familia descrita es la de quimiocinas XC. En estas dos quimiocinas, solamente existe una cisteína en el extremo amino terminal y para ellas solamente existe descrito un receptor XCR1 [48, 51, 52].

Todas estas proteínas se denotan principalmente como inductores de migración celular; sin embargo, existen otras tantas funciones que se les han encontrado como inductores de proliferación, actividad antimicrobiana, inductores de diferenciación celular y angiogénicos [52].

1.9.1 Las quimiocinas y su asociación con el asma

El estudio de los mecanismos, que participan en la progresión del asma, ha permitido el descubrimiento de moléculas que funcionan como marcadores durante el diagnóstico y clasificación clínica de la enfermedad, y también sirven como potenciales blancos terapéuticos en los pacientes asmáticos.

Las quimiocinas y sus receptores se han identificado como moléculas que se inducen durante el asma y además, regulan la actividad de las células que son reclutadas a la mucosa pulmonar y ejercen un efecto nocivo para todo el epitelio pulmonar [53].

La selectividad en la expresión de algunas quimiocinas permite no sólo la activación de moléculas de adhesión, sino también la localización diferente de ciertos tipos celulares en el pulmón. En modelos experimentales en ratón, se ha observado que los patrones en la expresión de receptores de quimiocinas son distintos en el pulmón asmático. Tal es el caso de los linfocitos T, los cuales, parecen tener un fenotipo distinto como: CCR4⁺, CXCR6⁺, CXCR3⁺, CCR5⁺. En pacientes asmáticos, se ha visto un incremento en la expresión de CCR4 y CCR8 en los linfocitos en circulación sanguínea, ya que después de un estímulo alérgico se incrementa la expresión de los ligandos CCL17 y CCL22 en el pulmón [54]. En cuanto al aumento en la expresión de CCR3 en los pacientes asmáticos se ha determinado en los modelos animales se ha visto que la influencia de este receptor en el desarrollo del asma, ocurre en algunos niveles pero en otros no, como la disminución de eosinófilos.

Por lo tanto, en la búsqueda de terapias, el estudio de CCR3 como un potencial blanco de antagonismo en modelos animales o en humanos, no ha demostrado consistentemente si CCR3 es un buen candidato para disminuir el padecimiento. Otros posibles candidatos son CCR2, CXCR4 y CXCR2 [55]. La inhibición de estos receptores o de sus ligandos, ha mostrado resultados prometedores en bloquear la llegada de eosinófilos al pulmón, bloquear la hiperreactividad y sobreproducción de moco en modelos animales. Dentro del estudio de estas moléculas como posibles blancos terapéuticos o como probable marcadores de diagnóstico, es necesario siempre considerar el tipo de asma, el tiempo de progresión y las características de cada individuo, para poder encontrar moléculas que sean comunes a cada tipo específico de asma [56]. En el caso de CCR9, es un receptor ampliamente estudiado en la mucosa intestinal. En los últimos años, su estudio se ha enfocado a proponerlo como blanco terapéutico para inhibir la enfermedad intestinal inflamatoria y la enfermedad de Crohn y se encuentran en fase clínica algunos antagonistas de este receptor; por lo cual, es de gran interés, analizar la participación de este receptor en la mucosa pulmonar durante el asma.

2. ANTECEDENTES

2.1 CCL25 y CCR9. Características genéticas y moleculares

El gen *ccl25* se localiza en el cromosoma 19 en humano y 8 en ratón. Este gen codifica para una proteína con 359-367 aminoácidos y un peso molecular de 42 kDa. Su expresión se encuentra restringida a timo, intestino delgado y bazo principalmente. CCL25 es una quimiocina perteneciente a la subfamilia de quimiocinas “C-C”. La identificación de esta molécula surgió a partir de la búsqueda de nuevos genes de quimiocinas, relacionados con el desarrollo de los linfocitos T [50, 57]. Se ha descrito que esta quimiocina puede asociarse al receptor CCX-CLR; sin embargo, esta interacción no induce señalización intracelular. CCR9 es el único receptor con el cual CCL25 interacciona e induce activación y señalización intracelular [58].

El gen *ccr9* se encuentra codificado en el cromosoma en 3 humano y 9 de ratón, y se encuentra en el mismo “cluster” en el que se localizan los genes relacionados *ccr6* y *ccr7*. Este receptor de quimiocinas pertenece a los receptores CCR (con dominio “C-C”). El gen contiene 2.4 Kb [59-61]. En humano existen dos formas identificadas: CCR9A y CCR9B, las cuales son producto de splicing alternativo y distintos sitios de inicio de la transcripción. CCR9A tiene mayor sensibilidad a CCL25 y se expresa 10 veces más abundantemente que CCR9B [62]. La expresión de la proteína CCR9A y CCR9B, correlaciona con la expresión constitutiva de su ligando. Las células que responden a CCL25 son: timocitos, macrófagos, linfocitos T CD4, linfocitos T CD8, linfocitos T $\gamma\delta$, macrófagos, células dendríticas y eosinófilos [59-61, 63-66].

En la figura 2, se muestra un esquema de la secuencia de los genes de CCR9 y de la quimiocina CCL25 que indica la homología que existe entre el gen humano y murino de cada molécula (**Fig. 2**)

2.2 Expresión de CCR9 en homeostasis y enfermedad.

Esta expresión correlaciona con la de su ligando; sin embargo la participación de esta molécula en procesos inflamatorios apenas se ha estudiado en los últimos años y la información actualmente indica que este receptor es un blanco importante en enfermedades intestinales y cáncer.

Aunque aún no se conocen bien los mecanismos que regulan la expresión de CCR9; se ha descrito que en el timo, los progenitores más tempranos de linfocitos expresan CCR9, sin embargo la mayor expresión está relacionada con la transición del estadio doble negativa a doble positiva en los timocitos. La señalización mediada por el pre-TCR, es capaz de inducir la expresión de CCR9 en estas células [59].

Posteriormente, se identificó al ligando único de CCR9, como una molécula alta y selectivamente expresada por las células epiteliales del intestino delgado [67].

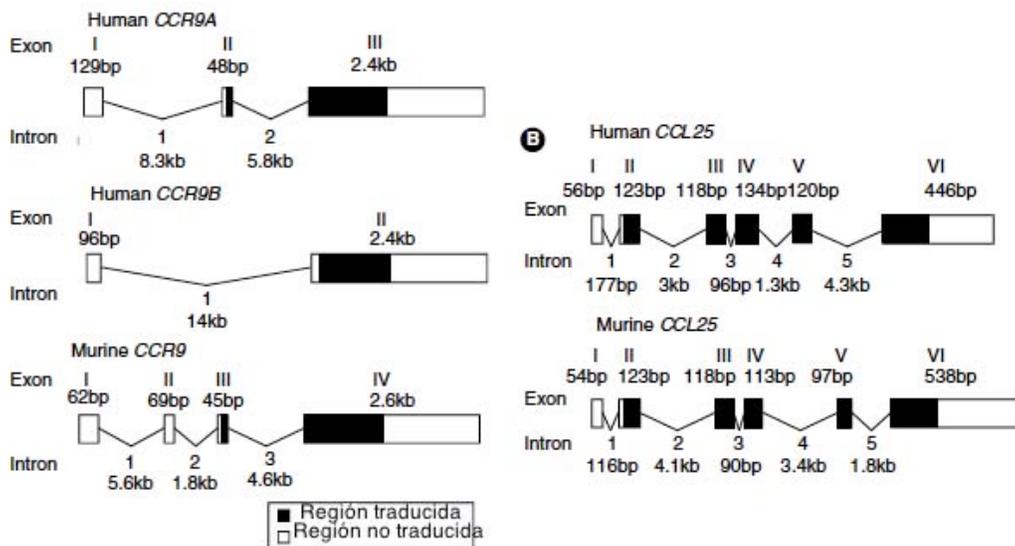


Figura 2. Estructura genética de CCR9 y CCL25. Esquema que simplifica la secuencia humana y murina de CCR9 y de CCL25 respectivamente. Modificado de Svensson M., 2009. [68]

Actualmente existen pocas evidencias experimentales que sugieran que el receptor CCR9 tiene un papel en la regulación del proceso inflamatorio durante la alergia pulmonar, incluso *in vivo*, solamente se ha estudiado en dos grupos de investigación [69-71]. Como se mencionó en la introducción, la función descrita de manera más detallada

de este receptor de quimiocinas, es su participación durante la ontogenia de los linfocitos T en el timo. CCR9 es sobreexpresado en la transición de timocitos DN4 (dobles negativos) a DP (dobles positivos) y esta expresión se relaciona con la expresión constitutiva de su ligando único por el estroma tímico.

Por otra parte, CCR9 regula el reclutamiento homeostático de los linfocitos hacia intestino delgado. CCL25 es expresado por las células epiteliales de la mucosa intestinal y la expresión de CCR9 se ha relacionado tanto con el mantenimiento de la integridad intestinal en condiciones homeostáticas como en procesos inflamatorios como la enfermedad de Crohn.

La importancia de la expresión de este receptor como regulador de la homeostasis en mucosas solamente se ha analizado en la mucosa intestinal; sin embargo aún resta por analizar a detalle el papel que este receptor pudiera tener como regulador en la inmunidad de mucosas como la mucosa pulmonar.

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

En el caso de los eosinófilos, se ha descrito un incremento en la expresión de CCR9 en eosinófilos de lavados broncoalveolares en pacientes alérgicos posterior a un reto alérgico. Se ha reportado que en líneas celulares de eosinófilos, éstos son capaces de migrar hacia su ligando, la quimiocina CCL25 previo un estímulo inflamatorio [63].

Por otro lado, existen algunos antecedentes de que la interacción de CCR9 con su ligando induce la sobrevivencia en células tumorales (Fig. 3) [72, 73], sin embargo, el estudio de estas vías de señalización aun no está muy abordado en células hematopoyéticas.

En la **figura 3**, se muestra un esquema simplificado de los hallazgos acerca de la vía de señalización inducida por la activación de CCR9 a través de su ligando y la contribución de esta vía a la supervivencia celular en células cancerosas.

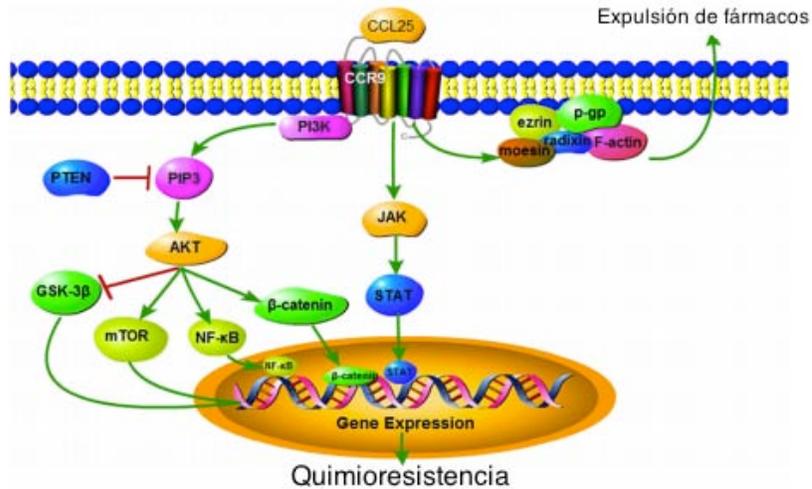


Figura 3. Eventos intracelulares resultado de la interacción de CCR9 y CCL25. El esquema simplifica los eventos intracelulares que resultan de esta interacción y además el resultado es la supervivencia celular y resistencia a la quimioterapia. Modificado de *Tu M. et al. 2016.[66]*

Por otro lado, la función de las células dendríticas en el asma se ha estudiado recientemente. Además de ser responsables de capturar moléculas en el lumen pulmonar, también contribuyen al microambiente de los procesos inflamatorios a través de la secreción de citocinas. Algunas de las células dendríticas en circulación periférica son capaces de expresar CCR9 y la expresión está involucrada con el estado de maduración de estas células [74, 75]. Otro blanco celular en el cuál CCR9 tiene un efecto funcional, son las células dendríticas plasmacitoides. Estas células participan durante la inflamación alérgica pulmonar; sin embargo aún no se ha demostrado si existe una población de células CCR9+ que regulen un proceso inflamatorio en el pulmón [76].

Además existe una subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$ + productores de IL-17 que regulan la inflamación alérgica pulmonar (IAP). Esta subpoblación es dirigida hacia el pulmón por CCR9 y es capaz de responder hacia CCL25, con lo cual este es el único antecedente que se conoce acerca de la expresión de CCL9-CCL25 en el pulmón [70].

Con estos datos, en este grupo de investigación, se ha buscado el papel de CCR9 regulando algunos procesos inflamatorios. Se ha reportado que existe una población de linfocitos T con fenotipo de células reguladoras que depende de CCR9 para regular la colitis inducida por infección amibiana. Finalmente, se ha reportado que la ausencia de CCR9 en un modelo murino de IAP, impacta severamente el reclutamiento de una subpoblación eosinofílica en el pulmón [69, 71]; sin embargo, las condiciones en las que se regula esta expresión y ésta a su vez regula a otras poblaciones importantes como los linfocitos T o células dendríticas aun no se ha estudiado.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El reclutamiento celular y los mecanismos que derivan a procesos inflamatorios crónicos como la alergia pulmonar son muy complejos y no se han terminado de comprender a detalle; sin embargo, el conocimiento de esta regulación por parte de las quimiocinas y sus receptores, ha servido para explicar algunos de estos procesos.

Como se menciona en los antecedentes, en trabajos previos utilizando un modelo murino de inflamación pulmonar, hemos reportado que en ausencia del receptor de quimiocinas CCR9, existe una disminución en la población de eosinófilos que se reclutan al pulmón durante la alergia pulmonar a las 24 horas después del último reto alérgico. Sin embargo, aún no se ha analizado a detalle lo que ocurre con esta población en etapas previas, ni con otras poblaciones que pudieran ser importantes para el establecimiento de la inflamación, como son las células dendríticas y los linfocitos T.

Por otra parte, aún no se ha descrito la expresión de CCL25 (ligando único de CCR9) a nivel de proteína, ni el punto temporal en el que hay mayor expresión, ni cuáles serían las células responsables de esta expresión en condiciones inflamatorias.

Por esto, durante la inflamación alérgica pulmonar, existen poblaciones celulares que pueden ser disminuidas en ausencia de CCR9, además de los eosinófilos. A pesar de que hemos observado que este proceso no afecta la cantidad de células PAS positivas (productoras de moco) ni la secreción de IgE OVA-específica, aún no se conoce si en presencia de CCR9, estas poblaciones celulares son capaces de expresar CCR9 y si esta expresión modula su reclutamiento y función en el pulmón.

Por lo tanto, es necesario conocer cuáles son las poblaciones celulares moduladas por CCR9 durante la inflamación en pulmón además de los eosinófilos y conocer si esta expresión es importante para regular el microambiente inflamatorio en este proceso.

4. HIPÓTESIS

El receptor de quimiocinas CCR9 y su ligando, se expresan en distintas etapas de la inflamación alérgica pulmonar y modulan el reclutamiento de las poblaciones celulares de eosinófilos, linfocitos T y células MHCII+ CD11c+ lo cual contribuye al establecimiento del proceso inflamatorio durante la inflamación alérgica pulmonar.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del receptor de quimiocinas CCR9 y de su ligando durante distintas etapas de la inflamación alérgica pulmonar y su participación regulando a las poblaciones celulares de eosinófilos, linfocitos T y células MHCII+ CD11c+ que se reclutan al pulmón y cuál es el impacto en todo el proceso inflamatorio durante la inflamación alérgica pulmonar.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar un modelo de inflamación alérgica pulmonar en un ratón deficiente de CCR9.
2. Evaluar la capacidad quimiotáctica de CCL25 en células provenientes de LBA.
3. Analizar de manera cinética la expresión de CCR9 en pulmón después de un reto antigénico con OVA.
4. Analizar de manera cinética la expresión de CCL25 después de un reto antigénico con OVA.
5. Determinar la presencia de CCL25 en tejido pulmonar y en lavados broncoalveolares.
6. Determinar de manera cinética la expresión de mediadores pro-inflamatorios en ausencia de CCR9 y compararlos con los ratones normales (ratones silvestres)
7. Caracterizar de manera cinética las subpoblaciones celulares en lavados broncoalveolares después del estímulo con OVA.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 Genotipificación de los ratones CCR9 (-/-)

Los pies de cría de los ratones transgénicos utilizados en este trabajo fueron proporcionados por el Dr. Marc André Wurbel, investigador del Harvard Medical School de Massachusetts, Boston, EUA.

Los ratones fueron destetados a las 4 semanas de nacimiento. Al ser separadas, las crías se marcaron y se obtuvieron de ellas, segmentos de la cola de 4 mm que fueron colocados en tubos cónicos de 1.5 mL. Inmediatamente, se les agregaron 150 µL de una solución A (NaOH 25 mM + EDTA 0.2 mM) y se incubaron a 80°C durante 40 minutos. Se agitaron vigorosamente y se volvieron a incubar a 80°C durante 40 minutos. Al finalizar la incubación, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les agregaron 160 µL de una solución de Tris (40 mM pH=5). Posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 seg. De esta solución, se tomaron 2 µL para hacer la PCR.

La PCR se realizó de la siguiente manera: En un tubo cónico de 300 µL se agregaron los siguientes componentes:

Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador para Taq polimerasa (Invitrogen)	2.5
MgCl ₂ 50 mM	1
Mezcla de oligonucleótidos (10 mM)	0.5
Mezcla de cebadores para CCR9 (Ver secuencia en apéndice) 10 mM	1
Taq polimerasa (Invitrogen 100 unidades)	0.1
DNA (de la solución de lisis)	2
H ₂ O DEPC	Cbp 25 µL

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes

1 ciclo 95°C durante 10 min

40 ciclos 94°C durante 45 segundos

60°C durante 45 segundos

72°C durante 45 segundos

1 ciclo 4°C tiempo ∞

Para determinar el genotipo, las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.5% con TAE IX (Ver apéndice) durante 40 minutos a 85 volts. Los gels fueron expuestos a luz UV y el análisis de los productos consistió en determinar las bandas correspondientes a 300 pb (CCR9 KO), 300 y 800 (CCR9 HT) y 800 pb (WT).

7.2 Modelo agudo de inflamación alérgica pulmonar inducida por OVA

Los animales empleados se mantuvieron en las instalaciones de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se utilizaron ratones hembras silvestres y deficientes de CCR9 en fondo genético C57BL/6 de 6-8 semanas de edad, para ser inmunizadas con OVA y sus respectivos controles de solución salina (SS). El día **0** del modelo, a los ratones se les administró una mezcla de 10µg de OVA grado V (Sigma no. Cat. A5503-1G) con 10 µL de hidróxido de aluminio Alum (Thermo Scientific, CA, USA) como adyuvante, en un volumen final de 100 µL, utilizando solución salina como vehículo. Al día **8**, se administraron nuevamente vía intraperitoneal con 10µg de OVA con hidróxido de aluminio en 100 µL, utilizando solución salina como vehículo. A partir del día **15** y hasta el **20**, se retó a los animales mediante nebulización, con una solución de OVA al 1% en PBS estéril durante 30 en una caja de acrílico de 50*30*20 cm, utilizando un nebulizador ultrasónico Ultraneb99 (Devilbiss Healthcare). Los ratones recibieron nuevamente una nebulización el día 34 con OVA al 5% en PBS estéril durante 30 minutos. El día 35 o en los tiempos indicados, se realizó el análisis, obteniendo lavados broncoalveolares (LBAs), sueros, tejido pulmonar, timo y ganglios para su posterior análisis.

7.3 Obtención y preparación de células para su análisis

Para anestésiar a los ratones se administraron 60 µL de una mezcla de 50 mg/kg de ketamina con 20 mg/kg de xilacina en solución salina por vía intraperitoneal. Una vez

anestesiados los ratones, se colectaron 400 a 800 μL de sangre. Después, se colocaron en tubos que tenían 10 μL de EDTA 0.5 M como anticoagulante. El suero se separó centrifugando a 2500 rpm durante 10 minutos y se almacenó en alícuotas a -70°C . Para obtener lavados broncoalveolares (LBA), se expuso la tráquea, se insertó y se fijó en ella una cánula intratraqueal, a través de la cual se administraron 800 μL de una solución de PBS/EDTA 0.05 M y se colectaron de regreso en un tubo cónico de 15 mL. Se repitió esta operación hasta que se completaron 5 mL de LBA. El primer mililitro colectado de sobrenadante, se almacenó en alícuotas libre de células a -70°C .

7.4 Análisis histológico en tejido pulmonar

Los pulmones fueron perfundidos a través de una punción en el ventrículo derecho del corazón, mediante la administración de PBS hasta que la solución desechada se tornó prácticamente incolora. Una vez limpios de eritrocitos, los pulmones se canalizaron a través de la tráquea y se insuflaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. El tejido pulmonar se extrajo y se colocó en paraformaldehído al 4% durante 24 h. Posteriormente, se sumergieron en PBS IX hasta su procesamiento en parafina.

Para el análisis histoquímico, los pulmones fueron deshidratados, embebidos en parafina y procesados en secciones de 7 μm . Se hicieron tinciones de las laminillas con hematoxilina/eosina y mediante la técnica de PAS para evidenciar la producción de moco. Para el análisis morfométrico, los cortes de pulmón fueron examinados en un microscopio de campo claro (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL USA). Las imágenes se capturaron y fueron analizadas utilizando un software de análisis de imágenes (Leica Microsystems). De cada bronquio se calculó, el área perivascular y peribronquial que abarcaba todo el infiltrado inflamatorio. Se eligieron bronquios de entre 150-250 μm y vénulas adyacentes a cada bronquio. Se evaluaron 4 bronquios por cada ratón, de los cuales se obtuvo una media y se eligieron 3 ratones por cada grupo. El análisis de las células PAS-positivas, se eligieron bronquios de 150-250 μm . Se contaron directamente las células presentes en cada bronquio y se obtuvo una suma de todas las células PAS-positivas. Se contaron 3 ratones por cada grupo y se obtuvo el promedio.

7.5 Análisis inmunohistoquímico

Se eligieron cortes a 7 μm en parafina. Los tejidos se desparafinaron a 56°C durante 30 minutos y se hidrataron en un tren sucesivo de alcoholes hasta que se dejaron en PBS IX. La recuperación de antígeno se hizo mediante incubación con citrato de sodio 0.01 M en horno de microondas durante 5 minutos a máxima potencia. Posteriormente, se realizó la inactivación de peroxidasas endógenas con H_2O_2 durante 20 min. Se realizó un bloqueo con bloqueador universal (Biogenex, CA, USA) incubando durante 20 min a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo anti-mCCL25 (Purified goat anti-mouse CCL25 antibody) (R&D) y su control de isotipo (R&D), se utilizaron a la concentración recomendada por el fabricante. Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS/BSA 0.05%. Las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra IgG durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se lavaron 5 veces con PBS/BSA 0.05% y revelaron con diaminobencidina (DAB) (Vector laboratories, CA, USA). Las imágenes fueron analizadas con un microscopio de campo claro.

7.6 Ensayo de quimiotaxis

Para evaluar responsividad de las células provenientes de los LBA procedentes de los ratones utilizados en este modelo, se obtuvieron los células de LBA el día del sacrificio y se preparó una curva con las siguientes concentraciones de quimiocina CCL25: 0, 10, 50 y 100 ng/mL en HBSS suplementado con BSA 0.05%. Se preparó una membrana de quimiotaxis de poro de 0.5 μm incubándola con fibronectina humana (20 μg /mL) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron con PBS antes del ensayo. Las células se preincubaron con calceína (1 mg/mL) a una dilución 1:1000 durante 20 minutos a 37°C, al finalizar la incubación, se lavaron con PBS/SFB 2% y se resuspendieron en HBSS. Se utilizó una cámara modificada de Boyden; colocando en la parte inferior 30 μL de cada una de las concentraciones de quimiocina, CCL25 o CCL11 (Peprotech, USA) por triplicado y utilizando como blanco HBSS. En la parte de arriba, se colocaron 50 μL de suspensión celular con 200 000 células por pozo. Se incubó la cámara durante 2 horas a

37°C con 5% de CO₂. Al finalizar la incubación, se desarmó la cámara y se lavó la cara superior de la membrana con PBS IX con cuidado de no eliminar las células que migraron con PBS 1X. La membrana se dejó secar y posteriormente se midió la fluorescencia en un equipo detector de fluorescencia (Typhoon FLA 9500, GE,USA). La cantidad de células que migraron hacia la membrana en respuesta a la quimiocina se reporta como índice de fluorescencia (IF) y es relativo a la migración de las células sin estimular.

7.7 Conteo total y diferencial de células en LBA de los ratones CCR9 (+/+) y CCR9 (-/-)

El conteo total fue realizado en cámara de Neubauer el día de sacrificio de los animales. Para realizar el conteo diferencial, se adhirieron las células a un portaobjetos por citocentrifugación (Cytofuge) colocando 200 µL de suspensión celular, ajustando cada muestra a 20 000 células con PBS. Las muestras se centrifugaron a 700 rpm durante 6 minutos. Se distinguieron a las células por características morfológicas de Wright/Giemsa con una solución Diff Quick (Dade Behring) durante 5 minutos. Se distinguieron macrófagos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Se cuantificó cada muestra por duplicado, tomando en cuenta 200 células por laminilla. El conteo fue realizado en un análisis ciego con el objetivo de 40X de un microscopio de luz.

7.8 Ensayo enzimático para la determinación de EPO en LBAs

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos. Se colocaron 50 µL de LBA en cada pozo. A estos pozos se les agregaron 50 µL de la solución sustrato que contiene 16 mM de p-fenielendiamina (pPD) con 0.018% de H₂O₂ en 100 mM de Tris a un volumen final de 50 µL por pozo. La reacción se llevó a cabo durante 20 minutos protegiéndola de la luz. La reacción se detuvo con 100 µL de H₂SO₄ 2 N y se leyó a 490 nm. Los datos se reportan como densidad óptica a 492 nm.

7.9 Detección de IgE específica para OVA en suero por ELISA.

Las placas de 96 pozos (UltraCruz, Santa Cruz®) se sensibilizaron adicionando 100µL por pozo de una solución de 20µg OVA (Sigma gradoV) disuelta en NaHCO₃ 0.1M pH8.3 y se incuban toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 4 veces con 300µL de solución de lavado (PBS pH 7.4, Tween 20, 0.05%). Posteriormente se bloquearon adicionando en cada pozo 200 µL de solución de trabajo (PBS/BSA1%) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación oscilatoria para disminuir el fondo. Las placas se lavaron 4 veces con 300µL de solución de lavado y se adicionaron 100µL de las muestras de suero diluidas 1:10 en solución de trabajo. Se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación las placas se lavan 5 veces con 300µL de solución de lavado. Posteriormente se agrega a cada pozo 100µL de solución de anticuerpo rata Anti-ratón IgE (1:500) (Biolegend no Cat 406902) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Al término de la incubación, se lavaron 4 veces con 300µL de solución de lavado y se adicionan 100µL de la solución del anticuerpo biotinilado (1:1000) (Biolegend) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Al término de la incubación se lavaron 5 veces con 300µL de solución de lavado y se adicionaron 50 uL del reactivo Avidina-HPR diluido 1:250 (BD Opt EIA, Enzyme concentrate avidin-HRP) en solución de ensayo y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente. Por último las placas se lavaron 5 veces con 300µL de solución de lavado y se adicionan 100µL de solución de TMB (TMB Microwell, peroxidasa substrate KPL) y se incubaron durante 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregan a cada pozo 50µL de H₂SO₄ 2 N y posteriormente se determinó la densidad óptica en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450nm (MODULUS II Microplate reader. Turner Biosystems). La cantidad de inmunoglobulina, se reporta como densidad óptica a 450 nm.

