



336427
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A LA UNAM

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
QUIMIOCINAS E INTERLEUCINAS EN TRES
MODELOS MURINOS DE INFLAMACIÓN
ALÉRGICA PULMONAR CON DIFERENTES
GRADOS DE SEVERIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Guillermina Juliana Baay Guzmán

DIR. DE TESIS: Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ
Dra. SARA HUERTA YEPEZ

México, D.F.

2005.

m346023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez
VOCAL: M en C. Juan Antonio Giménez Scherer
SECRETARIO: Q.F.B. Guillermo del Rey Pineda
1er SUPLENTE: Q.F.B. Gerardo García Camacho
2do SUPLENTE: M. en C. Víctor Manuel Sánchez Hidalgo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA DE TESIS

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA E
INFECTOLOGÍA DEL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA CENTRO MÉDICO
NACIONAL "LA RAZA"

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ

ASESOR EXTERNO: DRA. SARA HUERTA YEPEZ

SUSTENTANTE: GUILLERMINA JULIANA BAAY GUZMÁN

MÉXICO, D.F.

2005.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández", Centro Médico Nacional "La Raza" IMSS. Bajo la tutoría del la Dra. Sara Huerta Yopez y la cotutoría del Dr. Mario I Vega Paredes y el Dr. César R González Bonilla.

En el departamento de Patología experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán". Bajo la supervisión del Dr. Rogelio Hernández Pando.

En el laboratorio de Investigación de la Biología de las Quimiocinas. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Bajo la supervisión del Dr. Eduardo García Zepeda.

El proyecto fue aprobado por el comité de investigación local del IMSS (99-693-0014) y recibió financiamiento por parte del IMSS (09 B5 61 2800).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Paay Guzmán

Guillermo de la Cruz

FECHA: 27 Junio 2005

FIRMA: [Firma manuscrita]

Abreviaturas utilizadas:

OVA	Ovalbúmina
Alum	Hidróxido de aluminio en gel
LBA	Lavado bronquioalveolar
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
SS	Solución salina isotónica
i.n.	Intranasal
i.t.	Intratraqueal
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolisacárido
H/E	Hematoxilina y eosina
PAS	Ácido peryódico de Schiff
AHR	Hiperreactividad aérea

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipersensibilidad	2
1.2 Hipersensibilidad mediada por IgE	3
1.3 Fase de Sensibilización	4
1.4 Reacción Inmediata	5
1.5 Fase tardía	6
1.6 Patogenia del asma	7
1.7 Quimiocinas	12
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVO	18
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivos específicos	
7. MATERIAL Y MÉTODOS	19
7.1 Antígeno	
7.2 Anticuerpos	
7.3 Modelos experimentales de Inflamación Pulmonar	
7.4 Preparación del tejido para el análisis histopatológicos	
7.5 Cuenta total y diferencial de células de LBA	
7.6 Inmunohistoquímica	

7.7	Microscopía y análisis morfométrico	
7.8	Procesamiento de los datos	
8.	RESULTADOS	25
8.1	Resultados preliminares	
8.1.1	Evaluación de los modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar	
8.1.2	Evaluación de la inflamación pulmonar	
8.1.3	Medición de la producción de moco por células calciformes y determinación de la eosinofilia en LBA	
8.1.4	Análisis histológico	
8.2	Resultados del trabajo	
8.2.1	Reproducción de los modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar	
8.2.2	Inmunohistoquímica	
8.2.3	Análisis morfométrico	
9.	SECCIÓN DE FIGURAS	33
10.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
11.	CONCLUSIONES	53
12.	PERSPECTIVAS	54
13.	REFERENCIAS	55

1. INTRODUCCIÓN

El asma alérgica es una enfermedad crónica, con episodios agudos de obstrucción reversible del flujo de aire hacia los bronquios o hiperreactividad aérea persistente (AHR "airway hyperreactivity"), por un proceso inflamatorio que ocasiona remodelación del tejido pulmonar a largo plazo (1). Se estima que 15 millones de americanos son afectados por el asma y la morbilidad y mortalidad asociadas con esta enfermedad se encuentran en aumento en naciones industrializadas (2). El costo anual del cuidado de los pacientes con asma excede los seis mil millones de dólares en los Estados Unidos, y en todo el mundo el gasto en medicamentos dirigidos a controlar esta enfermedad se estima en 5.5 mil millones de dólares anuales (3).

Se ha descrito que en México la demanda de consulta por asma en el IMSS disminuyó en el período de 1991 a 2001 lo que sugiere que existe una estabilización en la tendencia ascendente de la enfermedad en el país (4). Sin embargo, algunos datos sugieren que el asma se ha convertido en un problema de las grandes urbes como la Ciudad de México, donde se encuentra relacionada con la inhalación de contaminantes ambientales como el óxido nítrico (5). Es difícil estimar la carga económica de esta enfermedad en nuestro país, pero algunos datos locales pueden dar una idea de la magnitud del problema. En una clínica de Monterrey que atiende a una población cerrada de aproximadamente 30 mil personas, los gastos directos por la atención ambulatoria de asma ascendieron a más de un 1 millón de pesos, considerando una incidencia del 2.5%, que constituye un promedio de 1,300 pesos por persona (6).

1.1. Hipersensibilidad.

Algunos individuos presentan una respuesta inmunitaria adaptativa a sustancias extrañas, no infecciosas e inofensivas para el organismo dando una respuesta excesiva o inadecuada a estímulos antigénicos a esto se le conoce como reacciones de hipersensibilidad. La palabra hipersensibilidad implica una respuesta incrementada, esta respuesta no siempre es elevada pero en su lugar se monta una respuesta inmune inapropiada al antígeno. Existen varias formas de reacciones de hipersensibilidad se han propuesto diversas clasificaciones pero hasta el momento la más aceptada es la de Gell y Coombs (1963) la cual reconoce cuatro tipos de hipersensibilidad (Tabla 1).

Las reacciones dependientes de la respuesta humoral iniciada por anticuerpos o complejos antígenos-anticuerpos, se denominan reacciones de tipo inmediato pues sus síntomas se manifiestan en minutos u horas y aquí entran los tres primeros tipos de hipersensibilidad, mediados por IgE (tipo I), mediada por anticuerpos IgG (tipo II), y por complejos antígeno-anticuerpo (tipo III). El cuarto tipo depende del reconocimiento por parte de las células T, estas reacciones tardan más tiempo y por esto se le conoce como hipersensibilidad tardía.

En la reacción de hipersensibilidad inmediata, diferentes isótopos de anticuerpos inducen diferentes efectores moleculares inmunes, por ejemplo la IgE induce la degranulación de mastocitos liberando histamina y otras moléculas biológicas activas.

Por otra parte los anticuerpos IgG e IgM inducen reacciones de hipersensibilidad por activación del complemento, las moléculas efectoras en esta reacción son complejos de ataque a la membrana y algunos productos del complemento tales como C3a, c4a y c5a.

En la hipersensibilidad tardía estas moléculas efectoras son varias citocinas secretadas por células T. La clasificación de Gell y Coombs sirve para identificar los diferentes mecanismos entre varias reacciones de hipersensibilidad, pero cabe mencionar que existe una mayor complejidad en los efectos secundarios, los cuales dificultan los límites entre estas cuatro categorías (59)(60).

Tabla 1. Clasificación de Gell y Coombs (59)

	Tipo I o anafiláctica	Tipo II o citotóxica	Tipo III o mediada por complejos Ag-Ab	Tipo IV o celular
Mecanismos inmunitarios	Humoral (IgE)	Humoral (IgG)	Humoral (IgG e IgM)	Celular (TH1, TH2, LTC)
Antígeno	Antígeno soluble	Células asociadas a Ag	Antígeno soluble	Antígeno soluble y células asociadas a Ag
Tiempo de aparición	Segundos-minutos	Minutos-horas	Horas	Horas-días
Enfermedades	Rinitis alérgica, asma, anafilaxia sistémica	Alergia a medicamentos (penicilina)	Reacción de Arthus	Dermatitis por contacto