7.10 Detección de CCL25 en LBAs por ELISA.

Las placas de 96 pozos (Santa Cruz, Ultra Cruz. Cat. Sc20446043) se capturaron de la siguiente manera:

a) Se colocaron 100 μ L de la quimiocina recombinante (R&D Cat. 481-TK). Las concentraciones de la curva se prepararon en diluciones seriadas en NaHCO_3 0.1M pH 9.5 y se incubaron toda la noche a 4°C o b) Se colocaron 100 μ L de cada muestra problema, diluidas 1:1 en NaHCO_3 0.1M pH9.5 y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 4 veces con 200 μ L de solución de lavado (PBS pH 7.4, Tween 20, 0.05%). Posteriormente las placas se bloquearon adicionando en cada pozo 200 μ L de solución de trabajo (PBS/BSA1%) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitador oscilatorio. Al término de la incubación las placas se lavaron 4 veces con 200 μ L de solución de lavado y posteriormente se agregaron 50 μ L de solución de anticuerpo primario (Goat anti m-CCL25 R&D Cat. AF-481) a una concentración de 2 μ g/mL preparado en solución de trabajo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente la placa se lavó 4 veces con 200 μ L de solución de lavado y se adicionan 50 μ L de la solución del anticuerpo secundario (Anti-cabra IgG (R&D Cat. HA1017 acoplado a HRP) a una concentración de 1 μ g/mL y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último la placa se lavó 6 veces con 200 μ L de solución de lavado y se adicionaron 100 μ L de solución del sustrato TMB listo para usarse (Invitrogen Cat 00-2023) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en oscuridad hasta que se observó una coloración azul. Para detener la reacción se agregaron a cada pozo 50 μ L de H_2SO_4 2 N y posteriormente se determinó la densidad óptica a 450 nm. El análisis se realizó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en cada muestra problema, utilizando la curva estándar

7.11 Análisis de distintas poblaciones celulares por citometría de flujo (FACS).

Las células obtenidas de LBA, se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo cóncavo, ajustando el volumen para obtener 5×10^5 células y se centrifugaron a velocidad máxima durante 15 segundos a 4°C. Se lavaron en 150 µL de amortiguador de FACS y se centrifugaron a velocidad máxima y 4°C. Se resuspendieron en 20 µL de dilución de suero de ratón (1 en 50 para bloquear uniones específicas) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se realizó un lavado con 150 µL de amortiguador para FACS. Se resuspendieron en 20 µL de dilución de anticuerpos primarios específicos para las moléculas CD3, CD4, CD8, CCR3, Gr-1, CCR9, Siglec F, F480, MHC II y Foxp3, (las diluciones se encuentran en el apéndice) y se incubaron a 4°C durante 20 minutos protegiéndolas de la luz. Se lavaron con 200 µL de solución de FACS y centrifugaron a 4°C y velocidad máxima durante 15 segundos. Se lavaron nuevamente y centrifugaron de la misma manera por última vez y finalmente se fijaron en 150µL de PBS 1X, con 50µL de paraformaldehído al 4%. Al final, se realizaron 2 lavados con solución de FACS y finalmente se resuspendieron en 200 µL de amortiguador de FACS. Posteriormente las muestras se analizaron en un citómetro de enfoque acústico Attune® Thermo Scientific, USA). 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, a la región de granulocitos y monocitos. Los porcentajes obtenidos se relacionaron con los números totales y los datos se reportan como porcentaje y como número de células. Las gráficas que se muestran son representativas correspondientes a 2 experimentos independientes.

7.12 Extracción de ARN para el análisis por RT-PCR

El procedimiento se llevó a cabo condiciones de esterilidad y con material libre de RNAsas. Al tejido pulmonar se agregaron 800 µL de Trizol (Invitrogen) por muestra. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos se maceraron utilizando un homogenizador de tejidos (Brikmann) y se enjuagó el vástago (7 mm de

diámetro) entre cada muestra con PBS + SDS 0.05%. Una vez fragmentado completamente el tejido, se agregaron 200 μ L de cloroformo.

Las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 minutos y se dejaron reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvo una solución trifásica, donde la fase inferior contiene a las proteínas y material extracelular, la fase intermedia contiene ADN y la fase superior (acuosa) contiene al RNA, se separó la fase acuosa y se agregaron 500 μ L de alcohol isopropílico; la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó agregando 200 μ L de etanol 75% y centrifugando a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se realizó un segundo lavado y al término, se dejó secar a temperatura ambiente para evaporar el etanol. Se resuspendió en 40 μ L de H₂O libre de RNAsas y de esta dilución se tomaron 2 μ L para cuantificar en dilución 1:500 y se congeló el resto. Para cuantificar, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Ultraspec Biochrom) a una longitud de onda de 260 nm, y se obtuvo la relación Abs 280/260 para verificar la pureza ya que relaciones cercanas a 2 contienen alto grado de pureza de RNA. Posteriormente se corrieron 2 μ L de RNA resuspendido en 8 μ L de amortiguador TAE en un gel de agarosa 2% en TAE 1X. La integridad del RNA se verifica en el gel observando que las 3 bandas de RNA correspondientes a los 3 tipos de RNA se encuentren bien definidas.

7.13 Síntesis de cADN

Para la síntesis de cADN, se mezclaron los siguientes componentes: 1 μ L de cebadores oligo dT (500 μ g/mL), 5 μ g de RNA, 5 μ L de la mezcla de dinucleótidos trifosfato dATP, dCTP, dTTP y dGTP (10 mM) y H₂O libre de RNAsas cbp 12 μ L y se incubaron a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar las cadenas de RNA. Posteriormente, se llevaron rápidamente a hielo y se agregaron 4 μ L de amortiguador para la enzima 5X (Promega). Se mezclaron los componentes y se incubaron 2 minutos a 37°C. Se agregó 1 μ L de enzima MMLV- RT (Promega). Se mezcló la reacción y se incubó durante 2 horas a

37°C. Al finalizar la incubación, se inactivó la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos. Al terminar la inactivación, se almacenó a -20°C hasta su uso en PCR.

7.14 RT-PCR semicuantitativa para análisis de la expresión de citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas.

Para verificar la expresión de actina en todas las muestras, se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2 µL de cDNA, 2.5 µL de amortiguador de reacción para la Taq Polimerasa sin MgCl₂, 0.75 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.5 µL de primer específico para amplificar sentido, 0.5 µL de primer antisentido, 0.1 µL de Taq Polimerasa (Invitrogen) y agua libre de RNAsas y DNAsas hasta un volumen final de 25 µL. Se amplificaron en un termociclador (MyCycler BioRad) a las condiciones especificadas para los cebadores (ver anexo I). Se corrieron 10 µL de las muestras con 1 µL de amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X para comprobar el tamaño del producto con el marcador de peso molecular 100-2072 pb (Invitrogen).

7.15 RT-PCR en tiempo real

Para cuantificar la expresión del RNA mensajero (mRNA), se utilizaron 2 µL de cDNA obtenido por muestra y el reactivo SYBR green [Master Mix] (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos específicos y las condiciones de reacción se mencionan en el Anexo I. Para la reacción, se utilizó el equipo ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) con el software correspondiente para hacer el análisis. Se utilizaron placas con cubiertas ópticas (Applied Biosystems). El análisis se realizó como una cuantificación relativa a la expresión de actina y al grupo control con el método “2-ΔΔCT” [77].

7.16 Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre los grupos: Silvestre control (WTSS) vs. deficientes de CCR9 control (KOSS) y silvestres tratados con ovoalbúmina (WTOVA) vs. deficientes de CCR9 tratados con ovoalbúmina (KOOVA) fueron determinadas mediante el análisis estadístico ANOVA de una sola vía seguida de la prueba Bonferroni con el software GraphPad Prism. En las gráficas se grafica la desviación estándar (SD). Los valores de $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$ se consideraron como significativos.

8. RESULTADOS

8.1 Validación del modelo de alergia pulmonar por OVA en ratones deficientes de CCR9.

a) Determinación de EPO, cuantificación de células en LBAs y cuantificación de IgE en suero

En trabajos de investigación previos de nuestro grupo de investigación [69, 71], se utilizó un modelo de inflamación alérgica inducido por ovoalbúmina con Alúmina (AlOH_3) en ratones deficientes de CCR9 para analizar el efecto de la ausencia de esta molécula en la inflamación alérgica pulmonar. En estos trabajos se observó que en ausencia de CCR9, existe menor número y porcentaje de eosinófilos. Con base en estos trabajos, lo siguiente por analizar es otras poblaciones que pudieran ser moduladas por este receptor durante el proceso inflamatorio, y si es que los eosinófilos expresan CCR9 durante un proceso inflamatorio en pulmón o existen otras poblaciones celulares que pudieran ser reguladas por la expresión de CCR9 durante la inflamación.

En el presente trabajo de investigación, se validó el modelo murino modificado. Como se observa (**Fig. 4A**) y consistente con nuestros reportes previos, ante un reto local con OVA en aerosol en ratones previamente sensibilizados con OVA/ALum, el número de células totales incrementa; sin embargo, en los ratones KO, este incremento es significativamente menor (aproximadamente 50%). Otra manera de evaluar el establecimiento del proceso inflamatorio es distinguir morfológicamente las células reclutadas en LBAs. Como se reporta en este tipo de modelos, a las 24 horas posteriores al último estímulo, el número de linfocitos y eosinófilos aumenta significativamente, pero en ausencia de CCR9, los eosinófilos se ven severamente disminuidos a este tiempo (1.4×10^6 vs. 0.7×10^6 células). (**Fig. 4B**), lo cual confirma que esta población celular depende directa o indirectamente de CCR9 para ser reclutada a pulmón. Para analizar la respuesta humoral específica para OVA, se determinó la IgE específica para OVA.

Aunque la IgE se incrementa como era de esperarse, se reporta nuevamente que no se ve afectada en los ratones CCR9KO (**Fig. 4C**). Otra manera de cuantificar la actividad de los eosinófilos en este proceso, fue determinando la presencia de la peroxidasa derivada de eosinófilos (EPO). El ensayo determinó que la producción de esta enzima, se ve disminuido (40%) en ausencia de CCR9 (**Fig. 4D**). Con estos datos, se demuestra que el modelo que utilizamos en este trabajo, es capaz de inducir respuesta inflamatoria mediada por IgE en pulmón, que es específica para el alérgeno experimental utilizado en este modelo y que reproduce los datos reportados previamente en nuestro grupo de investigación. Además, confirman, que CCR9 es importante para el adecuado establecimiento de esta respuesta inflamatoria en pulmón.

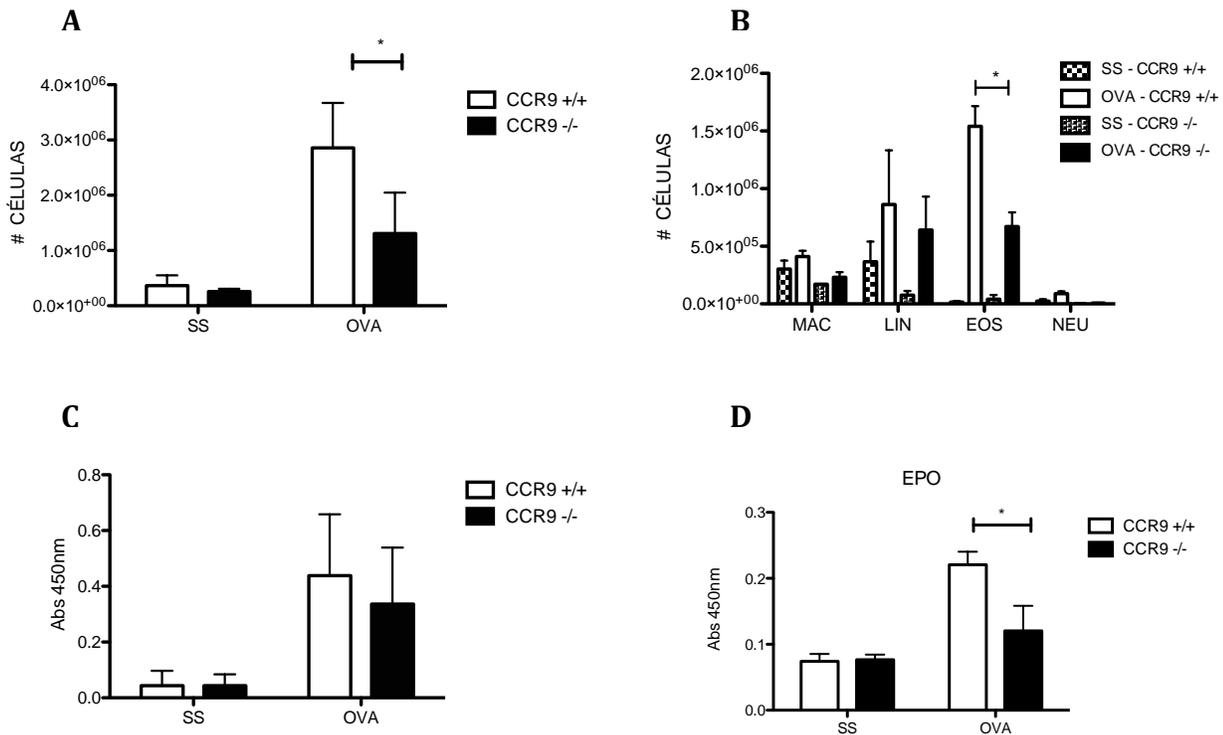
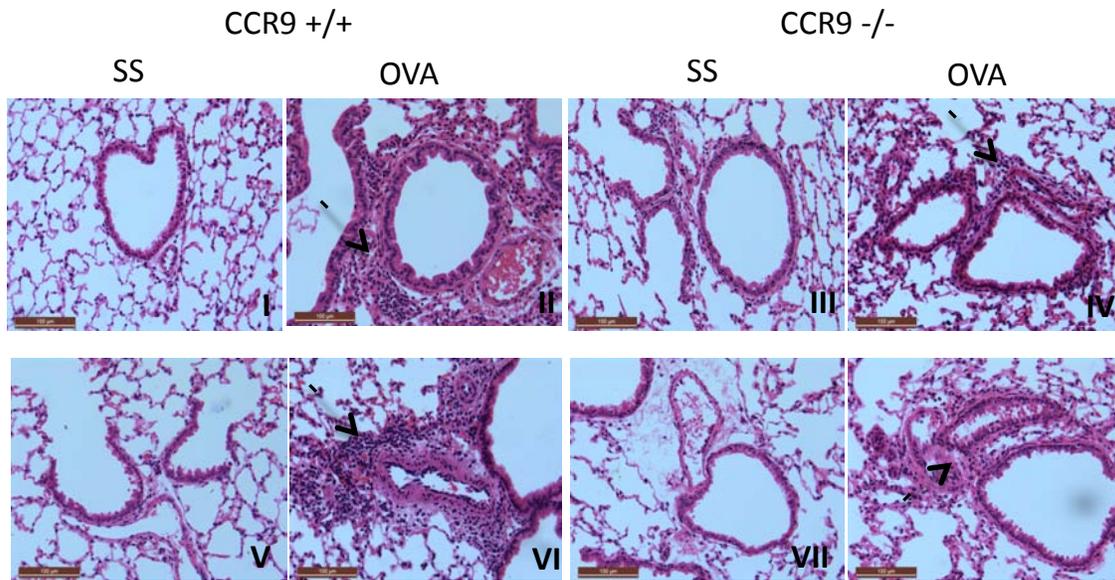


Figura 4. Validación del modelo de inflamación alérgica pulmonar utilizado. A) Número de células presentes en los LBA 24 horas después del último reto con **OVA** por conteo en cámara de Neubauer. **B)** El conteo diferencial mediante citocentrifugación de las células en los LBA y tinción con Wright. **C)** IgE específica para ovoalbúmina por ELISA. **D)** Análisis de EPO presente LBA mediante un ensayo colorimétrico. Gráficos representativos de 3 experimentos independientes n=4-6 *p>0.05

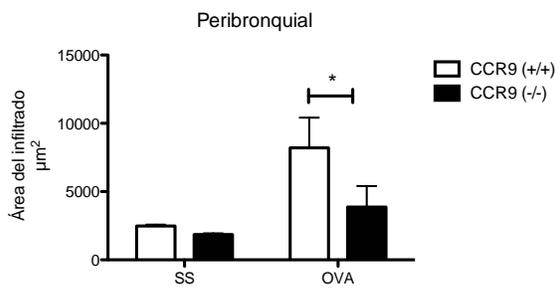
b) Análisis morfológico del proceso inflamatorio en pulmón en ausencia de CCR9.

Para determinar cuantitativamente la importancia en la expresión de CCR9 durante la inflamación tipo asma, se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con H/E (**Fig. 5A**). Como se puede observar, a nivel peribronquial y perivenular, existe menor número de células infiltradas formando el infiltrado inflamatorio. En las micrografías se puede observar que de acuerdo a las características histoquímicas y morfológicas, aunque existen células infiltradas, las células polimorfonucleares y mononucleares se ven severamente disminuidas en los ratones KO, lo cual correlaciona con las células obtenidas en LBA. Para analizar de manera más detallada la cantidad de infiltrado inflamatorio, se realizó la evaluación morfométrica, en la cuál elegimos bronquios y vénulas de semejantes características (en diámetro) y podemos observar disminución significativa de este infiltrado inflamatorio, tal como se había reportado previamente [69] (**Fig. 5B y 5C**).

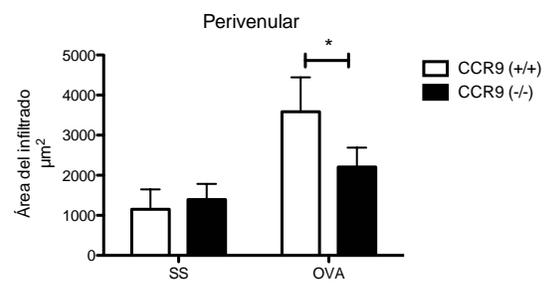
Para determinar la influencia de este receptor de quimiocinas en el microambiente inflamatorio y en la producción de moco, se analizaron cortes histológicos teñidos con PAS. Cualitativamente, la producción de moco (células PAS positivas) no se ve alterada, aún a pesar de que la inflamación está disminuida en ausencia de CCR9; sin embargo, la composición del moco podría estar alterada por la ausencia de CCR9 (**Fig. 5D**) debido a que la distribución es distinta en los bronquiolos. Para analizar un poco más profundamente la composición de este moco, decidimos analizar la expresión de las mucinas involucradas en procesos inflamatorios en el pulmón. De manera interesante, la expresión de MUC5AC, se ve incrementada en ausencia de CCR9. Con estos datos, es claro que CCR9 es un receptor de quimiocinas determinante para el transcurso de la inflamación y el reclutamiento celular inducidos por OVA en el pulmón.



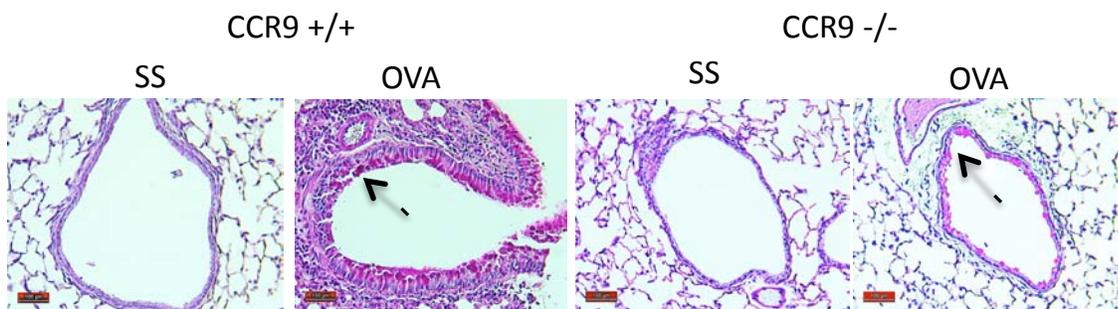
B



C



D



Continuación de Figura 5. Siguiete página

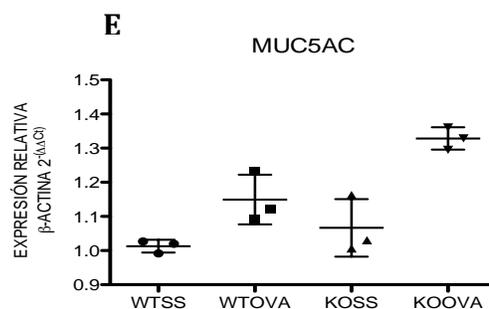


Figura 5. Análisis histológico y de producción de mucinas en pulmones de ratones a 24 horas de un reto con OVA. A Micrografías representativas 200X de cortes de pulmón teñidos con H/E a nivel peribronquial (I-IV) y perivenular (V-VIII). **B)**Análisis morfométrico de bronquios y **C)**Vénulas adyacentes a los bronquios. **D)**Imágenes representativas de cortes teñidos con PAS 200X. **E)** RT-PCR de MUC5AC en tejido pulmonar. Imágenes y gráficos representativos de 3 experimentos independientes n=3-4 *p>0.05

8.2 Evaluación de la actividad quimiotáctica de CCL25 en células provenientes de LBA.

Para determinar la capacidad funcional de las células inflamatorias hacia el ligando de CCR9, se obtuvieron células provenientes de los LBAs y se expusieron a un estímulo de CCL25 en cámara de Boyden. Como se observa en el conteo diferencial, la mayor composición celular de los LBA son linfocitos y eosinófilos (**Fig. 4B**). La quimiocina CCL11, es una de las principales quimiocinas reguladoras de este proceso *in vivo* [78], debido a que tiene efecto agonista en CCR3, el cual es altamente expresado en estas células [79]. Como se observa en la **Figura 6A** entre el rango de 10 y 100 ng/mL podría encontrarse la concentración óptima; sin embargo, sería necesario analizar concentraciones menores a 10 ng/mL y que tal vez no se incrementen en un orden logarítmico. Para definir la concentración a la cual estas células migran más, es necesario proponer nuevas concentraciones menores a 10 ng/mL. En el caso de las células provenientes de los ratones snesibilizados, la migración se ve desfavorecida a mayores concentraciones quimiotácticas, probablemente porque la desensibilización de estos receptores es mucho más rápida (**Fig. 6A**), aunque para poder determinar esto,

necesitamos definir mucho más claramente la migración a concentraciones menores que permitan determinar mejor la desensibilización del receptor.

En el caso de CCL25, se observa que es necesario aumentar la dosis de quimiocina para obtener un mayor efecto, lo cual sugiere que las células, en este tiempo (24 horas) ya no son tan responsivas a este receptor. (**Fig. 6B**).

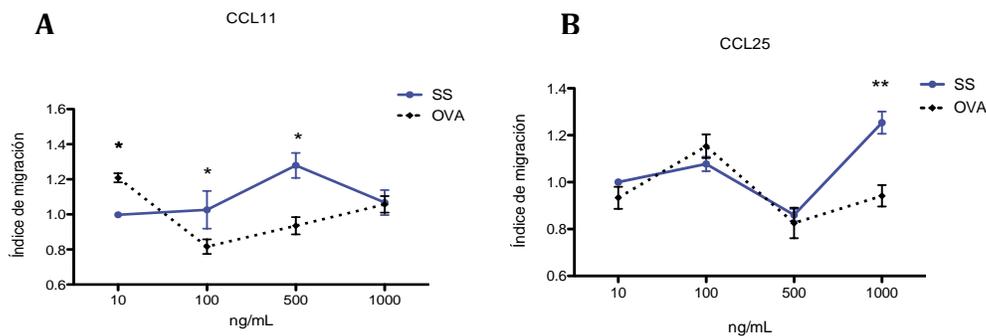


Figura 6. Respuesta quimiotáctica hacia CCL11 y CCL25. Se obtuvieron células provenientes de los lavados broncoalveolares y se estimularon con diferentes dosis (10-1000 ng/mL) de las quimiocinas **A)** CCL11 y **B)** CCL25. Gráficas representativas de 3 experimentos independientes n=3 *p<0.05 **p<0.01

8.3 y 8.4 Análisis de la expresión de CCR9 y su ligando a 6, 24, y 48 horas después el último reto con OVA.

La expresión homeostática de CCR9 solamente se ha reportado en intestino delgado y en timo. En proceso inflamatorios, se ha visto un incremento de CCR9 en en colitis y enfermedad de Crohn. Para encontrar un punto crucial en donde la expresión de CCR9 y su ligando pudieran ser importantes biológicamente durante la inflamación pulmonar, se modificó el protocolo como se muestra en la figura 7 (**Fig 7A**). Se ha descrito que existen puntos críticos en los cuales cambia la expresión de ciertas citocinas y quimiocinas y esta expresión se podría correlacionar con la etapa en la cual las células se encuentren en migración o emigración del pulmón.

En relación con estas quimiocinas, se analizó la expresión de CCR9 y CCL25 en tejido pulmonar. Los datos de RT-PCR muestran que, 24 horas después del primer reto local, (es decir en el día 16), hay un incremento en la expresión de ARNm de CCR9 y que

conforme los ratones recibían el estímulo con OVA cada día, esta expresión se incrementa. Por otro lado, después del último reto, en el cual solamente es un reto local con OVA cinco veces más concentrada, se induce una expresión de CCR9 desde las 6 horas o probablemente desde antes (**Fig. 7B y 7C**).

La máxima cantidad de ARNm de CCR9 en pulmón, se observa a las 24 horas. A las 48 horas, aun se detectó ARNm de CCR9, aunque al parecer la expresión a este tiempo comienza a disminuir. Los datos sugieren que la mayor expresión de CCR9 en pulmón pudiera aparecer a partir e las 6 horas o desde antes, para lo cual es necesario evaluar la presencia de CCR9 como proteína, las poblaciones celulares que la expresan y también correlacionarlo con su ligando.

En cuanto al ARNm de CCL25, de manera interesante, la cinética de expresión, corresponde con la de CCR9. Como se puede observar, en condiciones silvestres, la máxima expresión se observó a las 6 horas de los tiempos analizados (**Fig. 7D**); sin embargo, es necesario analizar desde antes esta expresión. Por otro lado, algo muy interesante, es que en ausencia de CCR9 (**Fig. 7E**), la expresión del ligando disminuye significativamente, lo cual sugiere que los mecanismos que inducen la expresión de esta quimiocina, dependen de los estímulos del microambiente, el cual a su vez, podría estar regulado por las células residentes o inflamatorias que expresan CCR9 en la cepa silvestre.

Estos datos indican, que además de que la expresión de CCR9 y su ligando son inducibles en el pulmón en condiciones inflamatorias, esta expresión requiere de una regulación importante mediada por el microambiente inflamatorios inducido por OVA.

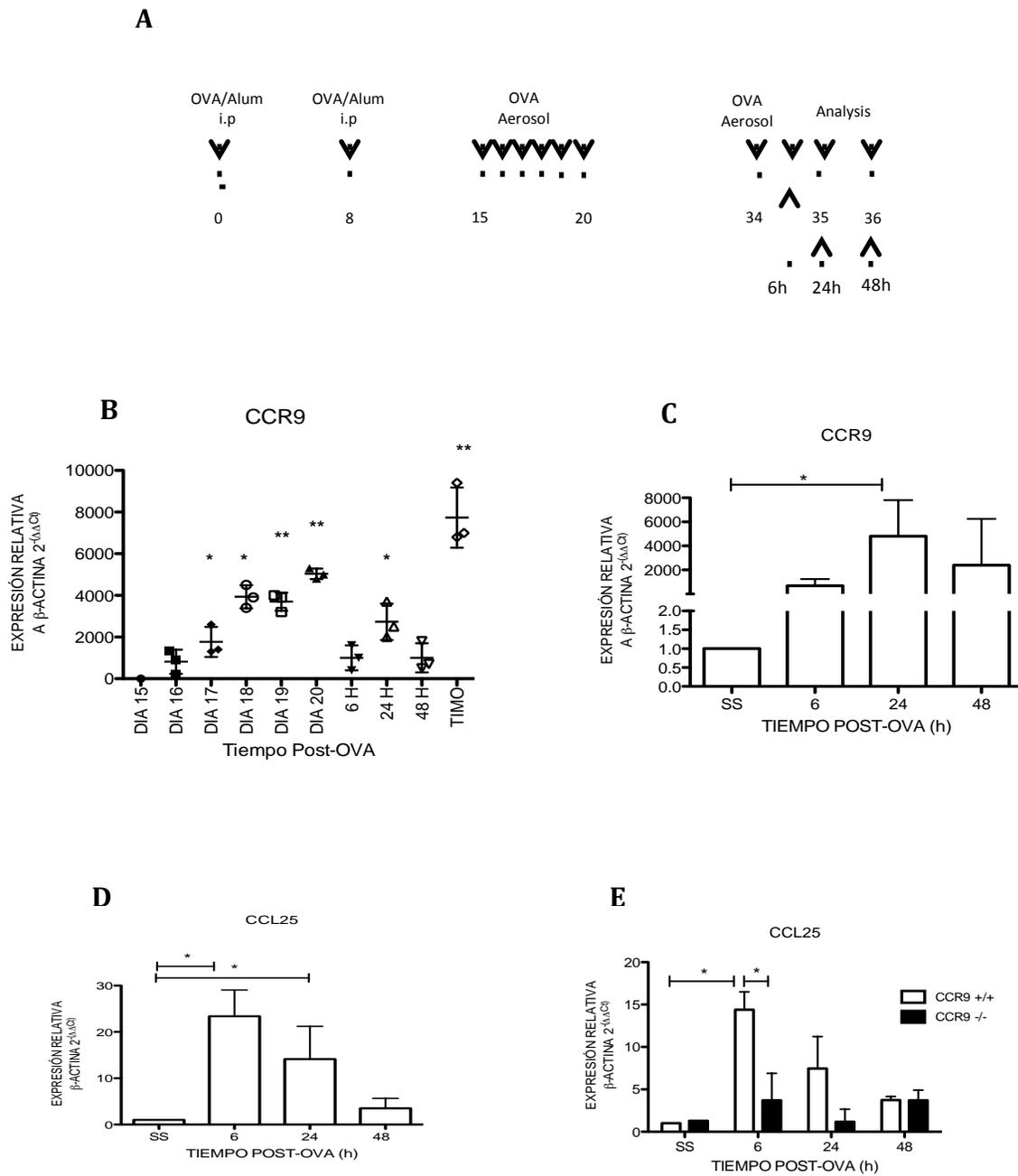


Figura 7. Análisis de la cinética de la expresión de CCR9 y su ligando en tejido pulmonar inducidos por OVA ALum y después por un reto con OVA en aerosol. A) Modificación al modelo de OVA utilizado. Se añadieron los tiempos de análisis de 6, 24 y 48 horas. B) RT-PCR de CCR9 en tejido pulmonar evaluado los días 16-20 después del primer reto local con OVA y **C**) 6, 24 y 48 horas después del último reto local con OVA (día 34, 35 y 36) **D**) CCL25 en tejido pulmonar completo, evaluados a 6,24,48 horas del último reto **E**) El ARNm de CCL25 se determinó también en ratones KO.

Gráficas representativas de 2-3 experimentos independientes. n=3 *p<0.05

8.5 Análisis de la producción de CCL25 en tejido pulmonar y en LBA.

Para determinar la producción de CCL25 y correlacionarla con la expresión de CCR9, determinamos la cantidad de CCL25 presente en LBA mediante ELISA. De manera interesante, observamos que la cantidad determinada de CCL25 a las 6 horas (200 pg/mL) fue significativamente menor incluso que los ratones del grupo de solución salina (**Fig. 8A**).

Esto pareciera contrastar con los resultados por RT-PCR en tiempo real acerca de la cinética en la que se expresa en ARNm de la quimiocina; sin embargo, para analizar con mayor detalle la producción de CCL25 en el tejido y conocer cuáles son las células productoras de la quimiocina, se realizaron cortes histológicos nuevamente y se detectó a CCL25 mediante inmunohistoquímica.

En los cortes histológicos (**Fig. 8B**), en primer lugar se puede observar que la producción de la proteína está limitada a las células epiteliales y no es posible detectarla prácticamente, por esta técnica en las células inflamatorias.

Por otro lado, únicamente fuimos capaces de detectar CCL25 a las 6 horas y que esta producción se ve severamente disminuida a las 24 horas. Se determinó esta expresión a las 48 horas, sin embargo, a este tiempo no fue posible detectar a la quimiocina. Por otro lado, en congruencia con los resultados de PCR, los ratones deficientes de CCR9, muestran mucha menor producción del ligando tanto a las 6, como a las 24 horas. Estos resultados muestran que CCL25 es inducible en pulmón y que la proteína puede detectarse a las 6 horas, además de que sugieren que el consumo por estas células que expresan CCR9 podría ser mayor a este tiempo.

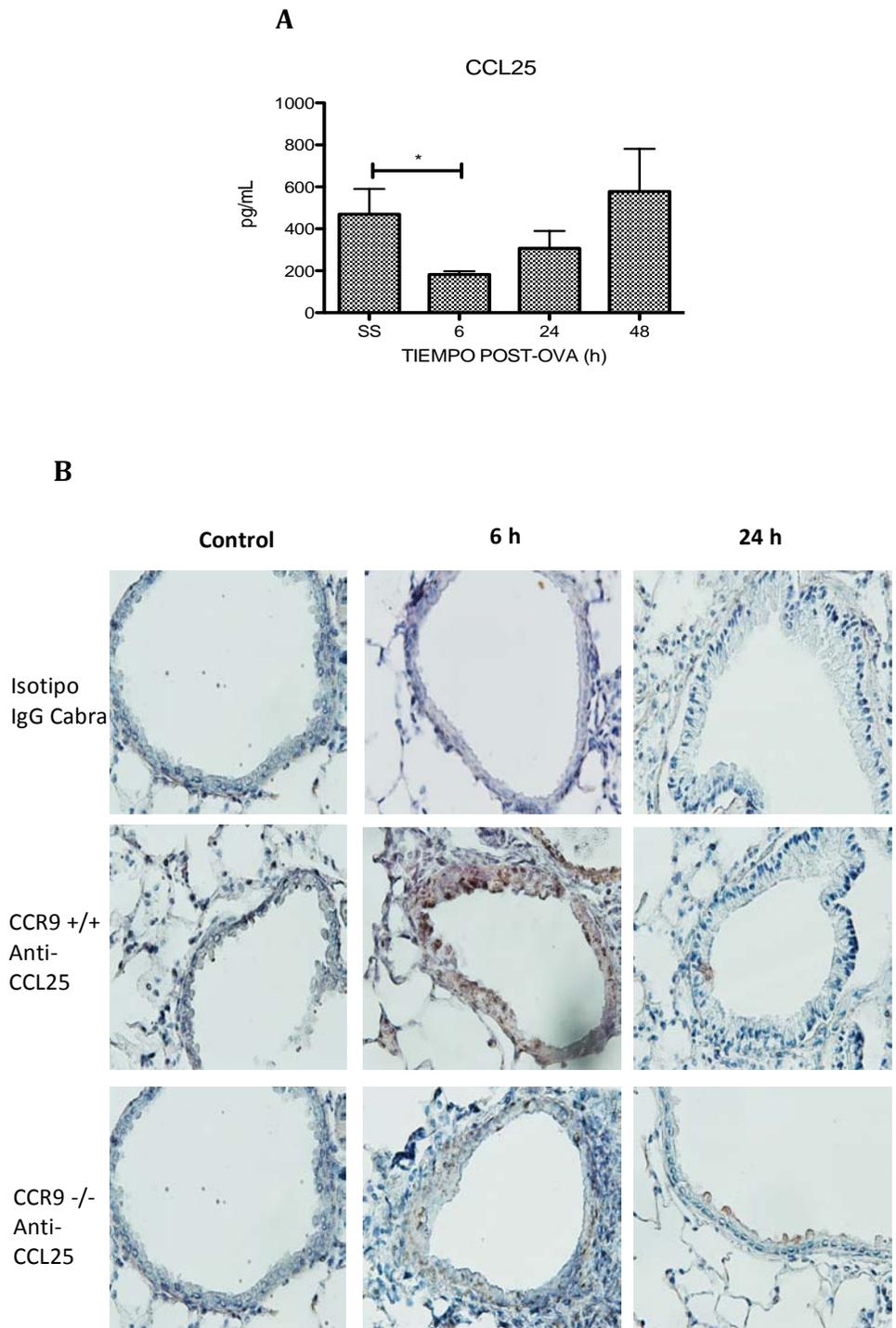


Figura 8. Determinación de la producción de CCL25 en los ratones retados con OVA. A) Determinación de CCL25 por ELISA en LBA a diferentes tiempos. **B)** Análisis inmunohistoquímico de CCL25 en bronquios del tejido pulmonar a 6 y 24 horas del último reto con OVA. Imágenes 200X. Representativas de 2 experimentos independientes n=3 *p<0.05

8.6 Determinación de la expresión de mediadores pro-inflamatorios importantes en la inflamación alérgica pulmonar.

8.6.1 Incremento de mRNA de CCR3, CCL11, IL-5 e IL-10

Previamente, nuestros datos habían sugerido que CCR9 podría estar relacionado con la expresión de CCR3 y uno de sus ligandos, moléculas que están muy involucradas con la migración de eosinófilos y linfocitos T [71], sin embargo, nuestros experimentos no habían podido demostrar de manera franca si existía un tiempo en el cual existiera mayor dependencia en la expresión de CCR9 para que incrementaran su expresión. Por esto, se analizó la expresión de estas moléculas, así como de la IL-5 e IL-10, en diferentes tiempos analizados durante este modelo de inflamación. Para determinar esta relación y su importancia en tiempos muy cortos de la inflamación, analizamos la expresión de mediadores tipo Th2 en diferentes etapas (**Fig. 9A**).

CCR3 es receptor para las quimiocinas CCL11, CCL12, CCL13, CCL26 y CCL28. Todas estas quimiocinas se incrementan en procesos alérgicos tipo Th2. En este modelo de inflamación, la mayor expresión de mRNA de esta molécula, se observa a las 24 horas; sin embargo en ausencia de CCR9, esta expresión no logra incrementarse en la misma magnitud. En el caso de uno de sus ligandos, la eotaxina (CCL11), la mayor cantidad mRNA que podemos ver, se induce a las 24 horas. Sin embargo existe una disminución en la expresión de la quimiocina en los ratones que no expresan CCR9 (**Fig. 9B**).

Como se observa (**Fig 9C**), la expresión de IL-5 se ve incrementada a las 6 horas y este incremento se mantiene incluso a las 48 horas. Al comparar esta expresión con los ratones deficientes de CCR9, observamos que el mRNA de IL-5 es significativamente menor que en ratones silvestres.

Para analizar el impacto de la ausencia de CCR9 en las citocinas que pueden tener propiedad inmunosupresora a lo largo del tiempo, determinamos que 24 horas después de la estimulación con OVA, la citocina IL-10 tiene un punto máximo de producción en los ratones silvestres. Es necesario mencionar que en los ratones deficientes de CCR9, este incremento no se observa a nivel transcripcional. Sin embargo aún faltaría

determinar la cantidad de proteína en el sobrenadante para determinar si algo de esta citocina se está acumulando (**Fig. 9D**).

Estos datos sugieren que las citocinas importantes para definir el microambiente inflamatorio durante este proceso, son afectadas en ausencia de CCR9 y esta dependencia varía en función de la etapa de este proceso.

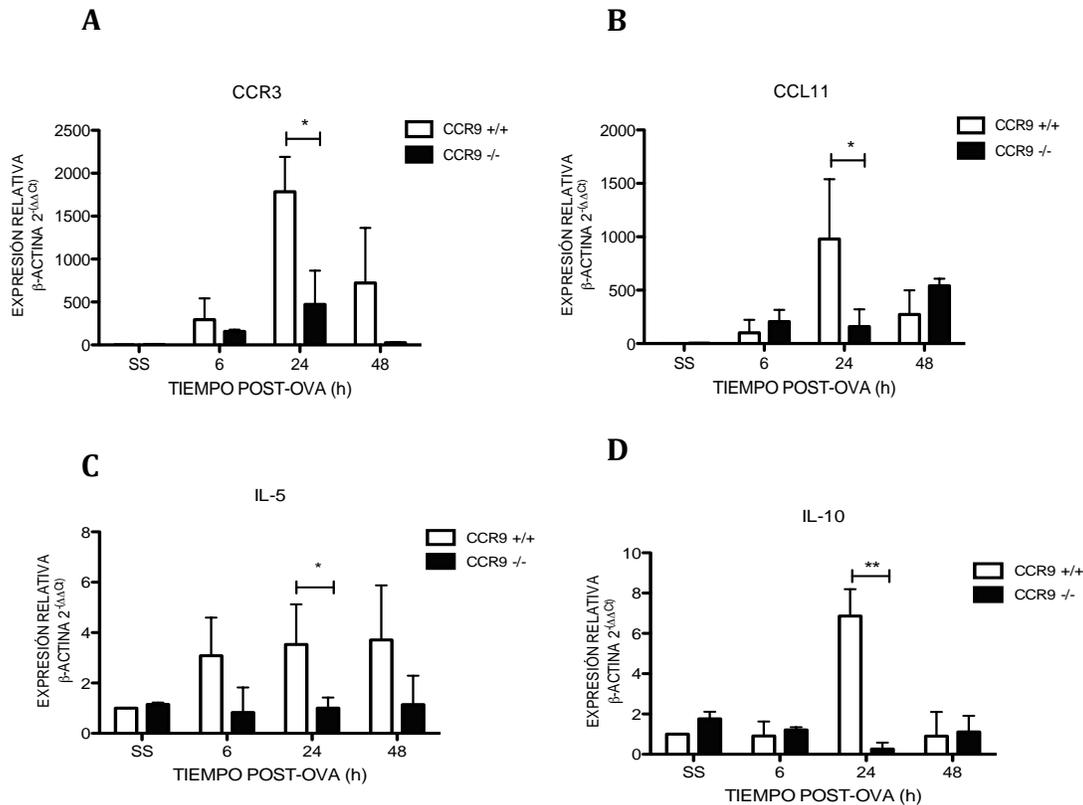


Figura 9. Determinación de la expresión de mediadores pro-inflamatorios en los ratones retados con OVA. Análisis de **A) CCR3**, **B) CCL11**, **C) IL-5** e **D) IL-10** por RT-PCR en tiempo real en tejido pulmonar a diferentes tiempos después de la última estimulación con OVA. Figuras representativas de 2 experimentos independientes n=3 *p<0.05 **p<0.01

8.6.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias en LBA a diferentes tiempos de la IAP

Para analizar el impacto de la respuesta inflamatoria en el pulmón de los ratones en ausencia de CCR9, se utilizó un sistema comercial basado en el ensayo de ELISA para determinar citocinas pro-inflamatorias en los LBA, que nos pudiera dar indicios de alguna dependencia de la expresión de CCR9 por alguna de estas citocinas. Este sistema comercial de ELISA en lugar de reportar concentraciones de citocinas basadas en una curva estándar, permite observar diferencias relativas entre un grupo y otro (**Fig. 10**). Como se observa en la figura (**Fig. 10**), en el caso de TGF- β en el sobrenadante proveniente de los ratones *knock out*, hay mayor cantidad de citocina a las 6 h (0.6 vs 0.025) y también a las 24 horas (0.1 vs 0.03) después del estímulo con OVA (**Fig. 10**). La producción de IL-17, es uno de los mecanismos que se regulan durante la inflamación alérgica en pulmón [80]. En el caso de la IL-17A, también se observa un acúmulo de esta citocina en ausencia de CCR9 sobretodo y horas después de la broncoprovocación (0.08 vs 0.02). En cuanto a la IL-23, esta citocina es producida principalmente por células dendríticas activadas y su efecto principal es inducir proliferación en linfocitos T de memoria CD4+CD45Rb [81] y en algunos estudios se ha sugerido que ejerce un efecto antagónico a la IL-12. Esta citocina pareciera acumularse más en ausencia de CCR9, sobretodo en la etapa tardía (0.04 vs 0.01). Por otro lado, uno de los principales factores que induce la diferenciación de células epiteliales a células productoras de moco es la IL-13 [82-84]. En este modelo, se ven hasta cinco veces más de IL-13 en los ratones deficientes de CCR9, sobretodo a las 6 horas (0.05 vs 0.01) (**Fig. 10**). Una de las citocinas que podría antagonizar a la respuesta Th2 es la IL-12, sin embargo, el papel de esta citocina depende de la etapa de la inflamación, debido a que durante los retos por nebulización, podría contribuir a la eosinofilia y citocinas Th2 [85]. En este modelo se ve acumulada en ausencia de CCR9 sobretodo a las 6 horas (0.013 vs 0.003), lo cual sugiere que en etapas tempranas, la acumulación de esta citocina podría impactar poblaciones celulares de células dendríticas.

El papel de IL-6 durante la inflamación en el pulmón aún no está muy claro, sin embargo se ha demostrado que esta citocina se incrementa en los pacientes con asma [86, 87]. En ausencia de CCR9 esta citocina se acumula sobretodo en etapa temprana después del reto (0.045 vs 0.02). Por lo que pareciera depender de la expresión de CCR9 en los primeros momentos de la inflamación para expresarse o utilizarse de manera normal.

El IFN- γ es una citocina que actúa como un modulador que antagoniza la respuesta Th2. En algunos casos, se ha observado como un efector, producto de la secreción de IL-12. Esta citocina tiene un efecto directo sobre los linfocitos Th1 y según los datos reportados aquí, esta citocina depende de CCR9 para producirse o utilizarse en manera semejante a las condiciones *wild-type* (0.11 vs. 0.03) en etapas tempranas (6 horas) (**Fig. 10**), lo cual pudiera correlacionar con los niveles de IL-12 que también se veían afectados por la ausencia de CCR9 en etapas tempranas. Finalmente, la IL-2 encontrada en el sobrenadante también podría indicar la activación y consumo de esta citocina por los linfocitos T [88]. El hecho de que esta citocina se incremente, podría estar asociado a una activación de las células T lo cual correlaciona con lo reportado; sin embargo en ausencia de CCR9, esta citocina se observa acumulada, sobretodo a las 6 horas, lo cual podría apoyar la idea de que existe menos activación y por ende, proliferación de los linfocitos T.

Estos datos en conjunto, indican que CCR9 es importante para regular la producción y/o el consumo de citocinas en el pulmón durante la inflamación asociada al estímulo con OVA.

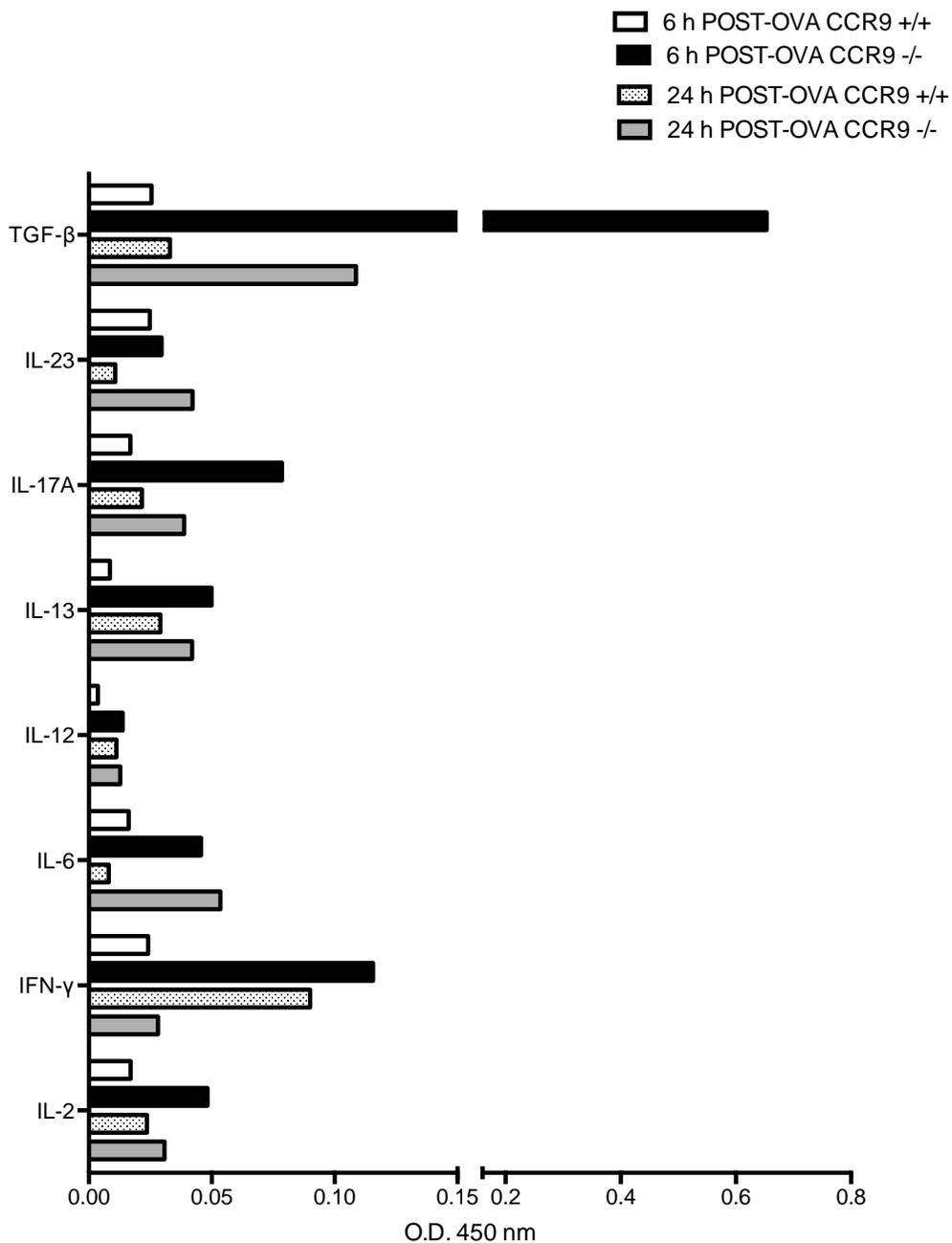


Figura 10. Determinación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias en los ratones inflamados por OVA. Detección de citocinas pro inflamatorias en LBA por ELISA y detectadas a 450 nm por espectrofotometría. Figura proveniente de la mezcla de 6 diferentes lavados correspondientes a 2 experimentos independientes.

8.7 Caracterización de las subpoblaciones celulares en lavados broncoalveolares a 6, 24 y 48 horas después del estímulo con OVA.

8.7.1 Caracterización de los eosinófilos CCR9+

Los datos reportados en este trabajo y en trabajos previos de este grupo de investigación, indican que CCR9 y su ligando, la quimiocina CCL25 son moléculas inducibles en el pulmón en condiciones inflamatorias [69, 71]. Aún no existen datos claros acerca de cuáles son las células que expresan este receptor de quimiocinas de tal manera que modifican los eosinófilos reclutados al pulmón 24 horas después del reto con OVA. Para analizar la expresión directa de CCR9 en los eosinófilos pulmonares, analizamos estas células en LBA por citometría de flujo.

Previamente se han validado las caracterizaciones fenotípicas de las distintas poblaciones celulares presentes en un LBA por citometría de flujo [89-91]. En estos trabajos se ha establecido que las principales poblaciones pueden distinguirse inicialmente de acuerdo a su tamaño y granularidad en: linfocitos, granulocitos (en donde hay eosinófilos principalmente) y monocitos/macrófagos. En la **figura 11A** se ejemplifica uno de estos métodos de validación [90]. En la **figura 11B** se muestran diagramas de puntos correspondientes a los LBA y al método de análisis para agrupar a cada población dependiendo de los parámetros de tamaño y granularidad. Como se observa en los diagramas, las poblaciones varían en porcentaje dependiendo de la etapa de alergia pulmonar. Consistente con otros datos de conteos diferenciales, existe un incremento de linfocitos a partir de las 6 horas el cual se mantiene hasta las 48 horas; sin embargo, en el caso de los eosinófilos, existe una población que comienza a incrementarse en porcentaje a partir de las 6 horas y que disminuye a partir de las 24 horas, tiempo en el cual se observa un pico de aparición de estas células en el LBA. Por otro lado, el porcentaje de monocitos pareciera no variar en función del tiempo; sin embargo el número de células con estas características morfológicas sí disminuye a medida que aumenta la población de eosinófilos. (**Figura 11B**)

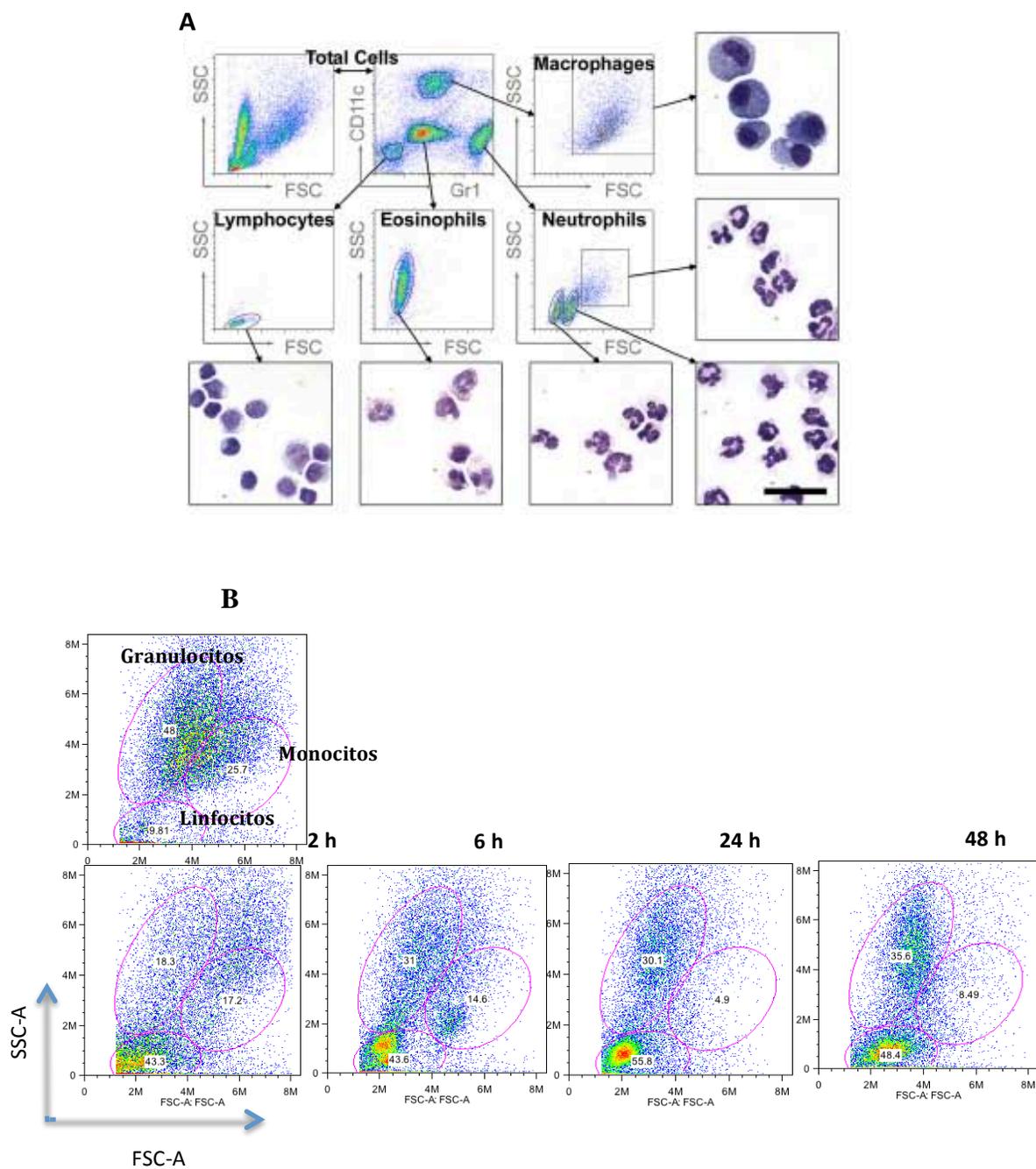


Figura 11. Determinación de las poblaciones celulares en función del tiempo en el modelo de inflamación pulmonar por OVA. A) Método validado para elegir regiones de análisis de diferentes poblaciones en LBA [90]. **B)** Diagramas de puntos correspondientes a los LBA de ratones analizados 2, 6, 24 y 48 horas después del último reto con OVA. Poblaciones divididas en región linfocitos, región granulocitos y región monocitos, analizadas posteriormente. Imágenes representativas n=6 de 2 experimentos independientes.

La molécula Siglec-F es una molécula perteneciente a la familia de sialomucinas. Esta molécula posee en su porción intracelular un dominio inhibitorio y en su porción extracelular varios dominios de inmunoglobulina. Esta molécula es expresada en la membrana celular de los eosinófilos [92]. Esta molécula se ha utilizado en los últimos años como un marcador específico de eosinófilos y macrófagos alveolares; sin embargo por las características de tamaño y granularidad, estas células pueden ser distinguidas por el siguiente fenotipo: Siglec-F+ SSC^{hi}. Con base en este fenotipo, seleccionamos a estas células como eosinófilos [93, 94] y como se puede observar en la figura 11, estas células aumentan en porcentaje y número en función del tiempo, con un pico a las 24 horas como se ha reportado en otros modelos. De manera interesante, en los ratones KO, este porcentaje es significativamente menor a las 24 horas, como nosotros habíamos reportado en trabajos previos, pero además, desde los primeros minutos (2 horas) esta diferencia comienza a verse y se vuelve significativa a las 6 horas (**Fig. 12 B**). Finalmente, a las 48 horas, cuando los mecanismos que mantienen a los eosinófilos en el pulmón pudieran estar cambiando, esta diferencia ya no se observa en ausencia de CCR9 (**Figura 12B y 12C**). Estos datos indican que la expresión de CCR9 es crucial para la presencia de los eosinófilos en el LBA durante la inflamación pulmonar desde etapas tempranas.

Por otro lado, la disminución de eosinófilos 24 horas después de la OVA, sugiere que los eosinófilos pudieran expresar CCR9 en condiciones WT, pero también existe la posibilidad de que esta disminución sea efecto de la disminución de mediadores quimiotácticos para estas células. Por lo cual, en los ratones KO era necesario determinar si los eosinófilos son capaces de expresar CCR9 durante la inflamación en condiciones WT. Para lo cual, realizamos este análisis por citometría de flujo.

La expresión de CCR9 es incrementada después del estímulo con OVA. En la **figura 13 (Fig. 13A y 13B)**, se indica que esta expresión en los eosinófilos es más significativa a las 2 horas, a pesar de que habíamos observado que en este tiempo, apenas comienza a ser representativa esta población.

La expresión sigue siendo significativa en esta población a las 6 horas, en donde el mayor número de eosinófilos expresan CCR9. A partir de este tiempo, a pesar de que a

las 24 horas es el punto en el cual se recluta la mayor cantidad de eosinófilos, sólo un bajo porcentaje de estos expresan CCR9, lo que podría sugerir que en este punto, existen otros mediadores que son mejores inductores de la migración de estos eosinófilos, lo cual podría correlacionar con los datos de quimiotaxis *ex vivo* hacia CCL25 (**Figura 6B**). En conjunto estos datos indican que si existe un punto crucial en el que CCR9 dirige directamente el reclutamiento de eosinófilos al pulmón, es entre las 2 y 6 horas después del reto antigénico.

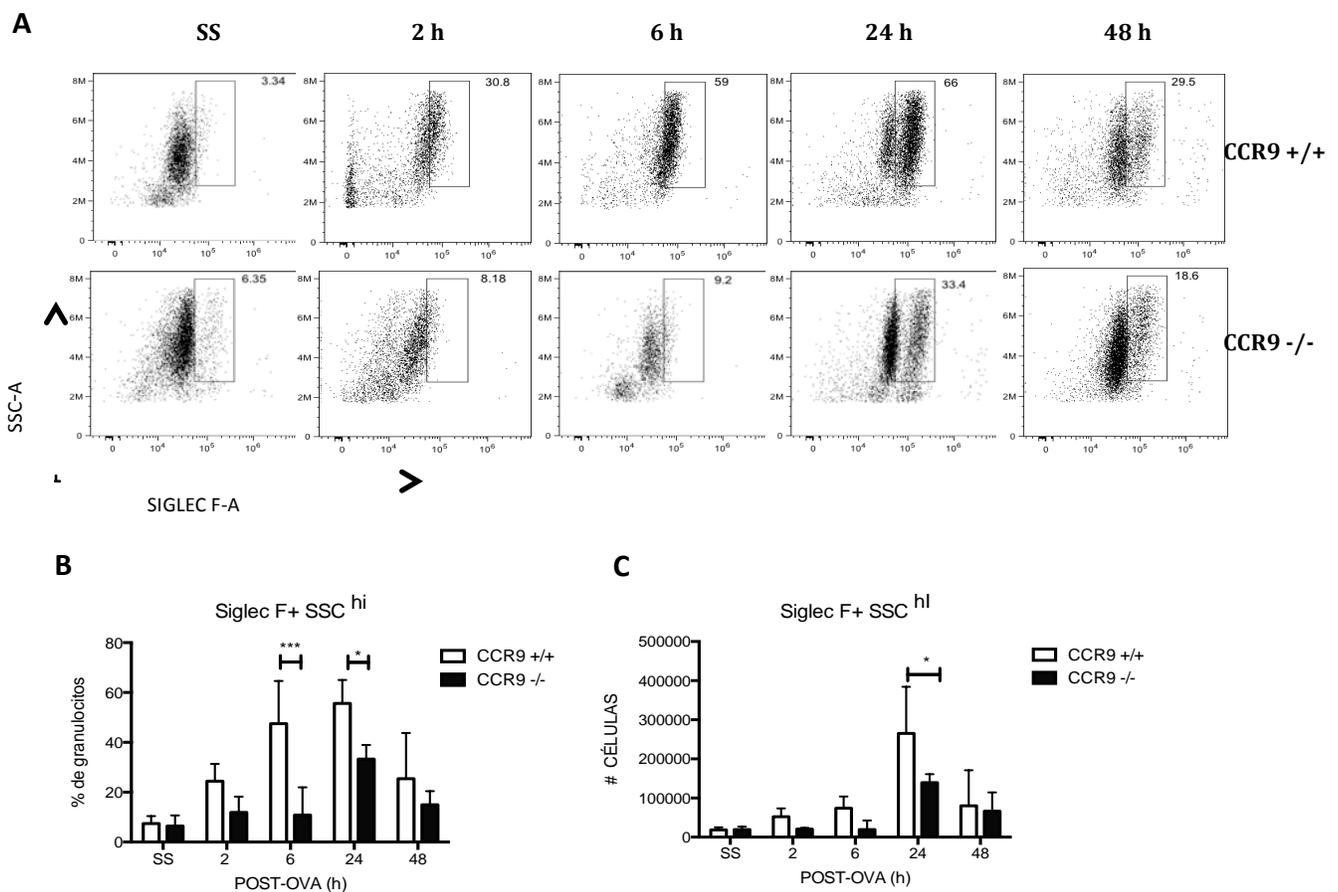


Figura 12. Cuantificación de eosinófilos en LBA. A) Diagramas de puntos correspondientes a la población que representa a los eosinófilos. **B)** Cuantificación en porcentaje y números de células **C)** Cuantificación de las células CCR9+ por citometría de flujo. Imágenes y gráficos representativos de 2 experimentos independientes n=4 *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

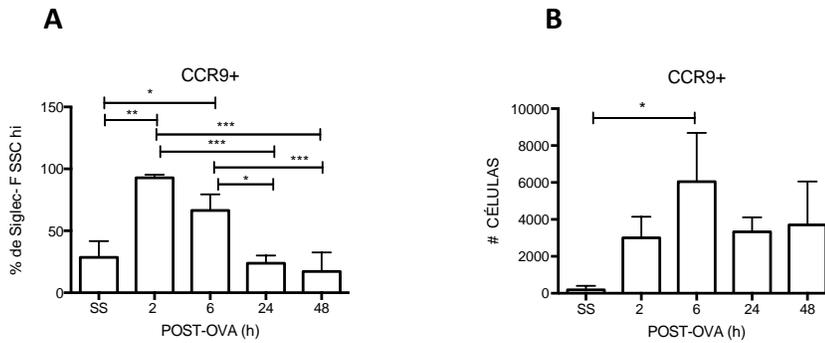


Figura 13. Determinación de la expresión de CCR9 en eosinófilos en LBA. A) Porcentaje y **B)** Número de células por citometría de flujo. Gráficos representativos de 2 experimentos independientes n=4 *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Para correlacionar fenotípicamente la expresión de CCR9 con otras moléculas clásicas en los eosinófilos; se determinó la expresión de CCR3 en los eosinófilos; ésta es determinante para que estas células lleguen al pulmón. Como se observa en la figura 14, casi toda la población de eosinófilos es positiva para esta molécula; por otro lado, era necesario determinar, si en los ratones WT, la expresión de CCR9 correlaciona con la expresión de CCR3. Como se observa (**Fig. 14A**), a partir de las 2 horas, los eosinófilos ya son capaces de expresar ambas moléculas y esta coexpresión se mantiene hasta las 24 h. Por otro lado, Siglec-F es una molécula que posee dominios ITIM, por lo cual se considera como una molécula inhibitoria y por lo tanto se considera un marcador de activación en los eosinófilos [92, 95]. Uno de los efectos que podría tener la deficiencia de CCR9 en estos eosinófilos en el pulmón, es una disminución en la activación, por lo cual, determinamos la IMF de Siglec-F como una manera de analizar este efecto. Como se observa en los datos (**Fig. 14B**), la ausencia de CCR9, no modifica la expresión de Siglec-F. En conjunto estos datos indican que CCR9 podría tener un efecto quimiotáctico solamente, aunque es necesario determinar otros parámetros como supervivencia, apoptosis o degranulación.

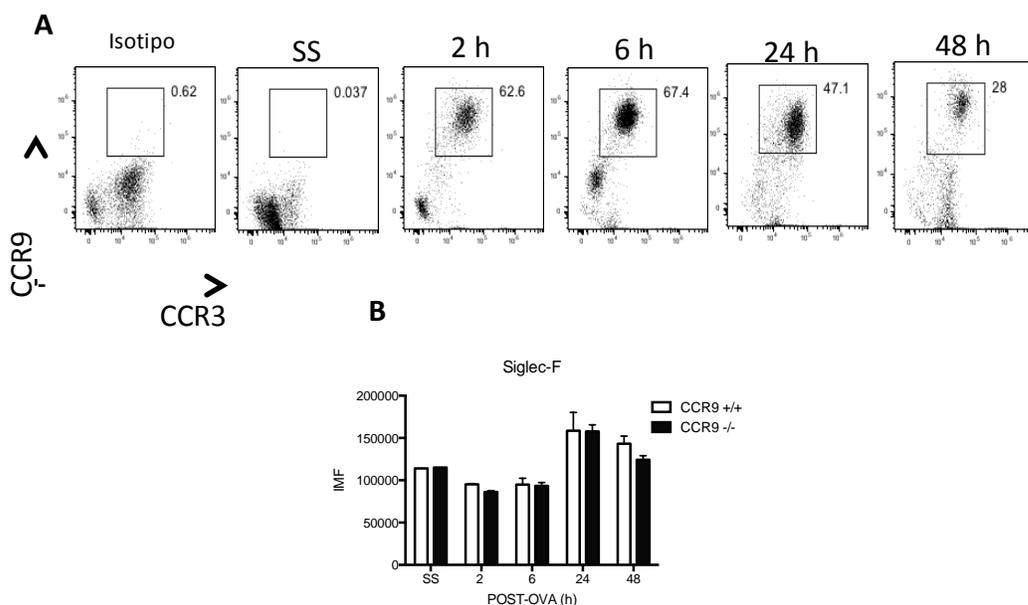


Figura 14. Análisis fenotípico de moléculas expresadas en eosinófilos en LBA que dependen de CCR9. A) Diagramas de puntos correspondientes a las células provenientes de LBA que coexpresan CCR9 y CCR3, seleccionados en la región en Siglec F+ SSC-hi. **B)** Intensidad media de fluorescencia de Siglec F. Gráficos representativos de 2 experimentos independientes n=4

8.7.2 Caracterización de los linfocitos T CCR9+

Los antecedentes de la expresión de CCR9 son numerosos. En algunos casos, se ha estudiado la expresión de CCR9 en células T efectoras y en linfocitos T reguladores. Los linfocitos T tanto CD4 como CD8 son moduladores muy importantes del proceso por la secreción de citocinas que contribuyen al microambiente inflamatorio [96, 97]. Para analizar el impacto de CCR9 en el reclutamiento de los linfocitos T, analizamos estas células por citometría de flujo.

Como se observa en la figura, de las células analizadas en la región de linfocitos (**Fig. 10B**), se cuantificaron las que expresan los marcadores CD4 o CD8 (**Fig. 15A**).

Los linfocitos T CD4 comienzan a incrementarse a partir de las 6 y hasta las 48 horas en los LBA. De manera interesante, este incremento en el porcentaje se ve severamente afectado a las 6 horas en los ratones deficientes de CCR9 y esta diferencia parece ser compensada a las 48 horas, lo cual sugiere que en esta etapa

podría no afectar la expresión de CCR9 y su interacción con CCL25 para que los linfocitos sean reclutados al pulmón (**Figura 15B**). En cuanto al número de estas células, parece no estar afectado, lo cual sugiere que la disminución de linfocitos T CD4 en la región de linfocitos es la más afectada en ausencia de CCR9.

Por otro lado, los linfocitos T CD8 parecen contribuir a este proceso inflamatorio a través de la secreción de citocinas como IL-13 [98]. Los linfocitos T CD8+ son capaces de expresar CCR9 aun en etapas tardías del proceso de maduración y mantienen esta expresión en los órganos linfoides secundarios [99].

Por esta razón, decidimos analizar el impacto que tiene la ausencia de CCR9 en la población de linfocitos T CD8; como se observa (**Fig. 15D-E**), el incremento significativo de linfocitos T CD8+ comienza a ser significativo a partir de las 24 horas, es decir, en etapas tardías de la inflamación como se ha reportado previamente [98, 100], existe una disminución en los linfocitos T reclutados a las 24 en los LBA, sin embargo con el número de experimentos realizados hasta ahora, esta diferencia no es significativa y a las 48 horas, parece restablecerse el porcentaje y el número de células en los ratones deficientes de CCR9. Con estos datos, se puede sugerir que CCR9 es importante para el reclutamiento de linfocitos T CD4+ a las 24 horas y los linfocitos T CD8 no parecen depender tanto de CCR9 para localizarse en pulmón.

Cuando se investigó la expresión de CCR9 en estas células (**Fig. 16A-B**), se observó que en el caso de los linfocitos T CD4+, existe un incremento significativo de las células positivas para CCR9 hasta las 48 horas, es decir en una etapa considerada como tardía, a pesar de que existe una tendencia desde las 24. Algo importante de comentar es que en la población de linfocitos T CD4+, sólo un bajo porcentaje de estas células expresan este receptor (2-3%) a las 24 y (5%) a las 48 horas (**Fig. 16A-B**). A pesar de esto, el porcentaje de linfocitos T CD4+ disminuye casi en 50% en ausencia de CCR9, lo que podría sugerir que los factores que se afectan por CCR9, pueden ser otras células como las células dendríticas o los mediadores inflamatorios que se modifican por la deficiencia de este receptor.

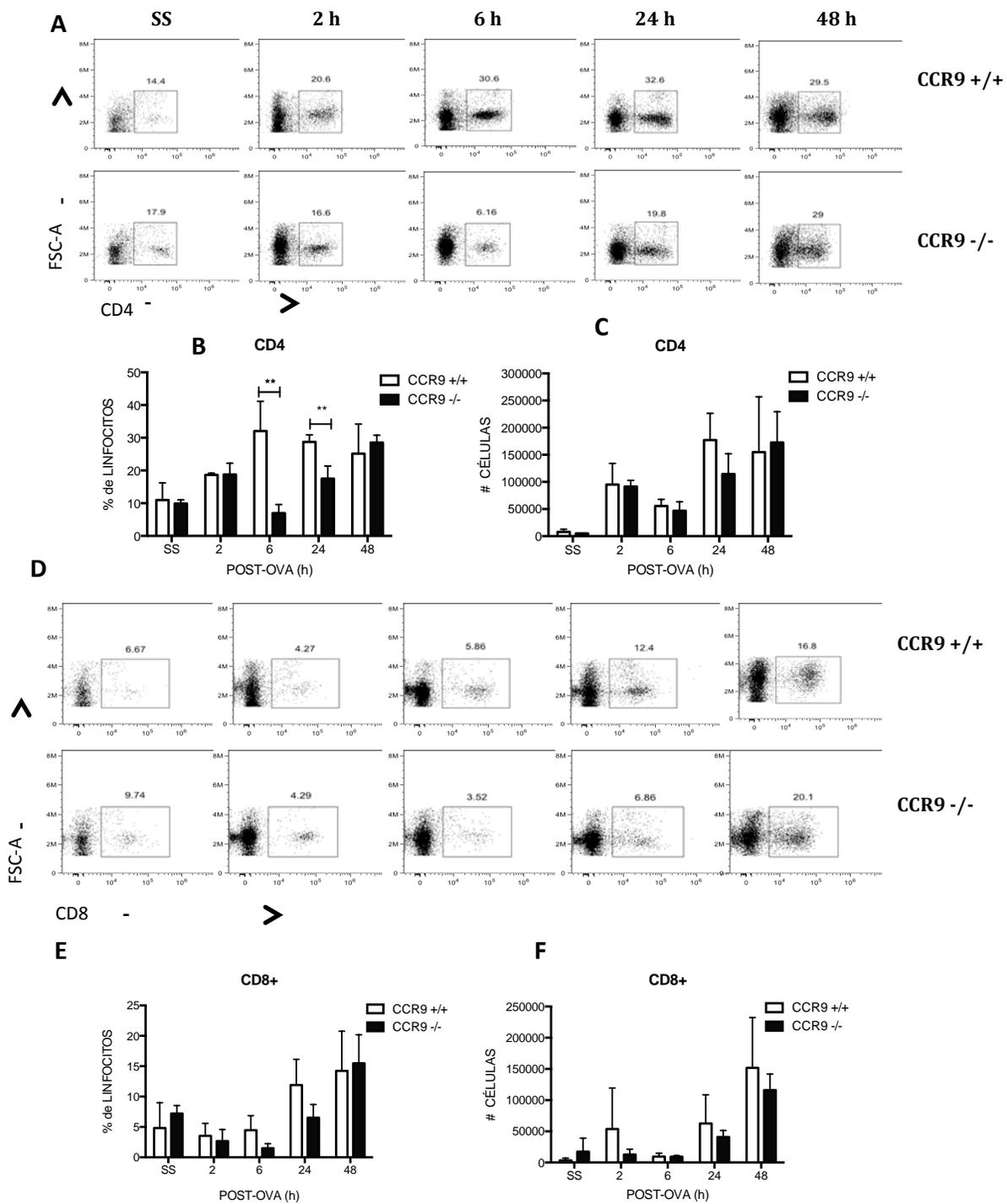


Figura 15. Cuantificación de linfocitos en LBA. A) Diagramas de puntos correspondientes a la región que representa a los linfocitos T CD4+ y **D)** CD8+ analizados en la región “linfocitos”. **B)** y **E)** Cuantificación en porcentaje y **C)** y **F)** números de células. Imágenes y gráficos representativos de 2 experimentos independientes n=4 **p<0.01

En el caso de CCR9 en los linfocitos T CD8+, de manera interesante se observa que solamente se observa incremento significativo de esta molécula a las 48 horas, tiempo en el cual en estos linfocitos ya no está disminuida esta población. Lo que se observa también es que a diferencia de los linfocitos T CD4+, en esta subpoblación, la expresión de CCR9 es mucho más representativa de la población total, ya que corresponde a un 38% del total del linfocitos CD8+, los que expresan CCR9, incluso en número de células (Fig. 16C y 16D). Sin embargo, esto corresponde con los estudios que indican que los linfocitos T CD8+ expresan más CCR9 que los T CD4+ desde que emigran del timo [99].

Estos datos indican que la expresión de CCR9 es importante para el reclutamiento de linfocitos T CD4 y CD8+; sin embargo no por su expresión intrínseca, sino porque CCR9 se comporta como un modulador importante de otros factores importantes que favorecen la migración de estos linfocitos, incluso su activación o proliferación en el pulmón.

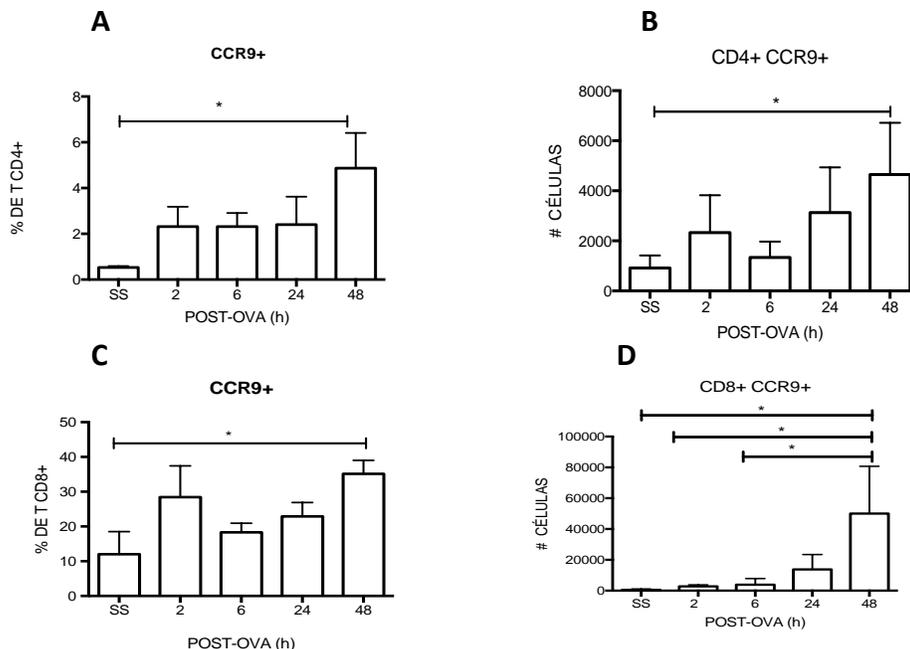


Figura 16. Determinación de la expresión de CCR9 en linfocitos provenientes de LBA.

Cuantificación de los linfocitos CCR9+ analizados en la región de linfocitos de los LBA **A)** Porcentaje de los linfocitos CD4+ **C)** CD8+ y **B)** números de células de los CD4+ y **D)** CD8+. Gráficos representativos de 2 experimentos independientes n=4 *p<0.05

8.7.3 Determinación de las células CD11c+ MHCII+ en ausencia de CCR9.

Una posible explicación de por qué hay menor respuesta de linfocitos T, podría ser resultado de una migración o activación deficiente de las células dendríticas. Se ha reportado que la expresión homeostática de CCR9 es en linfocitos T y en células dendríticas, sin embargo, este estudio a nivel pulmonar aún no se ha realizado y tampoco en una condición inflamatoria. Por este motivo decidimos analizar localización de estas células en el pulmón. Algo que es necesario definir es que en el pulmón existen distintas subpoblaciones de células dendríticas, sin embargo, en un primer acercamiento decidimos definir como células que co-expresan CD11c y MHCII+.

En los datos podemos observar que existe una disminución severa de células dobles positivas para estos marcadores desde etapas muy tempranas de la inflamación (**Fig. 17A**). De todas las células CD11c+ en las que podrían haber algunos macrófagos, el porcentaje de células doble positivas para MHCII disminuye hasta tres veces en porcentaje. En cuanto al número de células, la mayor disminución se observa a las 2 horas lo cual podría ser importante para la etapa temprana de la inflamación, en la cual, se inducen muchos de los mediadores que reclutan eosinófilos y linfocitos T en etapas tardías (**Fig. 17 A-B**).

Por otro lado, en cuanto a la expresión de CCR9 en estas células, se observan células positivas para este marcador, únicamente a las dos horas, lo cual correlaciona con la mayor disminución de estas células en ausencia de CCR9 (**Fig. 17C, 17D**). La implicación biológica de que hayan menos células dendríticas aun no la conocemos, lo que es claro es que el microambiente inflamatorio completamente se desregula en ausencia de CCR9, teniendo como consecuencia principal, la disminución en los eosinófilos presentes en este microambiente.

Todos estos datos indican que CCR9 es un receptor de quimiocinas que favorece la inducción del proceso inflamatorio desde etapas muy tempranas de la inflamación pulmonar inducida por OVA.

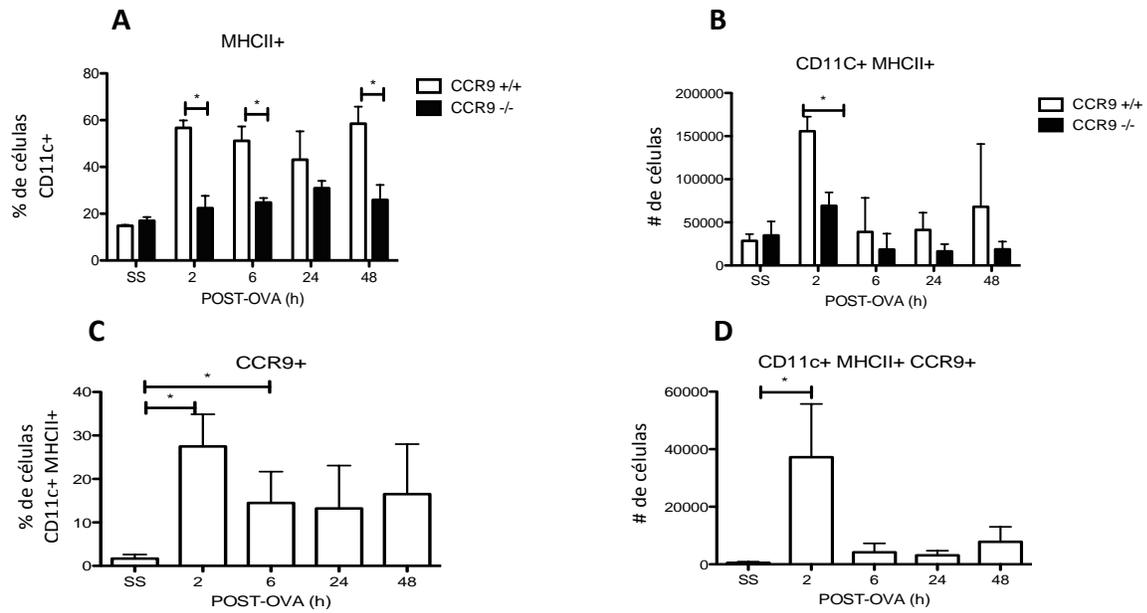


Figura 17. Determinación de las células CD11c+ MHCII+ en LBA que dependen de CCR9 durante la alergia pulmonar. A) Porcentaje y B) Número de células positivas que co-expresan CD11c+ MHCII Análisis del **C) Porcentaje y D) Número de células CD11c+ MHCII+ CCR9+**. Gráficos representativos de 2 experimentos independientes n=4

9. Discusión.

El asma es una enfermedad crónica que afecta las vías aéreas. A pesar de que la incidencia en México es del 7-10%, no es de las más altas a nivel mundial, nuestro país sí ocupa los primeros lugares en mortalidad por la poca regulación con su control y tratamiento [101, 102]. Por tanto, esta enfermedad es uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país, el cual se agrava sobretodo en temporada invernal [42] [43]. Por esto, el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que regulan este padecimiento es de gran interés en nuestro país. Actualmente, existe gran cantidad de conocimiento acerca de la fisiopatología del asma; sin embargo la heterogeneidad de las entidades que se diagnostican, hace a este padecimiento complejo para ser clasificado y controlado [101].

Los componentes principales de este padecimiento son: hiperreactividad en las vías aéreas, sobreproducción de moco e inflamación en las vías aéreas. La regulación del microambiente inflamatorio en padecimientos crónicos es muy complejo y es un tema de gran interés. Recientemente se ha estudiado mucho este microambiente inflamatorio durante el asma, sin embargo, existen algunos puntos importantes que no se han estudiado a detalle, acerca de los mecanismos regulatorios y funcionales que ocurren en etapas muy tempranas posteriores al estímulo alérgico.

La inflamación es uno de los principales componentes durante el asma alérgica. La regulación de todos estos procesos es muy compleja y en ella participan miles de moléculas y la participación de muchas de ellas ya se ha estudiado detalladamente. Las quimiocinas y sus receptores, representan un blanco molecular muy importante para estudiar esta regulación.

Las primeras observaciones de los factores quimiotácticos derivados neutrófilos, ocurrieron incluso antes de definir estos quimioatrayentes como quimiocinas [103, 104].

Como se mencionó anteriormente, los receptores de quimiocinas que se han estudiando en la inflamación alérgica, son receptores de la familia C-C y CXC. Algunos ejemplos específicos son: CCR1 [105], CCR2 [106], CCR3 [107, 108], CCR4 [109, 110], CCR5

[111], CCR8 [112, 113] y CXCR2 [114, 115]; sin embargo, el receptor CCR9 es una molécula de gran interés en la búsqueda de blancos terapéuticos para tratar otros padecimientos como la enfermedad de Crohn [116, 117], aunque hasta ahora no se ha investigado a detalle, si en otro proceso inflamatorio en la mucosa pulmonar pudiera estar involucrado.

Aún no se conocen a detalle mecanismos que lo inducen; sin embargo lo que se ha estudiado más profundamente de este receptor, es el papel que tiene como inductor del proceso de inflamación en colon en procesos como IBD y enfermedad de Crohn.

En el grupo de investigación en el cual se realizó este trabajo, nos ha interesado conocer la función moduladora de este receptor en otras mucosas, tales como la mucosa pulmonar. En trabajos previos, hemos reportado que en ausencia de CCR9, existe una disminución en el número y porcentaje de eosinófilos en LBA; sin embargo, es necesario entender los mecanismos que permiten que CCR9 participe como un regulador de la inflamación alérgica pulmonar.

La mucosa pulmonar es un tejido muy susceptible a la inflamación. El microambiente basal de esta mucosa, es regulatorio, debido a que es un sitio en constante contacto con el medio ambiente y una infinita cantidad de antígenos y alérgenos [118, 119]. La inflamación alérgica pulmonar, es uno de los procesos inflamatorios más comunes que se llevan a cabo en mucosa pulmonar. Se sabe que el asma alérgica, que es la manifestación clínica más común es una de las más frecuentes en individuos con predisposición genética.

De los receptores de quimiocinas cuya participación se ha descrito a detalle en la inflamación pulmonar, es el receptor CCR3. Este receptor, tiene varios ligandos y en los modelos experimentales, se ha demostrado que los ligandos y el receptor, son sobre-expresados en condiciones inflamatorias. La regulación de este receptor en el asma alérgica, participa reclutando células inflamatorias y principalmente, eosinófilos a la mucosa pulmonar y favorece su transmigración a las vías aéreas. Algo interesante, fue

El receptor de quimiocinas CCR9, puede ser expresado por eosinófilos, linfocitos, células dendríticas y macrófagos. La expresión en condiciones inflamatorias, se ha reportado en procesos como artritis, cáncer y enfermedad inflamatoria intestinal [64, 66, 72, 120-122]

En el modelo murino analizado, existe menos número de células totales en lavados broncoalveolares de los ratones en ausencia de CCR9 (Figura 4). De estos lavados broncoalveolares, ha sido posible analizar las poblaciones celulares y comparar la respuesta celular inflamatoria de los ratones en presencia o ausencia de CCR9.

El análisis histológico demostró que esta reducción en el infiltrado corresponde no sólo al compartimento alveolar observado en los LBA; sino también al intersticial (Figura 5A-C), debido a que en ausencia de CCR9 existe menor infiltrado perivascular y perivenular.

El análisis histológico de la producción de moco por tinción con ácido peryódico de Schiff, sugiere que no hay diferencias en la producción de moco en ausencia de CCR9 a comparación de las condiciones silvestres. Sin embargo, existe una diferencia en las zonas en las que se produce este moco en los ratones deficientes de CCR9; por lo cual analizamos la producción de la mucina MUC5AC, la cual está involucrada con procesos inflamatorios en pulmón e intestino.

Por otra parte, la peroxidasa de eosinófilos (EPO), una enzima proveniente de los eosinófilos y una de las responsables de inducir remodelación en las células epiteliales, es relativamente menor en cantidad (Figura 4D) en los LBA provenientes de ratones deficientes de CCR9; sin embargo, la reducción no correlaciona con la reducción de células observada en los conteos diferenciales o mediante citometría de flujo, lo cual podría sugerir que esos eosinófilos deficientes de CCR9 tienen mejor actividad de esta molécula, lo cuál aún faltaría por investigar.

Por otro lado, aunque CCR9 se expresa en células plasmáticas intestinales productoras de IgA, la producción de IgE (Figura 4C e IgG1 [69, 71]) no se ve afectada en ausencia de CCR9, lo cual sugiere estas células no dependen de este receptor para esta función; sin embargo aun falta por analizar si es importante para el reclutamiento.

Este trabajo es de los primeros en donde se demuestra la expresión de CCR9 y de CCL25 (su ligando) en una condición inflamatoria en el pulmón.

Fue necesario analizar si la expresión del receptor y la quimiocina correlaciona con la migración de ciertas poblaciones al pulmón. Las etapas del proceso inflamatorio pueden considerarse como fase temprana y fase tardía, los cuales dependen del tiempo entre 0-3 horas y 3-48 horas respectivamente. Durante cada una de estas etapas, los factores solubles que se inducen son distintos y las poblaciones celulares también [123-125].

Los datos de PCR indican que esta expresión ocurre al menos 6 horas después del reto con OVA (Figura 7), además de que los datos por citometría de flujo indican que esta expresión ocurre desde antes, al menos 2 horas después del reto (Figura 13).

Los mediadores inflamatorios secretados en ausencia de CCR9; sugieren que existe una desregulación en la producción o en el consumo de estas citocinas. Se puede observar que uno de los principales factores que inducen activación de las células epiteliales es el TGF- β y en ausencia de CCR9, esta citocina se encontró en altas cantidades en el espacio broncoalveolar, lo cual sugiere que existen menos células que están consumiendo esta citocina. Por otro lado, aunque no hemos analizado directamente la producción de IL-10 por los linfocitos T, esta citocina se ve afectada por la ausencia de CCR9 a las 24 horas. Aunque esta población podría ser responsable de la producción de IL-10, existen otras poblaciones celulares que podrían ser fuente importante de esta citocina. Se ha descrito que las ILC2, son productoras de esta citocina en pulmón y que esta producción es regulada por IL-33 [59]. Así mismo, la alta producción de IL-5 podría ser mediada por estas células ILCs.

Algo importante de mencionar es la regulación de la quimiocina en el pulmón. Durante los primeros reportes de CCL25, no se demostró su presencia en tejido pulmonar en condiciones basales; sin embargo un par de reportes previos han demostrado que esta expresión es inducible en el pulmón [70, 71]. Los mecanismos que inducen esta expresión aún no son claros; sin embargo es importante mencionar que puede ser producida por células epiteliales, células dendríticas y las células endoteliales [68]. En el modelo de IAP, esta expresión parece ser inducida en las células epiteliales bronquiales, en la zona del infiltrado inflamatorio no se observó producción de CCL25.

Con estos datos y con otros obtenidos previamente en este grupo de investigación, la siguiente pregunta fue analizar directamente la expresión de CCR9 en eosinófilos y además en otras poblaciones celulares involucradas en este proceso como los linfocitos T y las células dendríticas.

Los linfocitos T son cruciales para el desarrollo de la IAP. Estas células se encargan de producir citocinas que favorecen el microambiente inflamatorio e inducen el reclutamiento de cada población en las diferentes etapas [126-128]. Por lo tanto, se analizó el impacto de la ausencia de CCR9 durante el proceso inflamatorio. Se observó que a las 6 y 24 horas, se observa un menor porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en los ratones deficientes de CCR9 en esos tiempos de análisis, lo que sugiere que ese receptor es importante para la llegada de estas células al espacio luminal. Para saber si estas células expresan CCR9, analizamos el porcentaje de células positivas, lo que observamos es que en tiempos iniciales de la inflamación, la expresión de CCR9 es importante en los linfocitos T CD4+ (Figura 14 y datos no mostrados)

Como se menciona previamente, como la población de eosinófilos se ve severamente disminuida en ausencia de CCR9, decidimos analizar cuáles eran los factores que favorecían esta disminución.

Se ha observado que estas células, esta expresión puede ser inducible [63]. Durante la IAP, estas células, disminuyen a las 6 y 24 horas después del reto alérgico en los ratones deficientes de CCR9 a comparación de los ratones WT. De este dato, aún es necesario analizar a las citocinas responsables de que estas células lleguen al espacio peribronquial (Figura 7). Mediante tinción intracelular de otras que podrían estar produciéndolas como los linfocitos T.

Algo muy interesante en esta población es analizar funcionalmente qué papel tiene CCR9 en procesos básicos como degranulación y producción de citocinas, no sólo en el reclutamiento, debido a que la liberación de la enzima EPO no se ve tan afectada en ausencia de CCR9, es necesario determinar con base en el número de células, la actividad enzimática de esta proteína para determinar si es regulada por CCR9.

Las células dendríticas, son importantes, sobretodo en los primeros tiempos posteriores a la estimulación, ya que estas células son las responsables de inducir la respuesta inmune y generar expansión de los linfocitos Th2 que migran a la mucosa pulmonar [126, 129-131]. Estas células corresponden a poblaciones muy heterogéneas en el pulmón. Algunas clasificaciones consideran que al menos se pueden distinguir fenotípica y funcionalmente dos grandes subpoblaciones: Las células dendríticas CD11b+ y las células dendríticas CD103+[74]. CCR9 regula la migración de estas células hacia intestino delgado y por eso, en el modelo de inflamación pulmonar, aunque utilizamos los marcadores CD11c+ y MHCII+, lo cual no excluye que en esta población hayan algunos macrófagos alveolares, los datos indican que esta población disminuye significativamente en etapas muy tempranas (2 horas) a las 6 horas después de reto, lo cual podría ser uno de los factores cruciales por los cuales en los ratones deficientes de CCR9, no se establece normalmente esta inflamación en etapas posteriores. El procesamiento antigénico de la ovoalbúmina y la presentación de los linfocitos en etapas tempranas de la inflamación alérgica ocurre en los ganglios mediastinales; sin embargo de manera local, puede ocurrir presentación antigénica y activación de los linfocitos T; sin embargo este proceso pudiera tomar más tiempo, lo cual sugiere que la función de estas células CD11c+ y MHCII+ CCR9+, tienen una función inductora del microambiente inflamatorio, a través de la secreción de citocinas que activen al epitelio.

Este trabajo reporta por primera vez que los eosinófilos pulmonares dependen de la expresión directa de CCR9 para migrar y localizarse en el pulmón. Por otro lado, la expresión de CCR9 es importante en linfocitos T CD4 y T CD8 en etapas posteriores. Estos datos son importantes porque proporcionan una nueva molécula que pueda estudiarse en pacientes con asma alérgica y analizarse como una de las primeras moléculas que se inducen en este proceso que puedan ser propuestas como marcadores importantes que definan una etapa durante el broncoespasmo u otro padecimiento inflamatorio en el pulmón.

10. Conclusiones.

1. Se logró establecer un modelo de inflamación alérgica pulmonar en ratones deficientes de CCR9 a diferentes tiempos de la alergia pulmonar.
2. El modelo murino mostró que no se ve afectada la producción de IgE OVA-específica, sin embargo, se demostró que una población celular con características morfológicas de eosinófilos, se ven disminuidas en ausencia de CCR9.
3. Existe una modificación en la transcripción de MUC5AC en tejido pulmonar en ausencia de CCR9.
4. CCR9 es importante para el reclutamiento de eosinófilos al pulmón durante la inflamación alérgica.
5. La expresión de CCR9 y su ligando son cruciales en etapas tempranas (2-6 horas) para el establecimiento del proceso inflamatorio.
6. Existe un menor porcentaje de linfocitos T CD4+, TCD8+ y células CD11c+ en tiempos tempranos posteriores a un reto alérgico en los ratones deficientes de CCR9 y esta modificación depende de la etapa de la alergia pulmonar que se está llevando a cabo.
7. Los eosinófilos son capaces de expresar CCR9 y esta expresión está relacionada con su localización en mucosa pulmonar a las 24 horas después del reto antigénico.

En conjunto los datos indican que la expresión de CCR9 es necesaria en eosinófilos y células dendríticas para que éstos se encuentren en la mucosa pulmonar durante la etapa inmediata y temprana (2 y 6 horas). Por otro lado, durante la etapa tardía, la regulación de estas poblaciones a través de la secreción de mediadores inflamatorios como IL-5, CCL11, TGF- β , IFN- γ , es importante para modular el reclutamiento (y probablemente la función) de los linfocitos T CD4+.

11. Perspectivas

1. Analizar el modelo de inflamación alérgica en ratones silvestres inhibiendo CCR9 con RNA de interferencia o utilizando un anticuerpo neutralizante.
2. Repetir el experimento de inflamación alérgica considerando incluir un grupo inmunizado con OVA/Alum, pero no sensibilizado.
3. Evaluar la cinética en la expresión de CCR9 y CCL25 a tiempos muy cortos (0-30 minutos) y a las 2 horas del estímulo con OVA.
4. Evaluar la expresión de CCR9 *in situ* en tejido pulmonar por inmunohistoquímica.
5. Caracterizar las diferentes poblaciones de células dendríticas durante la inflamación alérgica pulmonar en los ratones deficientes de CCR9 por citometría de flujo.
6. Analizar la participación de las células dendríticas haciendo ensayos de transferencia celular.
7. Analizar la ontogenia de los eosinófilos en ratones deficientes de CCR9.
8. Hacer determinaciones de hiperreactividad en los ratones deficientes de CCR9.
9. Analizar mediadores inflamatorios como quimiocinas (CCL11, CCL12, CCL25) y citocinas involucradas en la migración y activación de las células dendríticas.
10. Hacer ensayos de migración hacia CCL19 y CCL21 de células dendríticas derivadas de médula ósea u obtenidas *ex vivo* del modelo de inflamación.
11. Analizar la cinética en las células T reguladoras en los ganglios mediastinales.

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

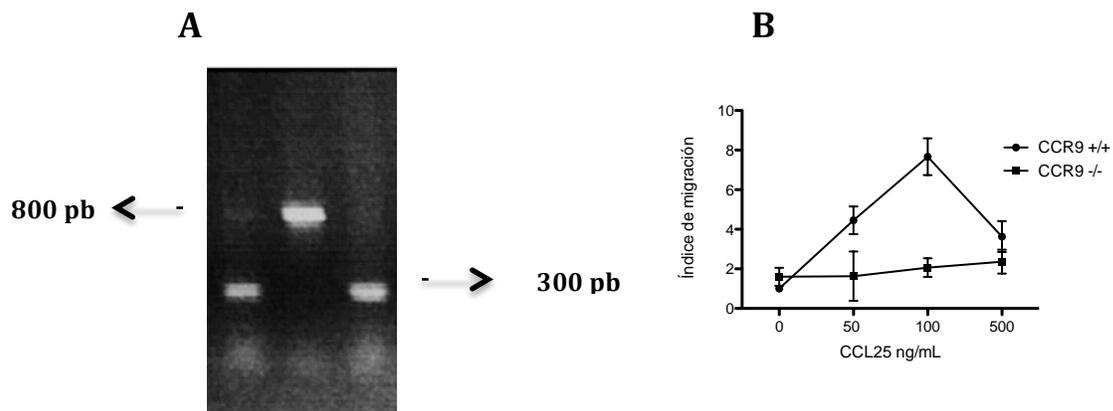


FIGURA 18. A) DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS RATONES UTILIZADOS. SE EXTRAJO DNA GENÓMICO A PARTIR DE LA COLA (ver metodología parte 7.1 y 7.2). El producto de CCR9 se amplificó mediante PCR. Amplicón CCR9 silvestre 800 pb. Ratón CCR9+/- 2) Ratón CCR9 +/+ 3) Ratón CCR9 -/-.

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

ANEXO II. SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA LA PCR EN TIEMPO REAL Y SUS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.

Para cada corrida de PCR se utilizaron las siguientes 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

B-Actina

Sentido: GGGTCAGAAGGATTCCTATG
Antisentido: GGTCTCAAACATGATGTGGG

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

CCR3

Sentido: TTCTCACCAGGAAGAAACGGA
Antisentido: GGAGGTGACTGAGGTGATTGC

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

CCL11

Sentido: CTGAAGAGCTACAAAAGAATCACCAACA
Antisentido: GACCCAAGAAGAAGTGGGTCCAGGATG

Tamaño del producto: 135 pb
Temperatura de disociación: 78.3°C

IL-5

Sentido
ACCTTGCCACTGCTTTCTACTCAT
Antisentido: AGAACTCTTGCAGGTAGTCTAGG

Temperatura de disociación: 82.3°C

CCR9

Sentido: TCCGAAGGGATCTGGTGAAG
Antisentido: GAATGAAACCCACTGGGCC

Temperatura de disociación: 78 °C

CCL25

Sentido: GCCTGGTTGCCTGTTTTGTT
Antisentido: CAGCAGTCTTCAAAGGCACCT

Temperatura de disociación: 77°C

MUC5AC

Sentido: AGAATATCTTTCAGGACCCCCTGCT
Antisentido: ACACCATCCCATTTCTACCACAA

Temperatura de disociación: 80.1°C

ANEXO III SOLUCIONES Y ANTICUERPOS

A) SOLUCIONES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

- Amortiguador para FACS
 - PBS 1X esteril cbp 100 mL
 - SFB 2 mL
 - Azida de sodio 0.1 %

B) SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE DNA

- Solución de lisis
 - NaOH 50 mM+ EDTA 0.02 mM y Tris 10 mM (pH=5)
 - TAE IX
 - Tris Base 0.1M
 - EDTA 0.001M
 - Agua tratada con DEPC
 - El pH debe ser 8.3

C) SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ADN y ARN

- PBS 10x
 - KCl 200mg/L
 - KH₂PO₄ 200mg/L
 - NaCl 8000mg/L
 - Na₂HPO₄ 1150mg/L
 - Agua desionizada
 - Agua tratada con DEPC
- 0.05% de DEPC en H₂O tridestilada se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se esteriliza por autoclave.

D) SOLUCIONES PARA ELISA

- Solución de lavado
 - KCl 200mg/L
 - KH₂PO₄ 200mg/L
 - NaCl 8000mg/L
 - Na₂HPO₄ 1150mg/L
 - Agua desionizada
 - pH 7.4
 - Tween 20 0.05% v/v
- Amortiguador de Carbonatos
 - pH 9.5
 - Para 200mL (10X)
 - Na₂CO₃ 3.2g
 - NaHCO₃ 5.86g
 - Agua desionizada

ANTICUERPOS

- Anticuerpos murinos para FACS: Anti-mCD3-PE, Anti- mCD4-PeCy5.5, Anti-mCD8-Pe, Anti-mCCR3-PE, Anti-mGr1-PercP (Biolegend), Anti-mSiglec F Purificado (R&D), Anti CD11c-APC-Cy7, anti I-A/IE-Percp (Biolegend)
Anti-mCCR9 (eBioscience), anti-rata IgG
- Anticuerpos para ELISA: Anticuerpo conejo anti ratón IgE biotinilado (BioLegend, anti mouse I)
(Dilución 1:150).
 - Anticuerpos para inmunohistoquímica. Anticuerpo anti-CCL25 purificado (R&D)
 - Anticuerpo anti-cabra IgG acoplado a HRP (Zymed)
 - Kit para ELISA Multiarray de citocinas proinflamatorias murinas (Qiagen)

REACTIVOS

- OVA (USB)
- Suero Fetal Bovino (Gibco)
- Albúmina Serica Bovina (Sigma-Aldrich)
- Imject Alum (PIERCE)
- Solución salina Isotónica NaCl 0.9 % calidad inyectable (PISA)
- Etanol absoluto
- Etanol 70%
- Bloqueador universal
- Alcohol isopropílico
- Agarosa (BIO-RAD)
- Bromuro de Etidio
- Azul de tripano
- Anestésico xilacina y ketamine.
- Colorante de Wright-Giemsa (Sigma-Aldrich)
- Poli L-lisina (Sigma)
- Peroxido de Hidrógeno 1X (Pierce)
- TMB microwell (BD Optics)
- dGTP, dATP, dCTP, dTTP (100 mM) (Promega).
- SYBR green Master Mix 2X (Invitrogen).
- Trizol (Invitrogen)

12. Referencias

1. Chaplin, D., *Overview of the immune system*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-S23.
2. Abbas A., Litchman A., and Pillai S., *Cellular and molecular immunology*. Seventh edition ed. 2012: Elsevier Saunders.
3. Janeway C. and Medzhitov R., *Innate immune recognition*. Annual Reviews of immunology, 2002. **20**: p. 197-216.
4. Stone K., Prussin C., and Metcalfe D., *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S73-S80.
5. Sullivan B. and Locksley R., *Basophils: A Nonredundant Contributor to Host Immunity*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 12-20.
6. Min B., *Basophils: what they "can do" versus what they "actually do"*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1333-1339.
7. Kuijpers T. and Roos D., *Neutrophils*. Enciclopedia of life sciences, 2001. **1**: p. 1.10.
8. Deryuhina E., et al., *Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumour microenvironment*. Neoplasia, 2014. **16**(10): p. 771-788.
9. Chávez-Galán L., et al., *Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages*. Frontiers in immunology, 2015. **6**: p. 1-15.
10. Gordon S., *Alternative activation of macrophages*. Natures Reviews of Immunology, 2003. **3**: p. 23-36.
11. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**(147-174): p. 147-74.
12. Neves, J.S. and P.F. Weller, *Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 694-9.
13. Khoury, P., P.C. Grayson, and A.D. Klion, *Eosinophils in vasculitis: characteristics and roles in pathogenesis*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(8): p. 474-83.
14. Artis, D. and H. Spits, *The biology of innate lymphoid cells*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 293-301.
15. Spits, H. and T. Cupedo, *Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 647-75.
16. Neill D., et al., *Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity*. Nature 2010. **464**(7923): p. 1367-1370.
17. Yu, S., et al., *Innate lymphoid cells and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(4): p. 943-50; quiz 51.
18. S, B., *Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data*. Nature Reviews in immunology, 2007. **7**(2): p. 93-104.
19. Metz, M. and M. Maurer, *Mast cells--key effector cells in immune responses*. Trends Immunol, 2007. **28**(5): p. 234-41.
20. van de Ven, R., et al., *The ABC of dendritic cell development and function*. Trends Immunol, 2009. **30**(9): p. 421-9.

21. del Rio, M.L., et al., *Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 268-81.
22. Massoud, A.H., et al., *Dendritic cell immunoreceptor: a novel receptor for intravenous immunoglobulin mediates induction of regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(3): p. 853-63 e5.
23. Bellanti J., *Immunology IV Clinical applications in health and disease*. 2011.
24. Sprent J, S.C., *T cell memory*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 551-579.
25. Abbas, A., *Cellular and Molecular Immunology*. 2005, ed. W B Saunders Co. p. 598.
26. Kaplan M., *Th9 cells: differentiation and disease*. Immunological reviews, 2013. **252**(1): p. 104-115.
27. Eyerich S., et al., *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(12): p. 3573-3585.
28. Chen , Z., *Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes*. Arthritis Rheum., 2007. **17**: p. 456-462.
29. Janeway, C.J.T., in *Immunobiology: the Immune System in Health and Disease*. 2007, ed. GP New York,.
30. Akbari O, D.R., Umetsu DT, *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen*. Nat Immunol, 2001. **2**: p. 725-31.
31. Medoff B, T.S., Luster, A, *T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs*. Annu Rev Immunol, 2007. **32**: p. 265-230.
32. Pot C., Apetoh L., and Kuchroo V., *Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity*. Seminars in immunology, 2011. **23**(3): p. 202-208.
33. Collison L., et al., *Interleukin-35-mediated induction of a novel regulatory T cell population*. Nature Immunology, 2010. **11**(12): p. 1093-1101.
34. Akbari O., et al., *Mucosal tolerance and immunity: Regulating the development of allergic disease and asthma*. International archives of allergy and clinical immunology, 2003. **130**: p. 108-118.
35. Aguilera N., et al., *Mucosal immune system: A brief review*. Inmunología, 2004. **23**(2): p. 207-216.
36. Williams I., *Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system*. Immunologic research, 2004. **29**(1): p. 283-291.
37. M, L., *Chapter 1. Function and structure of the respiratory system*, in *Pulmonary physiology*. 2013, McGraw-Hill: New York, NY.
38. Silverstein A., *A history of immunology*. 2009: Academic Press. 528.
39. Rajan T., *The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation*. Trends in immunology, 2003. **24**(7): p. 376-379.
40. Wu Y, F.J., Pirmohamed M, Park K, Naisbitt J, *Generation and characterization of antigen-specific CD4+, CD8+, and CD4+ CD8+ T- cell clones from patients with carbamazepine hypersensitivity*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2007. **119**: p. 973-981.
41. GINA, *Global Strategy for asthma management and prevention*, GINA, Editor. 2014. p. 148.
42. GINA, *GINA Burden report*, G.G.I.o. Asthma, Editor. 2012. p. 122.

43. Vargas M., *Epidemiología del asma*. Neumología y cirugía de tórax, 2009. **68**(S2): p. S-91-S97.
44. Romanet-Manent S., et al., *Allergic vs non allergic asthma: what makes the difference?* Allergy, 2002. **57**(7): p. 607-613.
45. Holgate S., *Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 495-505.
46. Reber L, D.S.C., Frossard N. , *Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases*. Eur J Pharmacol, 2006. **533**: p. 327-340.
47. Karp W, *Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 255-281.
48. Commins S., Borish L., and Steinke J., *Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons and chemokines*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S53-S72.
49. Viola A. and Luster A., *Chemokines and their receptors: Drug targets in immunity and inflammation*. Annual Reviews of toxicology, 2008. **48**: p. 171-197.
50. Vicari A., et al., *TECK: A Novel CC Chemokine Specifically Expressed by Thymic Dendritic Cells and Potentially Involved in T Cell Development*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 291-301.
51. Ransohoff R., *Chemokines and chemokine receptors: Standing at the Crossroads of immunobiology and neurobiology*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 711-721.
52. Griffith J., Sokol C., and Luster A., *Chemokines and chemokine receptors: Positioning Cells for host defense and immunity*. Annual Reviews of immunology, 2014. **32**(659-702).
53. N., L., *Role of chemokines in the pathogenesis of asthma*. Nature Reviews of Immunology, 2001. **1**(2): p. 108-116.
54. Panina-Bordignon P., et al., *The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics*. Journal of Clinical Investigation, 2001. **207**(11): p. 1357-1364.
55. Barnes P., *New drugs for asthma*. Nature Reviews in drug discovery, 2004. **3**: p. 831-844.
56. Holgate S. and Polosa R., *Treatment strategies for allergy and asthma*. Nature Reviews in immunology, 2008. **8**: p. 218-230.
57. Nomiyama H., et al., *The human CC chemokine TECK (SCYA25) maps to chromosome 19p13.2*. Genomics, 1998. **51**(2): p. 311-312.
58. Townson J., R. J., and N. B., *Characterization of Mouse CCX-CKR, a Receptor for the Lymphocyte-Attracting Chemokines TECK/mCCL25, SLC/mCCL21 and MIP-3beta/mCCL19: Comparison to Human CCX-CKR*. European Journal of Immunology, 2002. **32**(5): p. 1230-1241.
59. Uehara S., et al., *A Role for CCR9 in T Lymphocyte Development and Migration*. The Journal of Immunology, 2002. **168**.
60. Wurbel M., et al., *Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gammadelta(+) gut intraepithelial lymphocytes*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2626-2632.

61. Zaballos A., et al., *Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(10): p. 5671-5675.
62. Yu C., et al., *CCR9A and CCR9B: two receptors for the chemokine CCL25/TECK/Ck beta-15 that differ in their sensitivities to ligand*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(3): p. 1293-1305.
63. Liu L., et al., *Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **112**(3): p. 556-562.
64. Schmutz C., et al., *Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation*. Arthritis research and therapy, 2010. **12**(4): p. R161.
65. Gupta P., et al., *CCR9/CCL25 expression in non-small cell lung cancer correlates with aggressive disease and mediates key steps of metastasis*. Oncotarget, 2014. **5**(20): p. 10170-10179.
66. Tu Z., et al., *CCR9 in cancer: oncogenic role and therapeutic targeting*. Journal of hematology and oncology, 2016. **9**(10): p. 1-9.
67. Ericsson A., et al., *Functional Characterization of the CCL25 Promoter in Small Intestinal Epithelial Cells Suggests a Regulatory Role for Caudal-Related Homeobox (Cdx) Transcription Factors*. The Journal of Immunology, 2006. **176**(6): p. 3642-3651.
68. Svensson M. and Agace W., *Role of CCL25/CCR9 in health and disease*. Expert reviews of clinical immunology, 2006. **2**(5): p. 759-774.
69. Lopez-Pacheco, C., *Papel del receptor de quimiocinas CCR9 en la regulación de la respuesta inflamatoria en un modelo murino de alergia pulmonar*, in *Departamento de Inmunología*. 2009, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 97 pags.
70. B., S.-S., *Driving IL-17+ $\gamma\delta$ T-cell migration in allergic reactions: A new "inflammatory" role for the "homeostatic" chemokine CCL25*. European Journal of Immunology, 2012. **42**(5): p. 1097-1101.
71. López-Pacheco, C., *Análisis del receptor de quimiocinas CCR9 en la regulación del proceso inflamatorio alérgico pulmonar*, in *Departamento de Inmunología*. 2012, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 68 pags.
72. HSharma P., et al., *Anti apoptotic role of CCR9 in prostate cancer*. The FASEB Journal, 2008. **22**(1).
73. Sharma P., et al., *CCR9 mediates PI3K/AKT-dependent antiapoptotic signals in prostate cancer cells and inhibition of CCR9-CCL25 interaction enhances the cytotoxic effects of etoposide*. International journal of cancer, 2010. **127**(9): p. 2020-2030.
74. Jaensson E, U.-H.H., Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, Berg PL, Davidsson T, Powrie F, Johansson-Lindbom B, Agace WW., *Small intestinal CD103 + dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans*. Journal of experimental medicine, 2008. **205**(9): p. 2139-2149.
75. Drakes ML., Stiff PJ., and B. TG., *Inverse relationship between dendritic cell CCR9 expression and maturation state*. Immunology, 2009. **127**(4): p. 466-476.

76. Bratke K, P.C., Garbe K, Kuepper M, Lommatzsch M, Virchow JC., *Plasmacytoid dendritic cells in allergic asthma and the role of inhaled corticosteroid treatment*. Clinical and experimental allergy, 2013. **43**(3): p. 312-321.
77. Livak K. and Schmittgen T., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ACT Method*. Methods, 2001. **25**: p. 402-208.
78. García-Zepeda E., et al., *Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophils cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia*. Nature medicine, 1996. **2**(4): p. 449-456.
79. Ponath P., et al., *Cloning of the human eosinophils chemoattractant eotaxin*. 1996, 1996. **97**(3): p. 604-612.
80. Song C., et al., *IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma*. Journal of Immunology, 2008. **181**(9): p. 6117-6124.
81. Oppmann B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with a biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-725.
82. Rael E. and Lockey R., *Interleukin-13 signaling and its role in asthma*. WAO Journal, 2011. **4**(3): p. 55-64.
83. Taub C., et al., *The role of IL-13 in established allergic airway disease*. Journal of Immunology, 2002. **169**: p. 6482-6489.
84. J., C., *Role of interleukin-13 in asthma*. Current allergy and asthma reports, 2013. **13**(5): p. 415-420.
85. Meyts I., et al., *IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma*. Journal of Immunology, 2006. **177**(9): p. 6460-6470.
86. Neveu W., et al., *Elevation of IL-6 in the allergci asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function*. Respiratory research, 2010. **11**(28): p. 1-10.
87. Rincon M. and I. C., *Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases*. International Journal of Biological Sciences, 2012. **8**(9): p. 1281-1290.
88. Wilson M., et al., *Suppression of murine allergic airway disease by IL-2:anti-IL-2 monoclonal antibody-induced regulatory T cells*. Journal of immunology, 2009. **181**(10): p. 6942-6954.
89. Boomer, J.S., et al., *A detailed phenotypic analysis of immune cell populations in the bronchoalveolar lavage fluid of atopic asthmatics after segmental allergen challenge*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2013. **9**(1): p. 37.
90. Shreiner A., et al., *Repeated exposure to Aspergillus fumigatus conidia results in CD4+ T cell-dependent and -independent pulmonary arterial remodeling in a mixed Th1/Th2/Th17 microenvironment that requires interleukin-4 (IL-4) and IL-10*. Infection and immunity, 2012. **80**(1): p. 388-397.
91. van Rijt L., et al., *A rapid flow cytometry method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma*. Journal of immunological methods, 2004. **288**: p. 111-121.
92. B., B., *Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors*. Clinical and experimental allergy, 2009. **39**(3): p. 317-324.

93. de Bruin A., et al., *Eosinophil differentiation in the bone marrow is inhibited by T cell-derived IFN-g*. *Phagocytes, granulocytes and myelopoiesis*, 2010. **116**(14): p. 2559-2569.
94. Schwartz C., et al., *Eosinophil-specific deletion of IkBa in mice reveals a critical role of NF-kB-induced Bcl-xL for inhibition of apoptosis*. *Blood*, 2005. **125**(25): p. 3896-3904.
95. Zhang M., et al., *Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils*. *Immunobiology*, 2007. **109**(10): p. 4280-4288.
96. Meyer E., DeKruyff R., and U. D., *T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma*. *Annual Reviews of immunology*, 2008. **2008**(59): p. 281-292.
97. Palomares O., et al., *Role of Treg in immune regulation of allergic diseases*. *European Journal of Immunology*, 2010. **40**: p. 1232-1240.
98. Miyahara N., et al., *Contribution of antigen-primed CD8+ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13*. *Journal of Immunology*, 2004. **172**: p. 2549-2558.
99. Carramolino L., et al., *Expression of CCR9 b-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8+ T cells from secondary lymphoid organs*. *Blood*, 2001. **97**(4): p. 850-858.
100. Isogai S., et al., *The effects of CD8+gd T cells on late allergic airway responses and airway inflammation in rats*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003. **112**(3): p. 547-555.
101. Pozo-Beltrán C., et al., *Knowledge of asthma: educational intervention with the 2014 GINA guide in primary care physicians*. *Revista Alergia México*, 2016. **63**(4): p. 358-364.
102. Del Rio Navarro B., et al., *Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions*. *Allergy Asthma Proceeding*, 2006. **27**: p. 334-340.
103. Yasuba H., et al., *Increased releasability of platelet products and reduced heparin-induced platelet factor 4 release from endothelial cells in bronchial asthma*. *Journal of lipid mediators*, 1991. **4**(1): p. 5-21.
104. Hemmendinger S., et al., *Platelet function: Aggregation by PAF or sequestration in lung is not modified during immediate or late allergen-induced bronchospasm in man*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1989. **83**(5): p. 990-996.
105. Blease K., et al., *Airway Remodeling Is Absent in CCR12/2 Mice During chronic Fungal Allergic Airway Disease*. *The journal of immunology*, 165. **165**: p. 1564-1572.
106. Robays L., et al., *Chemokine Receptor CCR2 but Not CCR5 or CCR6 Mediates the Increase in Pulmonary Dendritic Cells during Allergic Airway Inflammation*. *Journal of Immunology*, 2007. **178**(8): p. 5305-5311.
107. Pope S., et al., *The Eotaxin Chemokines and CCR3 Are Fundamental regulators of Allergen-Induced Pulmonary Eosinophilia*. *The Journal of Immunology*, 2005. **175**: p. 5341-5350.
108. Humbles A., et al., *The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. *PNAS*, 2001. **99**(3): p. 1479-1484.

109. Faustino L., et al., *Regulatory T Cells Migrate to Airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic Inflammation*. Journal of Immunology, 2013. **190**: p. 1-8.
110. Perros F., et al., *Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation*. Allergy, 2009. **64**(7): p. 995-1002.
111. Sandford A., et al., *The role of the C-C chemokine receptor-5 Δ 32 polymorphism in asthma and in the production of regulated on activation, normal T cells expressed and secrete*. The journal of allergy and clinical immunology, 2001. **108**(1): p. 69-73.
112. Chung C., et al., *CCR8 Is Not Essential for the Development of Inflammation in a Mouse Model of Allergic Airway Disease*. The Journal of Immunology, 2003. **1**(170): p. 581-587.
113. Muthalithas K., et al., *Expression of CCR8 is increased in asthma*. Clinical and experimental allergy, 2010. **50**: p. 1175-1185.
114. Nair P., et al., *Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial*. Clinical and experimental allergy, 2012. **42**(7): p. 1097-1103.
115. Schuh J., Blease K., and H. C., *CXCR2 is necessary for the development and persistence of chronic fungal asthma in mice*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(3): p. 1447-1456.
116. Wendt E. and Keshav S., *CCR9 antagonism: potential in the treatment of inflammatory Bowel Disease*. Clinical and experimental gastroenterology, 2015. **8**: p. 119-130.
117. Bekker P., et al., *CCR9 Antagonists in the treatment of ulcerative colitis*. Mediators of inflammation, 2015. **2015**(2015): p. 1-10.
118. Snelgrove R., Godlee A., and H. T., *Airway immune homeostasis and implications for influenza-induced inflammation*. Trends in immunology, 2011. **32**(7): p. 328-334.
119. Weitnauer M., Mijosek V., and D. A., *Control of local immunity by airway epithelial cells*. Mucosal Immunology, 2016. **9**(2): p. 287-298.
120. Johnson E., et al., *CCR9 interactions support ovarian cancer cell survival and resistance to cisplatin-induced apoptosis in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion*. Journal of ovarian research, 2010. **3**(15): p. 1-8.
121. Rivera-Nieves J., et al., *Antibody Blockade of CCL25/CCR9 Ameliorates Early but Not Late Chronic Murine Ileitis*. Gastroenterology, 2006. **131**(5): p. 1518-1529.
122. Nakamoto N., et al., *CCR9+ macrophages are required for acute liver inflammation in mouse models of hepatitis*. Gastroenterology, 2012. **142**(2): p. 366-376.
123. Gonzalo JA., et al., *The Coordinated Action of CC Chemokines in the Lung Orchestrates Allergic Inflammation and Airway Hyperresponsiveness*. Journal of experimental medicine, 1998. **188**(1): p. 157-167.
124. Weersink E, P.D., AalbersvR, de Monchy J, *Early and late asthmatic reaction after allergen challenge*. Respiratory medicine, 1998. **8**(2): p. 103-114.
125. Ito W, T.M., Ono K, Mizuno S, Yoshida A, Koga H, Fuchimoto Y, Kondo N, Tanimoto Y, Kiura K, Matsumoto K, Kataoka M, Nakamura T, Gelfand EW, Kanehiro A, *Growth factors temporally associate with airway responsiveness and*

- inflammation in allergen-exposed mice*. International archives of allergy and clinical immunology, 2007. **145**(4): p. 324-339.
126. Kearley J, Robinson D, and Lloyd C, *CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling*. 3, 2008. **617-623e6**.
 127. Zhao J, L.C. and Noble A., *Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling*. Mucosal Immunology, 2015. **6**: p. 335-346.
 128. Coomes SM, K.Y., Pelly VS, Entwistle LJ, Guidi R, Perez-Lloret J, Nikolov N, Müller W, Wilson MS,, *CD4+ Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation*. Mucosal Immunology, 2016. **11**.
 129. Condon T., et al., *Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface*. Journal of leukocyte biology, 2011. **90**(5): p. 883-895.
 130. Neyt K. and Lambrecht B., *The role of lung dendritic cell subsets in immunity to respiratory viruses*. Immunological reviews, 2013. **255**(1): p. 57-67.
 131. Kopf M., Schneider C., and N. S., *The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells*. Nature Immunology, 2015. **16**: p. 36-44.

Research Article

CCR9 Is a Key Regulator of Early Phases of Allergic Airway Inflammation

**C. López-Pacheco,^{1,2} G. Soldevila,² G. Du Pont,^{1,2}
R. Hernández-Pando,³ and E. A. García-Zepeda^{1,2}**

¹CBRL, Ciudad de México, Mexico

²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico

³Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to E. A. García-Zepeda; garciaze@servidor.unam.mx

Received 9 May 2016; Accepted 7 August 2016

Academic Editor: Carolina T. Piñeiro

Copyright © 2016 C. López-Pacheco et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Airway inflammation is the most common hallmark of allergic asthma. Chemokine receptors involved in leukocyte recruitment are closely related to the pathology in asthma. CCR9 has been described as a homeostatic and inflammatory chemokine receptor, but its role and that of its ligand CCL25 during lung inflammation remain unknown. To investigate the role of CCR9 as a modulator of airway inflammation, we established an OVA-induced allergic inflammation model in CCR9-deficient mice. Here, we report the expression of CCR9 and CCL25 as early as 6 hours post-OVA challenge in eosinophils and T-lymphocytes. Moreover, in challenged CCR9-deficient mice, cell recruitment was impaired at peribronchial and perivenular levels. OVA-administration in CCR9-deficient mice leads to a less inflammatory cell recruitment, which modifies the expression of IL-10, CCL11, and CCL25 at 24 hours after OVA challenge. In contrast, the secretion of IL-4 and IL-5 was not affected in CCR9-deficient mice compared to WT mice. These results demonstrate for the first time that CCR9 and CCL25 expressions are induced in the early stages of airway inflammation and they have an important role modulating eosinophils and lymphocytes recruitment at the first stages of inflammatory process, suggesting that they might be a potential target to regulate inflammation in asthma.

1. Introduction

Allergic asthma is a chronic disease that affects more than 300 million people worldwide [1]. Its prevalence and mortality have been more common in the recent decades and it became an important health issue due to its increasing medical care expenses and a reduction in worker productivity. It is estimated that there will be more than 100 million of new asthmatics in the next decade [2–5].

Allergen-triggered airway inflammation mediated by specific IgE is the most common feature of asthma [2]. Airway inflammation is mediated by the recruitment of granulocytes and Th2 lymphocytes [6]; both are described as the main cellular effectors of the inflammatory process

and are regulated by Th2 cells-derived cytokines that are expressed by epithelial and inflammatory cells [7].

The complexity of cell trafficking during lung inflammation is tightly regulated by chemokines [8]. In this context, it has been established that overexpression of certain chemokine receptors is correlated with the localization and activation of inflammatory cells during and after an allergen challenge. Increasing evidence has supported the role of chemokine receptors in allergic airway inflammation; however, the involvement of CCR9 in asthma remains unclear.

CCR9 and its unique ligand, CCL25 (thymus-expressed chemokine, TECK), were originally described in thymus where they were shown to play a role in thymocyte development [9–11]. Also, their homeostatic expression in small

intestine is related with cell homing to the gut. Moreover, the involvement of CCR9 under inflammatory conditions has been widely described in the gut [10, 12]. However, its expression, function, and regulation in the lungs are unclear.

The expression of CCR9 in inflammatory cells that are recruited to the lungs has been described. After *in vitro* stimulation with proinflammatory mediators, human eosinophils-derived cell lines upregulate the expression of CCR9 and respond to CCL25 in chemotaxis assays [13]. Also, CCR9 is upregulated in peripheral blood eosinophils of asthmatic subjects [14]. Moreover, inflammatory macrophages which are crucial cells in allergic inflammation upregulate CCR9 expression in the inflammatory microenvironment [15]. Dendritic cells are some of the most important effectors in early stages of airway sensitization. In these cells, CCR9 expression is upregulated by IL-4 [16]; however, the effects of other Th2-derived cytokines in this induction and its impact on the regulation of the inflammatory process have not been characterized.

We have previously shown that a subpopulation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T-lymphocytes have regulatory functions and depend on CCR9 expression to control pathogen-induced inflammation in the gut [17]. Therefore, the aim of this work was to analyse the role of CCR9 in regulating cell recruitment and modulating the inflammatory process during airway sensitization. Consistent with previous studies, we report that CCR9 is expressed by eosinophils and T-lymphocytes. In addition, we demonstrate that CCR9-deficient mice (KO) sensitized with OVA showed an impaired recruitment of granulocytes during the first stages of inflammation resulting in a diminished inflammatory response. These data suggest that CCR9 expression plays a key role in the modulation of cell recruitment into the airways during pulmonary inflammation in asthma.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. Six- to eight-week-old C57BL/6 female mice were used in all experiments and maintained under pathogen-free conditions. Water and food were supplied *ad libitum*. CCR9-deficient mice were kindly provided by Dr. M. A. Wurbel (Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA). All experimental procedures involving animals were handled in strict accordance with good animal practices as defined and approved by the Animal Experimental Bio-Ethics Guidelines of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

2.2. Allergic Airway Inflammation Murine Model. To induce airway inflammation we followed a previously reported protocol with minor modifications [18, 19]. Briefly, mice were treated by intraperitoneal administration with 10 μ g of ovalbumin (OVA, Sigma Chemical, MO, USA), adsorbed to 10 mg of alum (Pierce, NJ, USA), and suspended in saline solution (SS) on days 0 and 8. On days 15 to 20, mice received aerosolized OVA 1% (USB, Ohio, USA) during 30 minutes. On day 34, mice were again nebulized with OVA 5%. Mice were euthanized 6, 24, and 48 hours later when indicated. Mice treated only with SS were used as controls.

2.3. Measurement of OVA-Specific Mouse IgE by ELISA. For detection of serum OVA-specific IgE, 96-well ELISA plates (Santa Cruz, TX, USA) were coated with 20 μ g of OVA in 0.1 M carbonate buffer (pH 8.3). Plates were blocked one hour with PBS-SFB 2%. Samples were diluted 10-fold and then added to the wells. Antibodies were detected with rat anti-mouse IgE specific antibody (Zymed, CA, USA), followed by the addition of a secondary anti-rat biotinylated antibody (BioLegend, CA, USA). Avidin-HRP (BD OptEIA, USA) was added and reaction was developed with tetramethylbenzidine substrate (KPL, MD, USA) and stopped by adding H₂SO₄ 2 N. Optical density of samples was measured at 450 nm (OD₄₅₀) using a Modulus II microplate reader (Promega, WI, USA).

2.4. Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Cell Analysis. BALF obtained from challenged mice was collected at 2, 6, 24, and 48 h after the last OVA administration as indicated. Briefly, 800 μ L of PBS/EDTA 0.05 M solution was repeatedly introduced into the mice lungs and collected until recovered volume was 4 mL. BALF was centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4°C. Cells were suspended in 1 mL of PBS and total number of cells were quantified using standard staining protocols and differential cell types were determined on cytopun cells stained with Diff Quick (Dade Behring Inc., Newark, DE) and then examined by microscopy. Morphological analysis of cells distinguished lymphocytes, macrophages, eosinophils, and neutrophils. Remaining cells were processed for flow cytometry analysis.

2.5. Cytokines Determination in BALF. Levels of IL-4, IL-5, TNF- α , and IL-10 cytokines were measured in BAL supernatants using commercial ELISA kits (ELISA Max™, BioLegend, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Additionally, a murine MultiAnalyte ELISArray kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) was used to quantitate the levels of 12 proinflammatory cytokines and performed according to the manufacturer's instructions.

2.6. Flow Cytometry Analysis. To analyse chemokine receptor expression by FACS, cells were incubated first with blocking solution (mouse serum in PBS) during 20 minutes, followed by a second incubation with a biotinylated mouse anti-CCR9 antibody (1 μ g/10⁶ cells) (eBioscience, CA, USA) in FACS buffer (PBS containing 2% fetal bovine serum and 0.1% NaN₃) for 30 min at 4°C. Finally cells were incubated with a solution of streptavidin-APC or streptavidin-PerCP during 30 min at 4°C in the dark.

For phenotypic detection of other cell populations, single cell suspensions were preincubated with a mixture of anti-CD16/CD32 antibodies (BioLegend, CA, USA) during 10 min at room temperature. Following first incubation and several washes, cells were incubated with either anti-CD4-PeCy7, anti-CD8-PE, anti-Gr1-PeCy5 (BioLegend, CA, USA), or anti-Siglec (BD, CA, USA) antibodies in FACS buffer for 30 min at 4°C (according to manufacturer's suggestions). Finally, samples were analyzed in Attune® Acoustic flow cytometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Analysis of data was performed with FlowJo 8.7 software (Tree Star, Inc.).

2.7. Histological Analysis. Mice were euthanized, and the lungs fixed by transcardiac and intratracheal instillation with 4% paraformaldehyde. After fixation, lungs were embedded in paraffin and processed for histochemical analysis. Lung sections (7 μ M) were stained with haematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS). For morphometric analysis, slides were examined in a Leica microscope (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Images were taken from 5 different fields from four animal samples and analyzed using Leica microscope imaging software (Leica Microsystems).

2.8. Immunohistological Analysis of Chemokine Expression. Briefly, paraformaldehyde fixed lung tissues were embedded in paraffin and processed for immunohistochemical analysis. Sections were deparaffinized and rehydrated with ethanol gradients. Antigen retrieval was performed by microwave oven heating in a 0.01 M sodium citrate solution; endogenous peroxidases were inactivated with H₂O₂ and blocked with universal buffer (Biogenex, CA, USA). Purified goat anti-mouse CCL25 antibody (R&D) and control goat IgG isotype (R&D), were used as recommended by manufacturer. Sections were incubated overnight; after several washes, secondary peroxidase-labeled anti-goat IgG was added during 1 hour at room temperature. Finally, sections were 5 times washed with PBS/BSA 0.05% and revealed with DAB (Vector Laboratories, CA, USA).

2.9. Real-Time PCR. Total RNA from tissues was purified with Trizol (Invitrogen, CA, USA). cDNA synthesis was performed using 2 μ g of total RNA as a template, M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), and OligodT (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using the Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primer sequences used for amplifications were as follows: CCR9: F: 5'-TCCGAAGGGATCTGGTGAAG-3', CCR9: R: 5'-GAATGAAACCCACTGGGC-C-3'; CCL25: F: 5'-CCAAGGTGCCTTTGAAGACT-3', CCL25: R: 5'-TCCTCCAGCTGGTGGTACT-3'; CCL11: F: 5'-TCCACAGCGCTTCTATTCTG-3', CCL11: R: 5'-GGA-GCCTGGGTGAGCCA-3'; CCR3: F: 5'-TTCTCACCA-GGAAGAAACGGA-3', CCR3: R: 5'-GGAGGTGACTG-AGGTGATTGC-3'; IL-10: F: 5'-TTTGAATCCCTGGG-TGAGAA-3', IL-10: R: 5'-GGAGAAATCGATGACAGC-GC-3'; IL-5: F: 5'-ACCTGGCACTGCTTTCTACTCAT-3', IL-5: R: 5'-AGAAACTCTTGCAGGTAGTCTAGG-3' and β -actin as an internal control gene F: 5'-GGTCTCAGAA-GGATTCTATG-3', R: 5'-GGTCTCAAACATGATCTG-GG-3'. Gene expression analysis was performed relative to β -actin and calculated by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [20].

2.10. Data Analysis. Significant differences between groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's multiple comparisons test using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). The values are reported as mean \pm SD. Differences with a *p* value equal to or below 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of the Inflammatory Cells Induced by OVA-Stimulation in CCR9-Deficient Mice. Our first approach to analyse the regulatory role of CCR9 in allergic lung inflammation *in vivo* was to use a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation (Figure 1(a)). Wild type (WT) and CCR9-deficient (KO) mice were sensitized and challenged with OVA. The inflammatory response was induced and analyzed 24 hours after the last OVA-challenge. The absence of CCR9 resulted in impaired cellular recruitment, as observed by a diminished cell count in bronchoalveolar fluid (BALF) (Figure 1(b)). In contrast to SS-treated mice, OVA-challenged mice showed an increase in lymphocytes and eosinophils as reported earlier [19]. Interestingly, there was a reduction (30%) in the total number of recruited eosinophils in BALF of KO mice compared to WT mice (Figure 1(c)). However, we found no differences in OVA-specific IgE production in the sera of CCR9 KO mice compared to WT (Figure 1(d)). Altogether, these results indicate that CCR9 regulates eosinophilic infiltration in the lung in response to OVA.

3.2. Reduced Leukocyte Infiltration in the Absence of CCR9. Next, we determined the histological features of airway inflammation in CCR9 KO mice. Consistent with the number of inflammatory cells in BALF, we found an increase of leukocyte cell infiltration at peribronchial and perivascular levels in OVA-treated WT and CCR9 KO mice, primarily mononuclear cells and eosinophils (Figure 2(a)). Morphometrical analysis showed significantly reduced peribronchial infiltration (nearly by 50%) and slight decrease at the perivenular level in the absence of CCR9 compared to WT mice. In addition, it has been suggested that chemokines may participate directly in regulating mucin expression. Thus, to examine another feature of the lung inflammatory response, we compared mucus production in WT with CCR9 KO mice by PAS-staining (Figure 2(c)). Our analysis showed that there was no significant difference in the number of PAS-positive goblet cells in each group of mice (Figure 2(d)). These results might indicate that CCR9 has a role in regulating airway infiltration of inflammatory cells but apparently not in regulating mucin expression.

3.3. Analysis of BAL Cytokines in OVA-Challenged CCR9-Deficient Mice. Th2 cytokines are the main regulators of leukocyte recruitment during allergic inflammation. IL-4 is involved in induction of airway hyperresponsiveness and production of specific IgE and T cell-derived IL-5 is one of the key regulators of eosinophilia in lungs. We analysed the levels of IL-4 and IL-5 in the airways of OVA-sensitized CCR9 KO or WT mice and found no significant differences in the levels of either cytokine between CCR9 KO and WT littermates (Figure 3). Moreover, despite the fact that TNF- α has been reported to contribute to the recruitment of neutrophils, eosinophils, and lymphocytes in allergic models, TNF- α production was not affected in CCR9 KO mice (Figure 3). On the other hand, a strong correlation has been reported

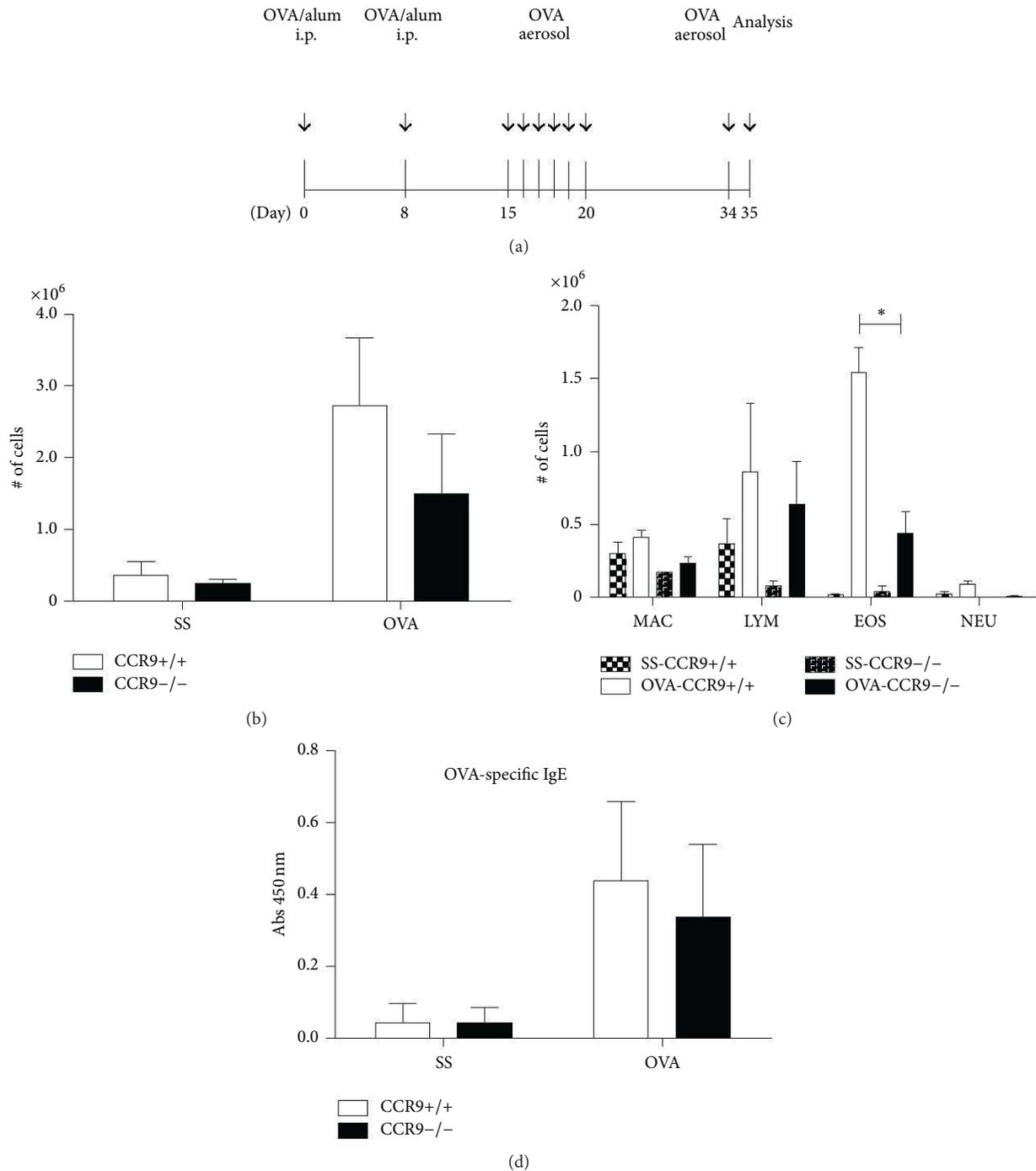


FIGURE 1: Leukocyte recruitment is impaired in BALF in absence of CCR9. (a) *Wild type* (WT) and *knockout* (KO) mice were first sensitized with OVA/alum intraperitoneally. Control animals received saline solution (SS). OVA was aerosolized as indicated. Mice were sacrificed 24 h after the last antigen challenge. (b) Total number of cells from BALF WT and KO mice was quantified. (c) Collected BALF cells were stained with Wright's stain and lymphocytes (LYM), macrophages (MAC), eosinophils (EOS), and neutrophils (NEU) were distinguished morphologically. (d) OVA-specific IgE was determined by ELISA in serum samples from mice. Data represent mean \pm SD and are representative of 4 independent experiments. $n = 3-4$ for each group (* $p < 0.05$ when compared with WT group).

between CCR9 expression and a regulatory process in the gut; therefore, the reduction of eosinophil infiltration observed in CCR9 KO mice (Figure 1(c)) might also be associated with cytokine-mediated immunoregulatory events. Interestingly,

we found that IL-10 is significantly reduced (more than 60%) in CCR9 KO compared to WT mice (Figure 3). These results indicate that, unlike previous data reported in the gut mucosa, where the absence of CCR9 results in increased

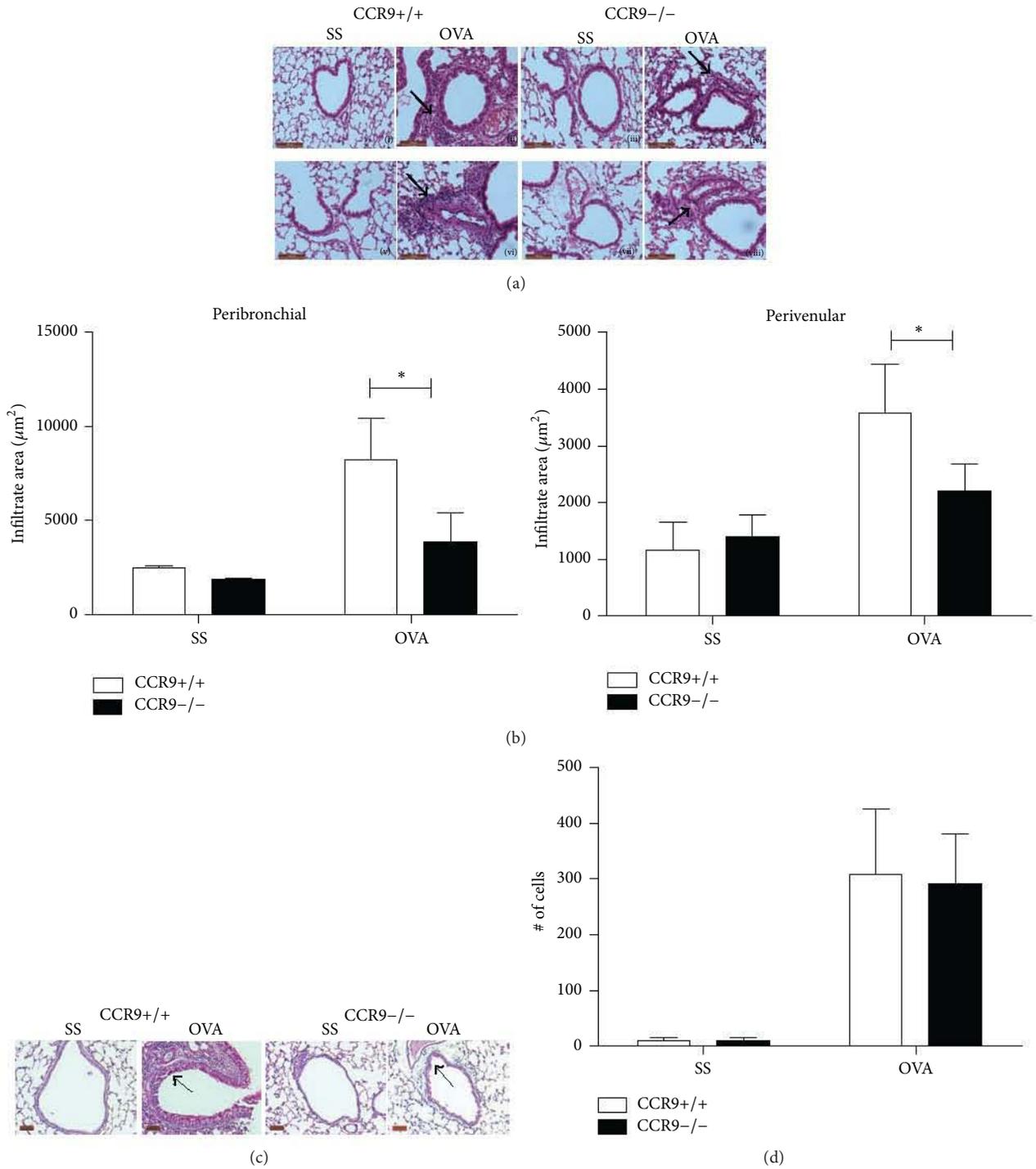


FIGURE 2: Allergic airway inflammation in the absence of CCR9. Lungs from SS- and OVA-treated mice were fixed and stained with H&E. (a) Representative images from peribronchial (i–iv) and perivascular (v–viii) inflammation. Arrows indicate leukocyte infiltration (magnification 200x). (b) Peribronchial and perivascular infiltration was measured from 5 different fields from each mouse and represented as area of infiltrate. (c) Representative images from WT mice SS-treated (i) and OVA-challenged (ii) and CCR9-KO mice SS (iii) and OVA-challenged (iv). Arrows indicate PAS-positive goblet cells (magnification 200x). (d) Quantification of PAS-positive cells from 5 different fields. Images and mean data are representative of 4 independent experiments, $n = 3-4$ for each group (* $p < 0.05$ when compared with WT mice).

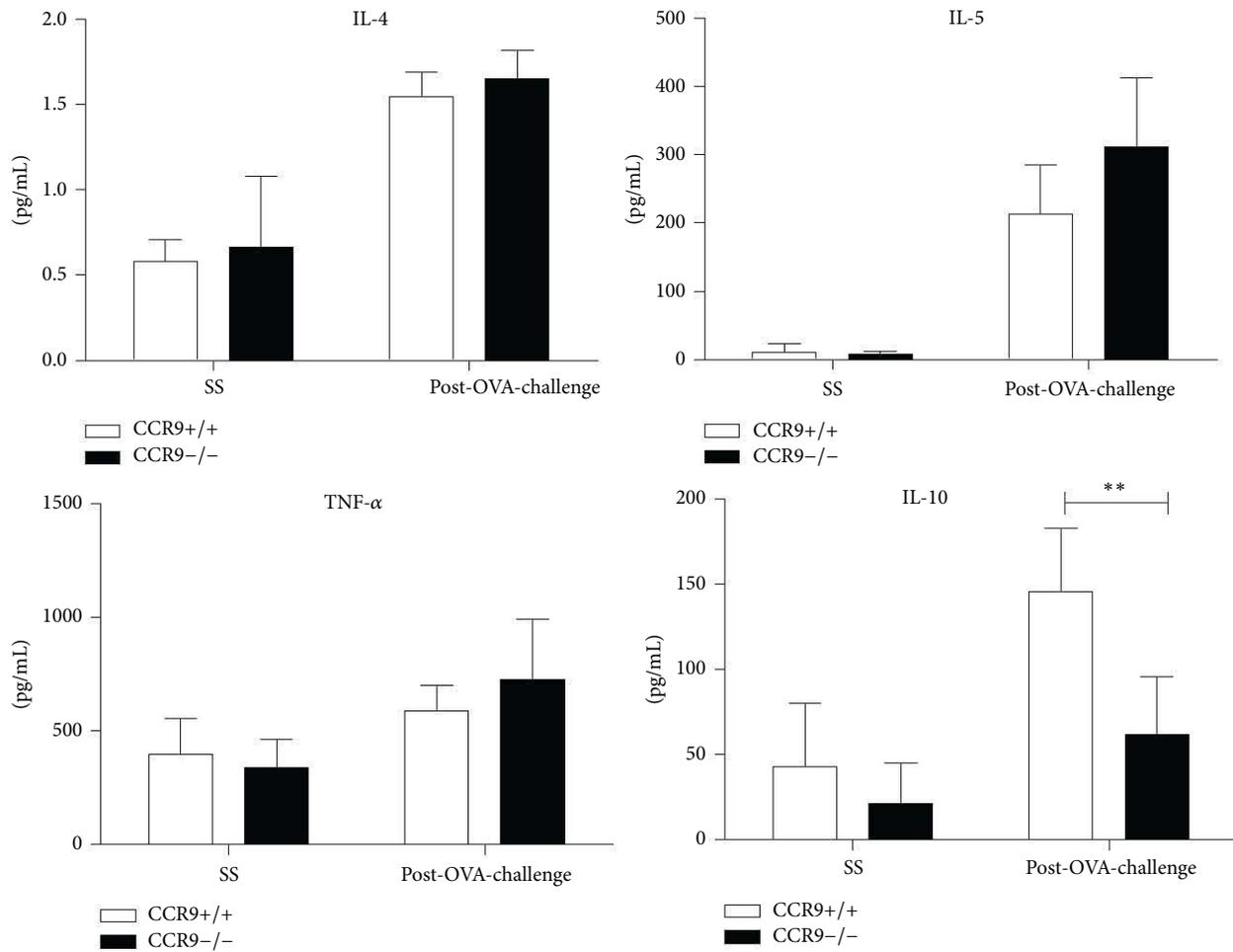


FIGURE 3: Absence of CCR9 decreases IL-10 production in BALF. BALF cytokines were quantified by ELISA. Levels of IL-4, IL-5, TNF- α , and IL-10 represented as mean \pm SD. $n = 4$ (** $p < 0.01$ when compared with WT mice or when compared each time with control group).

inflammation [17], during an allergic inflammatory process in the lung, CCR9 expression correlates with increased leukocyte recruitment, despite the reduced levels of IL-10. Additionally, we analysed the expression of cytokines that have been associated with regulation of inflammation in the lung. Interestingly TGF- β and IL-17 increased their concentration at 6 h and up to 24 h after OVA-stimulation in the CCR9 KO mice compared to WT (Supplementary Figure 1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3635809>).

3.4. CCR9 Regulates CCL25 Expression after OVA-Stimulation. Analysis of leukocyte infiltration after 24 hours after the final OVA-treatment suggested that eosinophils and inflammatory mediators evaluated are dependent on CCR9 expression. A detailed study on the kinetics of the CCR9/CCL25 axis expression during lung inflammation has not yet been performed. Therefore, we next analysed the kinetics CCR9 expression using a modified model of airway sensitization (Figure 4(a)). Very low levels of CCR9 mRNA expression were found in lung tissue by real-time RT-PCR,

although they were detectable at 6 h after the last OVA-challenge reaching the maximum level of expression at 24 h after OVA-challenge (Figure 4(b)). In contrast, we found that CCL25 expression was upregulated very early after allergen challenge (6 h) and was starting to decrease at 24 h and further downregulated at 48 h. To investigate if CCL25 expression might be regulated by CCR9, we analyzed expression of the CCL25 in CCR9 KO and WT mice, before and after OVA-challenge. Interestingly, we detected very low levels of CCL25, in OVA-treated KO mice compared to WT (Figure 4(c)), suggesting that CCR9 expression is important for CCL25 induction in the airways during allergic inflammation. We also have analysed CCL25 expression by IHC in our lung inflammation model after 0, 6, and 24 OVA-stimulation (Figure S2). As demonstrated in the qRT-PCR experiments, there was an increase in the expression of CCL25 in the WT mice as early as 6 h after OVA-challenge; in contrast, there is a reduction in CCL25 expression in the CCR9-/- mice at all times tested.

3.5. CCR9 Modulates the Expression of Other Mediators of Lung Inflammation. Our results suggested that CCR9 might

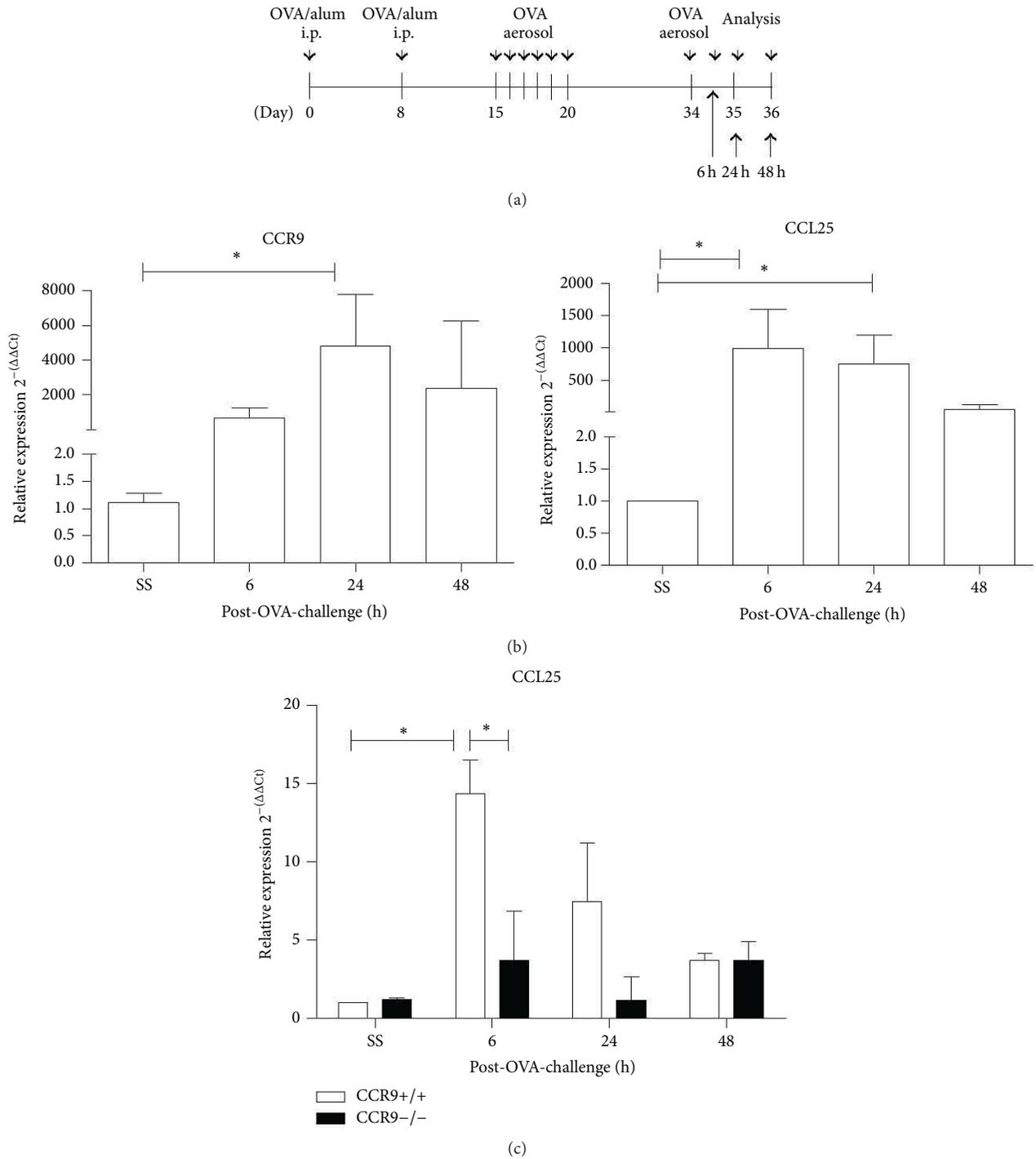


FIGURE 4: CCL25 expression in the lungs of allergen sensitized mice. (a) Mice were sacrificed 6, 24, and 48 h, respectively, after the last OVA-challenge. (b) CCR9 and CCL25 expression in lungs were quantified by real-time RT-PCR. (c) CCL25 expression in lungs of CCR9 KO and WT mice. Data are representative of 3 independent experiments and represent mean \pm SD. $n = 2-3$ for each group ($*p < 0.05$ when compared with WT mice or when compared each time with control group).

regulate the expression of other inflammatory mediators in the lung. Thus, we analysed the expression of CCR3 and one of its cognate ligands, CCL11, known to be important attractors of eosinophils and Th2 lymphocytes during allergic inflammation in the lungs. As shown in Figure 5(a), in WT mice, there was an increase in the mRNA levels of CCR3 and

CCL11 since the first 6 h after the last OVA administration and significant decrease after 48 h (Figure 5(a)). However, comparison between WT and KO revealed that both molecules were severely reduced in absence of CCR9 (Figure 5(b)), suggesting an indirect effect of CCR9 in eosinophils and T-lymphocytes recruitment.

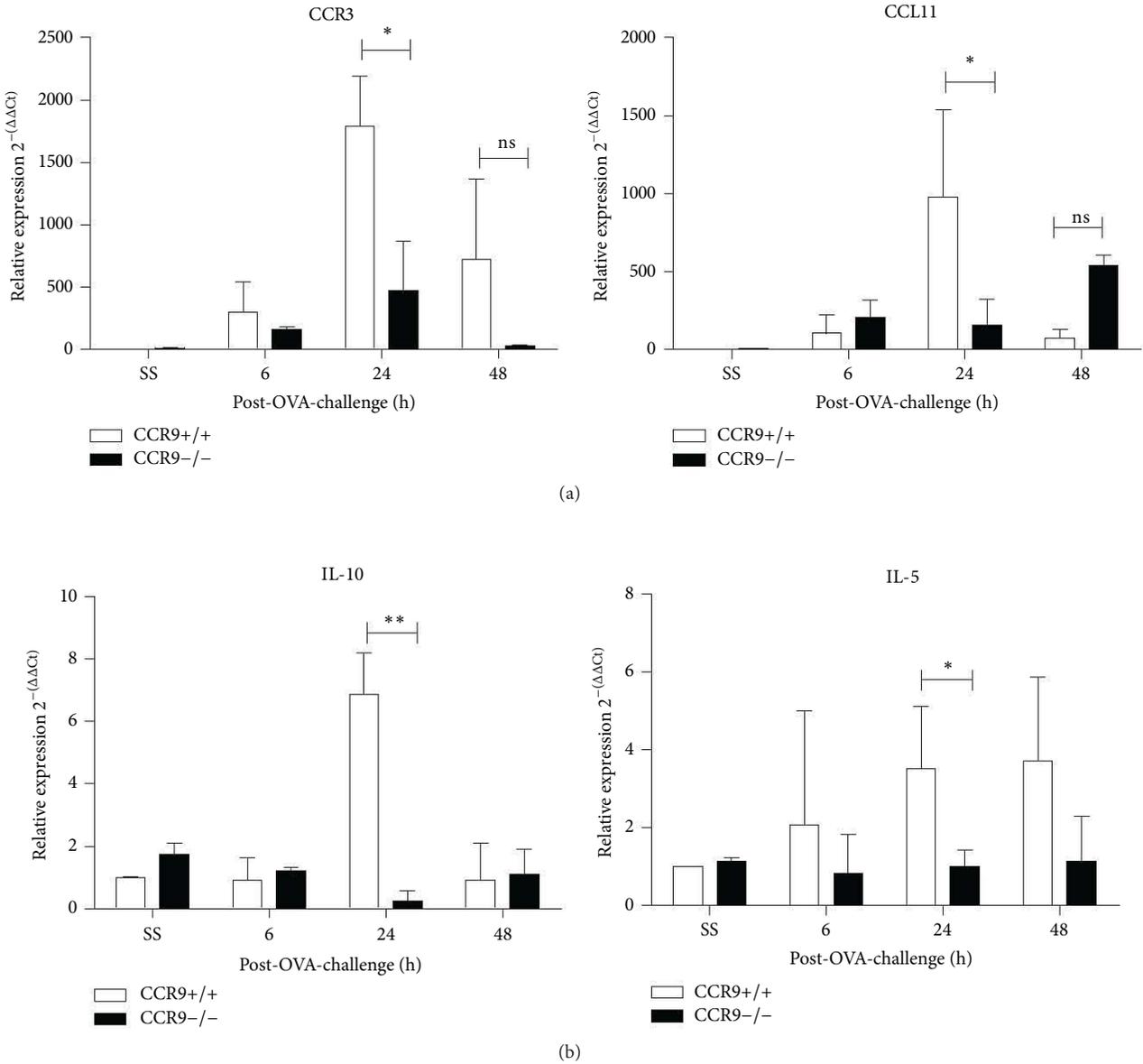


FIGURE 5: Gene expression of lung chemokine receptors and cytokines during OVA-induced inflammation in absence of CCR9. Expression of CCR3, CCL11, IL-5, and IL-10 in WT and CCR9^{-/-} mice was analyzed at 6, 24, and 48 h after OVA-stimulation. Data are representative of 3 independent experiments and represent mean \pm SD. $n = 2-3$ for each group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared with WT mice or when compared each time with control group).

Next, we tested two related cytokines: IL-5, which is involved in activation, recruitment, and apoptosis-resistance of eosinophils, and IL-10 that is an immunoregulatory cytokine. As shown in Figure 5(a), mRNA levels of both cytokines are increased at 24 h after OVA-stimulation in WT mice. Surprisingly, both mRNA levels of IL-5 and IL-10 were either reduced or abrogated at all times tested after OVA-stimulation in the absence of CCR9 when compared with WT littermates (Figure 5(b)). Thus, these data indicate that there is important dependence on CCR9 in the expression of molecules that are important for the establishment of an allergic airway

inflammation characterized by the recruitment of eosinophils and T-lymphocytes.

3.6. Eosinophil Recruitment to the Lung Is Diminished in the Absence of CCR9. As CCR3 and CCL11 expression were regulated by CCR9 and a reduction in eosinophil recruitment to the lungs in the BALF of CCR9 KO mice was determined (Figures 1(b) and 1(c)), we further analysed the kinetics of eosinophils recruitment (Gr1⁺, Siglec-F⁺ cells) in the lungs of CCR9 KO or WT mice after aerosolized OVA by FACS. Data showed that although eosinophils started to increase

at 6 h in both groups of mice, at 24 h after OVA-treatment, there was a significant reduction in CCR9 KO compared to WT mice, both in percentage and in total numbers (Figures 6(a) and 6(b)) which correlates with our previous findings by morphological characterization in BALF (Figure 1(c)) (65% versus 40%).

The mechanisms involved in the regulation of CCR9 expression in eosinophils are unclear. It has been reported that, under *in vitro* activation conditions, CCR9 and other chemokine receptors are upregulated. To obtain a better understanding about a role for CCR9 in eosinophils migration into the BALF after OVA-challenge, we analyzed CCR9 expression in these cells by flow cytometry. Our data showed that there is an increase in the population of CCR9+ Siglec-F+ eosinophils only 6 h after OVA-stimulation. However, we found no statistical differences in Siglec-F expression in the absence of CCR9 after OVA-challenge (Figure S3), which coexpress CCR3 during lung recruitment. Chemokine receptor expression is severely reduced as control littermates at 24 h during inflammation (Figure 6(c)), which suggests that CCR9 is importantly expressed under inflammatory stimulation. Since recruitment of eosinophils to the airways is tightly regulated by chemokine receptors such as CCR3 and CCR5 along with the expression of inflammatory mediators such as CCL5, CCL11, CCL22, and CCL24 chemokines and IL-5, our findings that the CCR9/CCL25 axis may also participate in eosinophils recruitment at the very early hours after OVA-stimulation might contribute to a better understanding of the complex immunoregulation of airways inflammation.

3.7. T-Lymphocytes Recruitment into the Lungs Is Affected in the Absence of CCR9. It has been well established that Th2-lymphocytes are involved in IL-5 secretion in the inflamed lung after allergenic stimulation [18]. As previously mentioned, IL-5 and Th2-like cytokines are the major modulators of allergic inflammation, inducing the recruitment and activation of eosinophils in the airways. Thus, we next investigated whether the absence of CCR9 may also result in impaired T-lymphocyte recruitment to the lungs. To achieve this, we assessed lymphocyte subpopulations in BALF of CCR9 KO and WT littermates by flow cytometry.

As shown in Figure 7, while the percentage of CD4+ T cells in BALF of WT mice increased after OVA-stimulation, CD4+ T cells in CCR9 KO mice were significantly reduced at 6 and 24 h after OVA-stimulation (Figures 7(a) and 7(b)). Recruitment of CD4+ T cells into the lungs of WT mice correlated with the presence of CCR9+ cells since this subpopulation significantly increased 48 h after OVA-stimulation (Figure 7(c)).

The role of CD8+ T cells in allergic inflammation has also been studied and has been shown to be responsible for the secretion of IFN- γ and IL-4 [20]. As shown in Figures 7(d) and 7(e), recruitment of CD8+ T cells in CCR9 KO mice was reduced at 6 and 24 h, but not at 48 h after OVA-stimulation. Recruitment of CD8+ CCR9+ T cells into the lungs increased at very early hours after last OVA-stimulation and remained up to 48 h (Figure 7(f)). Altogether these results suggest that expression of CCR9 is important for the recruitment of CD4+

T and possibly CD8+ T cells during allergen-induced airway inflammation.

4. Discussion

Airway inflammation is one of the most important features of allergic asthma [21]. The regulation of allergic airway inflammation is a very complex process. Chemokines and their receptors have been widely associated with allergic process, including asthma. Several CC and CXC chemokines have been associated with the asthmatic phenotype: CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, CXCL8, and CXCL10 [22–25]. However the dynamics and kinetics of this regulation are not fully understood in the context of asthma development. Also, chemokine receptors like CCR3, CCR4, and CCR8 have been found to be elevated in asthma patients and experimental murine models [26–32]. CCR3 has been widely studied in both clinical and experimental models of asthma [33]. It has been well established that this receptor contributes to regulation of the immune response in asthmatic airways by recruiting and activating eosinophils, T-lymphocytes, and mast cells [34]. The chemokine receptor CCR4 has also been studied in allergic airway inflammation using murine animal models; although its leukocyte expression might not be crucial for allergic airway inflammation development, it has been associated with recruitment of regulatory T cells to the lung [35, 36]. However, little information exists regarding the role of CCR9 in regulation of lung inflammation. CCR9 is a CC-chemokine receptor that has an important but not essential participation in regulating thymocytes trafficking during lymphocyte development in the thymus [11, 37, 38]. Also, CCR9 is associated with homing of CD4 [16], CD8 [39], $\gamma\delta$ T cells [40], dendritic cells [41], and B cells [42] to the intestinal lamina propria. Likewise, CCR9 and CCL25 participation in inflammatory diseases has been widely studied. Its expression is upregulated in inflammatory bowel disease and colitis [43–45]. Interactions between CCR9 and its ligand are important in regulating development of small intestine inflammation [46, 47], mainly by attracting gut inflammatory cells. CCR9 also has a role in regulation of apoptosis in tumor cell lines [48] and in cancer patients [49, 50], which makes this receptor a potential chemotherapeutic target in chronic inflammatory diseases.

In this report, we were interested in analysing the role of CCR9 in regulating the inflammatory process during allergic airway inflammation. To achieve this, we analysed a previously reported murine model of allergic airway inflammation. Interestingly, our data showed that leukocyte recruitment to allergic airways was impaired in absence of CCR9, in particular affecting recruitment of eosinophils. Histological analysis demonstrated that both perivascular and peribronchial inflammation were attenuated in CCR9 KO mice, suggesting that CCR9-CCL25 interaction might be important, but not crucial, in activating classical features of airways inflammation. *In vivo* expression of CCR9 in eosinophils is not clear [14] and *in vitro* data has suggested that CCR9 could be induced under an inflammatory stimulus [51]. Another important feature of allergic airway sensitization is an increase in the expression of lung mucins. We

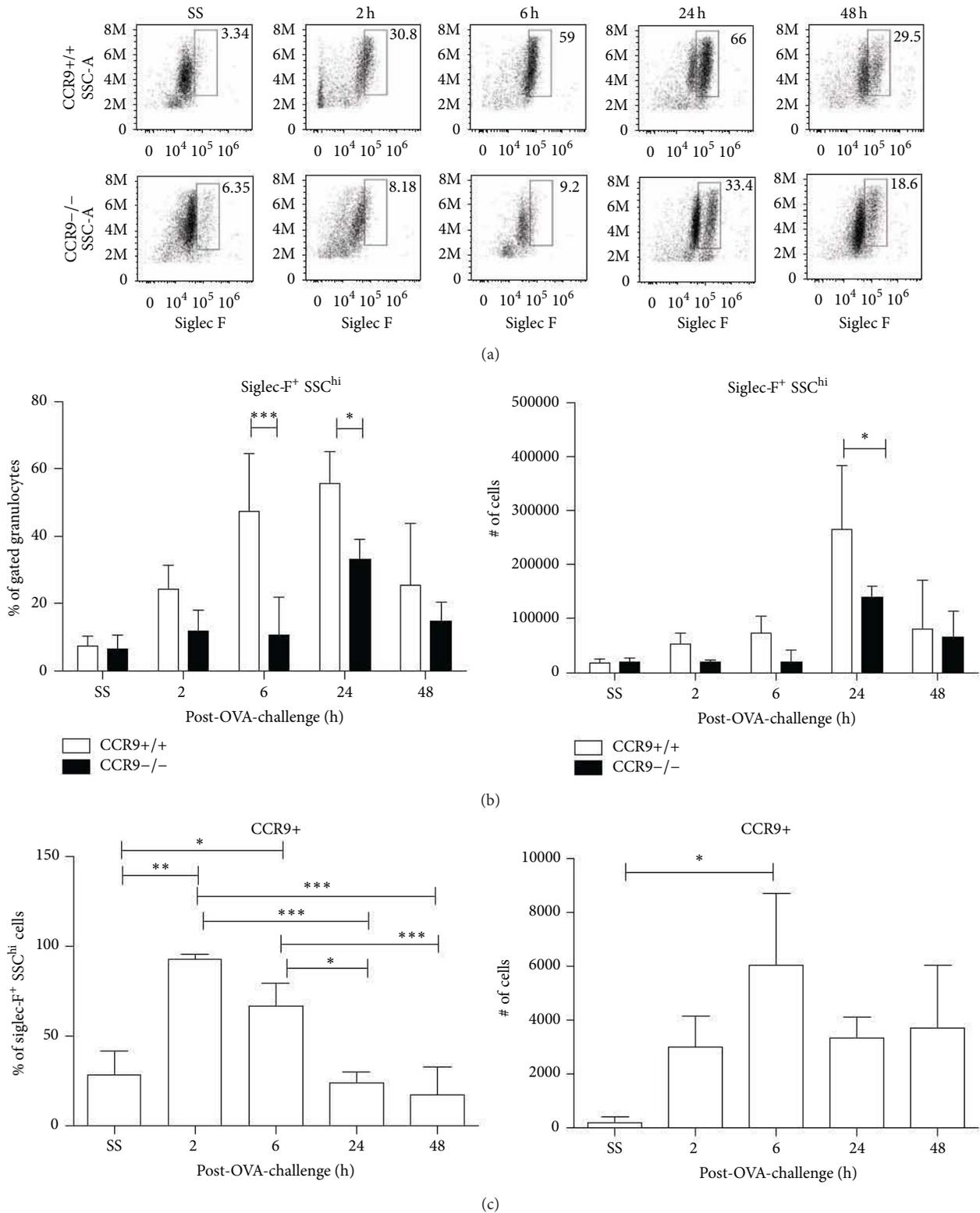


FIGURE 6: CCR9 expression in eosinophils regulates their recruitment to inflamed lung. 2, 6, 24, and 48 h after the last OVA boost, BALF from OVA-sensitized/challenged mice was collected and analyzed by FACS. (a) Siglec-F⁺ SSC^{hi} cells were plotted. (b) Quantitation of eosinophils in WT and KO mice during inflammation. (c) Percentage and CCR9-expressing eosinophils in WT mice. Data are representative of 2 independent experiments and represent mean ± SD. *n* = 3–5 for each group (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 when compared with WT mice or when compared each time with control group).

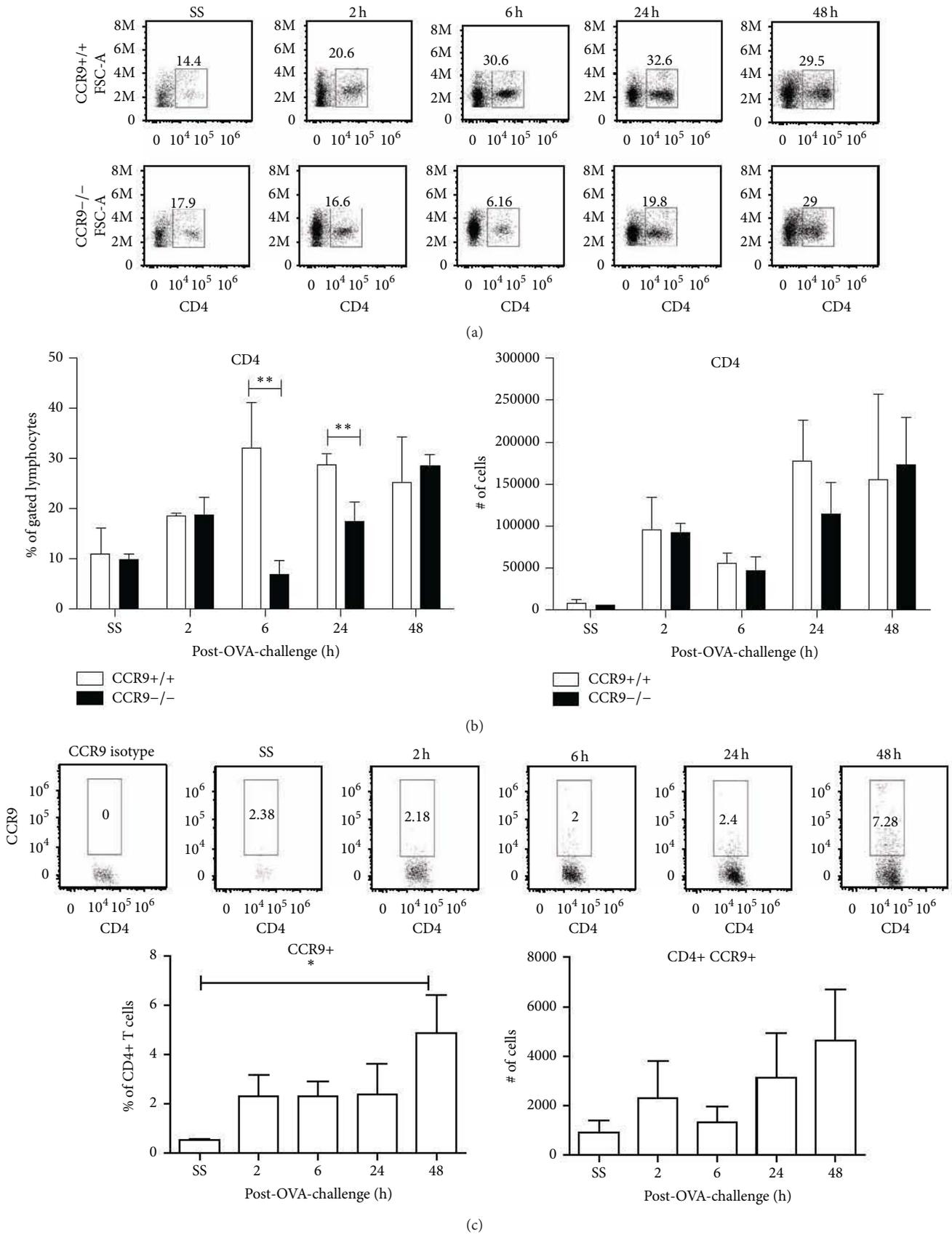


FIGURE 7: Continued.

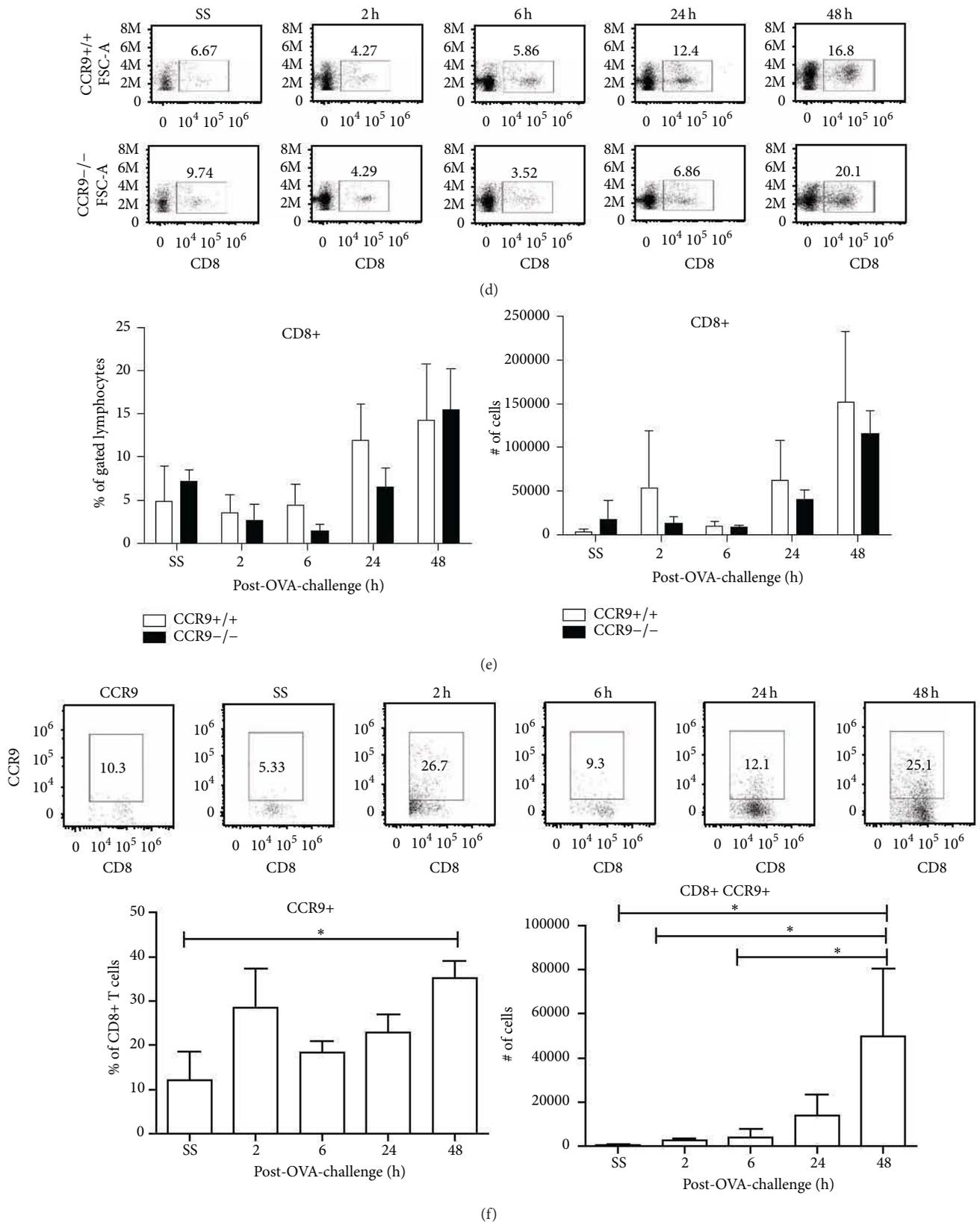


FIGURE 7: Lymphocyte recruitment during airway inflammation is affected in absence of CCR9. 2, 6, 24, and 48 h after the last OVA-challenge, BALF from sensitized mice was collected and FACS analysis of (a) CD4 and (d) CD8 T-lymphocytes is shown. Percentage of CD4+ (b) and total number (e) of CD4+ T-lymphocytes gated in region of lymphocytes. CCR9+ cells were analyzed in (c) CD4+ or (f) CD8+ T-lymphocytes. Data are representative of 2 independent experiments and represent mean \pm SD. $n = 3-5$ for each group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ when compared with WT mice or when compared each time with control group).

analysed the number of PAS-positive goblet cells in the lungs of OVA-stimulated/challenged mice and showed no statistical differences between KO and WT mice. Although few studies have been reported regarding a direct relation between chemokine stimulation and mucin production, it is not clear whether CCL25 may be directly involved in mucin production [52, 53]. Further studies regarding the chemokine-mediated induction of the different types of mucin should be performed, in particular analysing those chemokines that are related to a Th2-type inflammation phenotype such as CCL5 and CCL11. Next, we proceed to investigate the potential role of the CCR9-CCL25 axis in regulating some of the events of the inflammatory allergic process in association with other cytokines. It is clear now that Th2-type cytokines are crucial for allergic development and remodelling [54, 55]. IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 cytokines have a clear effect on target cells such as B cells and eosinophils. In addition, other cytokines such as IL-1, IL-22, IL-33, and TSLP-1 may also activate both Th2 and ILC2 innate cells increasing the complexity of the inflammation process. However, a Th2-type environment alone does not seem to explain the broad spectrum of this disease, in part, because severe asthma is not exclusively associated with Th2 cytokines production [56].

We found that the expression of IL-4 and IL-5 was not modified in the BALF of OVA-stimulated CCR9 KO mice, although there was a significant increase of IFN- γ (Supplementary Figure 1) after 6 h after OVA-stimulation, suggesting that Th2 cytokines might not be related to CCR9-mediated signalling and that other mechanisms of regulation are involved in their expression under absence of CCR9.

In contrast, the levels of IL-10 in the BALF of OVA-sensitized mice were reduced in the absence of CCR9 compared to WT. IL-10 is a potent immunoregulatory cytokine produced mainly by a subset of CD4+ T-lymphocytes (Tregs), B lymphocytes, and macrophages [57, 58]. In asthma, there are a number of studies both in patients and in animal models that demonstrate a potential role of IL-10 regulating inflammation in the airways [59], where the main source is CD4+ CD25+ T-lymphocytes. However, in our model no differences were found in the numbers of CD25+ FoxP3+ T cells, indicating that other CCR9-dependent IL-10 producing cells might be involved in the regulation of the inflammatory process in the airways. In this context a dendritic cell-like subpopulation (CD11c+, F480+ MHC Class II+) was diminished in the lung of CCR9 KO at very early time after stimulation (data not shown).

IL-17 and TGF- β were also modified in the absence of CCR9 (Figure 3 and Supplementary Figure 1). It has been reported that Th2 and Th17 pathways might be regulated in asthma. An increase in IL-17 expression is related to neutrophilic inflammation that is also associated with an increase in the levels of certain CXC chemokines and mucin hyperplasia [60, 61]. In our model, the absence of CCR9 led to a down-regulation of the IL-17 levels in the allergic airways although with no significant modification of the levels of IL-4 and IL-5.

CCR9 has been identified in secretory plasma B cells in the gut [41]. We were interested in analysing the levels of IgE, IgG1, and IgG2a serum antibodies (Figure 1, data not shown) and found no significant differences between wild

type and *knockout* mice. This is not surprising since the levels of IL-4 in the *knockout* mice were not significantly modified. As it is known, IL-4 is associated with proliferation and differentiation of activated B cells, IgE switching, induction of eosinophil transmigration across endothelium, regulation of Th2 responses in allergic diseases, and effects on the synthesis of chemokines such as CCL11, CCL24, CCL26, and CCL13 [62–64]. Although a correlation between IL-4 and IgE has been proven to be relevant in allergic airway inflammation, in our model, the absence of CCR9 has no impact on the expression of these proteins.

Early phases of allergic airway inflammation (first 4–8 h after allergen stimulation) are characterized by the expression of specific chemokines, cytokines, and growth factors that correlate with the initial infiltration of neutrophils and eosinophils and the activation of mast cells. This recruitment is associated with development of airway hyperresponsiveness (AHR). Experimental models have shown that there is a coordinated regulation between chemokine expression and differential leukocyte recruitment. IL-4, IL-5, IL-13, and TNF- α cytokines are upregulated during this phase, playing a key role in AHR development, leukocyte recruitment, and late phase establishment of inflammation, which could persist for weeks [65, 66]. In addition, CC (CCL2, CCL3, and CCL5) and CXC (CXCL1, CXCL2, CXCL5, and CXCL10) chemokines are expressed at early events of airway inflammation (0–8 h after allergen challenge) while CCL8, CCL11, and CCL24 are expressed at later events (from 24 h up to 7 days) [67–69]. Therefore, here we investigated whether the CCR9/CCL25 axis might be involved in the modulation of the kinetics of cell recruitment into the airways during early stages of inflammation after allergen stimulation. Our data showed an upregulation of both CCR9 and CCL25, both at mRNA and at protein levels, as early as 6 h and up to 24 h after allergen challenge. This expression correlated with an increase of lymphocytes and eosinophils. Thus, CCR9/CCL25 expression may contribute to leukocyte recruitment under a proinflammatory microenvironment at very early stages of allergen stimulation in a similar fashion to CCL11. Since CCL25 is constitutively expressed by thymic and small intestinal epithelial cells [70], it is likely that the main source of CCL25 in the lung is also epithelial cells, although it may not be regulated in the same way as other chemokines [71].

In our model, we analysed 2 and 6 h post-OVA-stimulation as key points of early inflammation onset. In the absence of CCR9, an impaired eosinophil recruitment to the lungs was detected. Eosinophilic response postactivation has been widely described both *in vivo* and *in vitro*. This activation results in production of proinflammatory mediators and chemokines; thus a defect in the eosinophil recruitment could be related not only to CCR9 expression but to migratory dependence and activation of eosinophils mediated by CCL25. This process may be crucial for inflammation regulation and resolution. Furthermore, our results show a decrease in the number of CCR9+ Siglec-F+ eosinophils after the first 6 hr. after the OVA-challenge. These cells return to basal levels at 48 hours after stimulation, suggesting that these CCR9+ cells might be specifically important at very early phases of lung inflammation.

Similarly, an allergic airway inflammatory late response (from 1-2 days) is characterized by migration of T-lymphocytes, macrophages, and a second wave of granulocytes. This leukocyte recruitment is regulated by specific cytokines and chemokines that also contribute to further airway remodelling [65, 72]. In our model, absence of CCR9 severely impaired migration into the airways of both CD4+ and CD8+ T cells after 24 hours of OVA-challenge. The total numbers of these cells were similar to that of OVA-stimulated WT controls at 48 hours after last OVA-challenge. It is not clear if this reduction in the number of T cells at early stages of airway inflammation correlates with a regulatory T-lymphocyte phenotype (CD4+ CD25+ FoxP3+) as we have demonstrated earlier in a model of pathogen-mediated inflammation in the colon [17].

Taken together our data indicated that CCR9 regulates allergic airway inflammation by promoting early airway eosinophilia affecting CD4 and CD8 T-lymphocytes recruitment and suggest that this receptor could be considered as an additional therapeutic target in allergic airway inflammation.

Competing Interests

The authors declare that no conflict of interests exists regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank Verónica Rodríguez from Facultad de Medicina, UNAM, and MVZ Georgina Diaz from UMB, IIB, UNAM, for technical assistance. C. López-Pacheco was a Ph.D. student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was supported by a Ph.D. Fellowship from Conacyt no. 316675. Dr. E. A. García-Zepeda was supported by a Conacyt Grant no. 167913.

References

- [1] "GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention," 2015.
- [2] H. Y. Kim, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu, "The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 7, pp. 577–584, 2010.
- [3] T. R. Myers and L. Tomasio, "Asthma: 2015 and beyond," *Respiratory Care*, vol. 56, no. 9, pp. 1389–1407, 2011.
- [4] F. D. Martinez and D. Vercelli, "Asthma," *The Lancet*, vol. 382, no. 9901, pp. 1360–1372, 2013.
- [5] M. Masoli, D. Fabian, S. Holt, and R. Beasley, "The global burden of asthma," *Global Initiative for Asthma Reports*, 2014.
- [6] R. H. Dekruyff, S. Yu, H. Y. Kim, and D. T. Umetsu, "Innate immunity in the lung regulates the development of asthma," *Immunological Reviews*, vol. 260, no. 1, pp. 235–248, 2014.
- [7] J. W. Griffith, C. L. Sokol, and A. D. Luster, "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity," *Annual Review of Immunology*, vol. 32, pp. 659–702, 2014.
- [8] J. E. Pease, "Asthma, allergy and chemokines," *Current Drug Targets*, vol. 7, no. 1, pp. 3–12, 2006.
- [9] B.-S. Youn, C. H. Kim, F. O. Smith, and H. E. Broxmeyer, "TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor," *Blood*, vol. 94, no. 7, pp. 2533–2536, 1999.
- [10] M.-A. Wurbel, J.-M. Philippe, C. Nguyen et al., "The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9," *European Journal of Immunology*, vol. 30, no. 1, pp. 262–271, 2000.
- [11] S. Uehara, A. Grinberg, J. M. Farber, and P. E. Love, "A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration," *The Journal of Immunology*, vol. 168, no. 6, pp. 2811–2819, 2002.
- [12] E. J. Kunkel, J. J. Campbell, G. Haraldsen et al., "Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 5, pp. 761–768, 2000.
- [13] Y.-J. Jung, S.-Y. Woo, M. H. Jang et al., "Human eosinophils show chemotaxis to lymphoid chemokines and exhibit antigen-presenting-cell-like properties upon stimulation with IFN- γ , IL-3 and GM-CSF," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 146, no. 3, pp. 227–234, 2008.
- [14] L. Y. Liu, N. N. Jarjour, W. W. Busse, and E. A. B. Kelly, "Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 112, no. 3, pp. 556–562, 2003.
- [15] M. A. Gill, "The role of dendritic cells in asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 129, no. 4, pp. 889–901, 2012.
- [16] R. Elgueta, F. E. Sepulveda, F. Vilches et al., "Imprinting of CCR9 on CD4 T cells requires IL-4 signaling on mesenteric lymph node dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 10, pp. 6501–6507, 2008.
- [17] A. E. Rojas-López, G. Soldevila, S. Meza-Pérez et al., "CCR9⁺ T cells contribute to the resolution of the inflammatory response in a mouse model of intestinal amoebiasis," *Immunobiology*, vol. 217, no. 8, pp. 795–807, 2012.
- [18] J. A. MacLean, A. Sauty, A. D. Luster, J. M. Drazen, and G. T. De Sanctis, "Antigen-induced airway hyperresponsiveness, pulmonary eosinophilia, and chemokine expression in B cell-deficient mice," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 20, no. 3, pp. 379–387, 1999.
- [19] E. Mendez-Enriquez, Y. Melendez, F. Martinez et al., "CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 152, no. 2, pp. 354–363, 2008.
- [20] M. Grob, P. Schmid-Grendelmeier, H. I. Joller-Jemelka et al., "Altered intracellular expression of the chemokines MIP-1 α , MIP-1 β and IL-8 by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in mild allergic asthma," *Allergy*, vol. 58, no. 3, pp. 239–245, 2003.
- [21] L. Cohn, J. A. Elias, and G. L. Chupp, "Asthma: mechanisms of disease persistence and progression," *Annual Review of Immunology*, vol. 22, pp. 789–815, 2004.
- [22] E. A. Garcia-Zepeda, M. E. Rothenberg, R. T. Ownbey, J. Celestin, P. Leder, and A. D. Luster, "Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia," *Nature Medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 449–456, 1996.

- [23] E. A. Garcia-Zepeda, C. Combadiere, M. E. Rothenberg et al., "Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel cc chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC Chemokine receptors (CCR)-2 and -3," *Journal of Immunology*, vol. 157, no. 12, pp. 5613–5626, 1996.
- [24] S. Ying, D. S. Robinson, Q. Meng et al., "C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue eosinophilia, and relationship to basophils and other C-C chemokines (monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES)," *Journal of Immunology*, vol. 163, no. 7, pp. 3976–3984, 1999.
- [25] T. Tomankova, E. Kriegova, and M. Liu, "Chemokine receptors and their therapeutic opportunities in diseased lung: far beyond leukocyte trafficking," *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 308, no. 7, pp. L603–L618, 2015.
- [26] R. Alam, J. York, M. Boyars et al., "Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1 α in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 153, no. 4, pp. 1398–1404, 1996.
- [27] S. Mattoli, M. A. Stacey, G. Sun, A. Bellini, and M. Marini, "Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 236, no. 2, pp. 299–301, 1997.
- [28] J. E. Pease and T. J. Williams, "Eotaxin and asthma," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 1, no. 3, pp. 248–253, 2001.
- [29] C. E. Rose Jr., S.-S. J. Sung, and S. M. Fu, "Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung," *Microcirculation*, vol. 10, no. 3-4, pp. 273–288, 2003.
- [30] N. W. Lukacs, A. L. Miller, and C. M. Hogaboam, "Chemokine receptors in asthma: searching for the correct immune targets," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 1, pp. 11–15, 2003.
- [31] M. Isgrò, L. Bianchetti, M. A. Marini, A. Bellini, M. Schmidt, and S. Mattoli, "The C-C motif chemokine ligands CCL5, CCL11, and CCL24 induce the migration of circulating fibrocytes from patients with severe asthma," *Mucosal Immunology*, vol. 6, no. 4, pp. 718–727, 2013.
- [32] V. Provost, M.-C. Larose, A. Langlois, M. Rola-Pleszczynski, N. Flamand, and M. Laviolette, "CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 94, no. 2, pp. 213–222, 2013.
- [33] A. A. Humbles, B. Lu, D. S. Friend et al., "The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 3, pp. 1479–1484, 2002.
- [34] D. A. Wacker, J. B. Santella, III, D. S. Gardner et al., "CCR3 antagonists: A potential new therapy for the treatment of asthma. Discovery and structure-activity relationships," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 12, no. 13, pp. 1785–1789, 2002.
- [35] L. Faustino, D. M. Da Fonseca, M. C. Takenaka et al., "Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation," *Journal of Immunology*, vol. 190, no. 6, pp. 2614–2621, 2013.
- [36] P. Vijayanand, K. Durkin, G. Hartmann et al., "Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients," *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 8, pp. 4568–4574, 2010.
- [37] M.-A. Wurbel, B. Malissen, and J. J. Campbell, "Complex regulation of CCR9 at multiple discrete stages of T cell development," *European Journal of Immunology*, vol. 36, no. 1, pp. 73–81, 2006.
- [38] K. A. Papadakis and S. R. Targan, "The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 6, no. 4, pp. 303–313, 2000.
- [39] L. Carramolino, A. Zaballo, L. Kremer et al., "Expression of CCR9 β -chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8⁺ T cells from secondary lymphoid organs," *Blood*, vol. 97, no. 4, pp. 850–857, 2001.
- [40] M.-A. Wurbel, M. Malissen, D. Guy-Grand et al., "Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor $\gamma\delta^+$ gut intraepithelial lymphocytes," *Blood*, vol. 98, no. 9, pp. 2626–2632, 2001.
- [41] M. Wendland, N. Czeloth, N. Mach et al., "CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 15, pp. 6347–6352, 2007.
- [42] O. Pabst, L. Ohl, M. Wendland et al., "Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 199, no. 3, pp. 411–416, 2004.
- [43] M.-A. Wurbel, M. G. McIntire, P. Dwyer, and E. Fiebiger, "CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, Article ID e16442, 2011.
- [44] M.-A. Wurbel, S. Le Bras, M. Ibourk et al., "CCL25/CCR9 interactions are not essential for colitis development but are required for innate immune cell protection from chronic experimental murine colitis," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 20, no. 7, pp. 1165–1176, 2014.
- [45] B. Eksteen and D. H. Adams, "GSK-1605786, a selective small-molecule antagonist of the CCR9 chemokine receptor for the treatment of Crohn's disease," *IDrugs*, vol. 13, no. 7, pp. 472–481, 2010.
- [46] J. Rivera-Nieves, J. Ho, G. Bamias et al., "Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis," *Gastroenterology*, vol. 131, no. 5, pp. 1518–1529, 2006.
- [47] J. D. Wermers, E. N. McNamee, M.-A. Wurbel, P. Jedlicka, and J. Riveranieves, "The chemokine receptor CCR9 is required for the T-cell-mediated regulation of chronic ileitis in mice," *Gastroenterology*, vol. 140, no. 5, pp. 1526–1535, 2011.
- [48] B. Li, Z. Wang, Y. Zhong, J. Lan, X. Li, and H. Lin, "CCR9–CCL25 interaction suppresses apoptosis of lung cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway," *Medical Oncology*, vol. 32, no. 3, pp. 66–75, 2015.
- [49] H. J. Chen, R. Edwards, S. Tucci et al., "Chemokine 25-induced signaling suppresses colon cancer invasion and metastasis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 9, pp. 3184–3196, 2012.
- [50] P. Gupta, P. K. Sharma, H. Mir et al., "CCR9/CCL25 expression in non-small cell lung cancer correlates with aggressive disease and mediates key steps of metastasis," *Oncotarget*, vol. 5, no. 20, pp. 10170–10179, 2014.

- [51] Y.-J. Jung, S.-Y. Woo, M. H. Jang et al., "Human eosinophils show chemotaxis to lymphoid chemokines and exhibit antigen-presenting-cell-like properties upon stimulation with IFN- γ , IL-3 and GM-CSF," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 146, no. 3, pp. 227–234, 2008.
- [52] M. V. Bautista, Y. Chen, V. S. Ivanova, M. K. Rahimi, A. M. Watson, and M. C. Rose, "IL-8 regulates mucin gene expression at the posttranscriptional level in lung epithelial cells," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 3, pp. 2159–2166, 2009.
- [53] S. Kim, C. Lewis, and J. A. Nadel, "CCL20/CCR6 feedback exaggerates epidermal growth factor receptor-dependent MUC5AC mucin production in human airway epithelial (NCI-H292) cells," *Journal of Immunology*, vol. 186, no. 6, pp. 3392–3400, 2011.
- [54] B. O. V. Shum, M. S. Rolph, and W. A. Sewell, "Mechanisms in allergic airway inflammation—lessons from studies in the mouse," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 10, no. 16, article e15, 2008.
- [55] K. F. Chung, "Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma," *The Lancet*, vol. 386, no. 9998, pp. 1086–1096, 2015.
- [56] W. Al-Ramli, D. Préfontaine, F. Chouiali et al., "TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 123, no. 5, pp. 1185–1187, 2009.
- [57] C. M. Hawrylowicz and A. O'Garra, "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma," *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 4, pp. 271–283, 2005.
- [58] M. Saraiva and A. O'Garra, "The regulation of IL-10 production by immune cells," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 3, pp. 170–181, 2010.
- [59] P. J. Barnes, "Cytokine modulators as novel therapies for asthma," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 42, pp. 81–98, 2002.
- [60] D. F. Choy, K. M. Hart, L. A. Borthwick et al., "TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma," *Science Translational Medicine*, vol. 7, no. 301, pp. 301ra129–301ra129, 2015.
- [61] Y. Wei, B. Liu, J. Sun et al., "Regulation of Th17/Treg function contributes to the attenuation of chronic airway inflammation by icariin in ovalbumin-induced murine asthma model," *Immunobiology*, vol. 220, no. 6, pp. 789–797, 2015.
- [62] H. Nakamura, A. D. Luster, H. Tateno et al., "IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells," *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 281, no. 5, pp. L1288–L1302, 2001.
- [63] M. E. Banwell, N. S. Tolley, T. J. Williams, and T. J. Mitchell, "Regulation of human eotaxin-3/CCL26 expression: modulation by cytokines and glucocorticoids," *Cytokine*, vol. 17, no. 6, pp. 317–323, 2002.
- [64] Y. Motomura, H. Morita, K. Moro et al., "Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation," *Immunity*, vol. 40, no. 5, pp. 758–771, 2014.
- [65] W. Ito, M. Tanimoto, K. Ono et al., "Growth factors temporally associate with airway responsiveness and inflammation in allergen-exposed mice," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 145, no. 4, pp. 324–339, 2008.
- [66] K. Bloemen, S. Verstraelen, R. Van Den Heuvel, H. Witters, I. Nelissen, and G. Schoeters, "The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung," *Immunology Letters*, vol. 113, no. 1, pp. 6–18, 2007.
- [67] J. Kim, A. C. Merry, J. A. Nemezek, G. L. Bolgos, J. Siddiqui, and D. G. Remick, "Eotaxin represents the principal eosinophil chemoattractant in a novel murine asthma model induced by house dust containing cockroach allergens," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 5, pp. 2808–2815, 2001.
- [68] J.-A. Gonzalo, C. M. Lloyd, L. Kremer et al., "Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 98, no. 10, pp. 2332–2345, 1996.
- [69] P. C. Fulkerson, N. Zimmermann, L. M. Hassman, F. D. Finkelman, and M. E. Rothenberg, "Pulmonary chemokine expression is coordinately regulated by STAT1, STAT6, and IFN- δ ," *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 12, pp. 7565–7574, 2004.
- [70] A. P. Vicari, D. J. Figueroa, J. A. Hedrick et al., "TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development," *Immunity*, vol. 7, no. 2, pp. 291–301, 1997.
- [71] A. Ericsson, K. Kotarsky, M. Svensson, M. Sigvardsson, and W. Agace, "Functional characterization of the CCL25 promoter in small intestinal epithelial cells suggests a regulatory role for caudal-related homeobox (Cdx) transcription factors," *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 6, pp. 3642–3651, 2006.
- [72] T. Nabe, C. L. Zindl, W. J. Yong et al., "Induction of a late asthmatic response associated with airway inflammation in mice," *European Journal of Pharmacology*, vol. 521, no. 1–3, pp. 144–155, 2005.