1.2 Hipersensibilidad mediada por IgE (tipo I o anafiláctica).

Esta hipersensibilidad es inducida por antígenos extraños inofensivos a los que se les denomina *alergenos*, en condiciones normales no deberían inducir ninguna respuesta inmune pues son inocuos al organismo pero un porcentaje de la población tiende a desarrollar respuesta a estos alérgenos y se les denomina atópicos y se dice que sufren alergias. La palabra atopia significa inusual pero en realidad la alergia es muy común. Los individuos atópicos producen altas concentraciones de anticuerpos IgE (o reaginas) contra las sustancias alergenizantes.

Para que una persona pueda presentar una respuesta es necesario que sea sensibilizado teniendo una primera exposición al alérgeno por inhalación o atravesando piel y mucosas, en esta no se observa ninguna sintomatología clínica pero se origina una respuesta inmune adaptativa, la cual produce una activación de linfocitos T que coordinan la síntesis de IgE específica por las células B, la IgE

secretada se une a los mastocitos tisulares o basófilos en circulación por los receptores de alta afinidad para el Fcε de estas células quedando así sensibilizadas. Esta respuesta inicial lleva tiempo, pero si se producen posteriores exposiciones al mismo alérgeno se desencadenara una reacción de hipersensibilidad inmediata que se lleva acabo en segundos o minutos y se da por el entrecruzamiento de las moléculas de IgE, causando una degranulación de los mastocitos y los basófilos dando así una liberación de mediadores químicos siendo estos los responsables de las alteraciones clínicas de la anafilaxia, algunos de los efectos principales son la vasodilatación y la contracción del músculo liso. Una vez que un individuo está sensibilizado, las reacciones alérgicas pueden agravarse con cada nueva reexposición al alérgeno pues va aumentando el número de linfocitos T y B que reaccionan frente a esa sustancia (59) (60).

1.3 Fase de Sensibilización

Las células presentadoras de antígeno (principalmente las células de Langerhans) atrapan al alérgeno y lo transportan a los ganglios linfáticos en donde son presentados a los linfocitos Th2 por medio de las moléculas MHC clase II. Los linfocitos Th2 promueven la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B específicos al alérgeno y además por medio de citocinas (en especial la IL-4 e IL-13) favorecen el cambio de isótopo hacia células plasmáticas productoras de IgE. Para finalizar esta etapa las IgE's se unen a través de sus dominios Fc con los receptores específicos FcεRI en la superficie de los mastocitos que se encuentran localizados debajo de la piel y mucosas y asociados a los vasos sanguíneos, y a los basófilos (59) (60).

1.4 Reacción Inmediata

Los mastocitos sensibilizados solo requieren tener una reexposición al alérgeno, cuando esto ocurre dicho alérgeno será reconocido por las IgE's de superficie de estas células y se dará un entrecruzamiento entre ellos. Esto origina señales químicas primero en la membrana celular, luego en el citoplasma y en el núcleo, alterando la fisiología de la célula promoviendo a la liberación de mediadores por la activación de la cascada bioquímica que abarca el recambio de fosfatidilinositol, iones Ca^{2+} y varias enzimas, esta unión es mas efectiva cuando en lugar de ser un dímero de IgE, es un trímero y más si es un tetrámero.

La activación es seguida rápidamente por la degradación de fosfatidilinositol en inositol trifosfato (IP3), la generación de diacilglicerol (DAG) y un aumento del calcio libre intracitoplasmático, la cascada bioquímica produce fusógenos activos en la membrana, como el ácido lisofosfatídico que facilitará la fusión de la membrana de los gránulos y la secreción del contenido granular hacia el tejido vecino. Este contenido puede ser preformado en los gránulos los cuales incluyen a la histamina que es la más abundante y de acción más rápida, induce contracción de músculo liso y vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, también heparina, diversos factores quimiotácticos para polimorfonucleares, neutrófilos y eosinófilos que participan en mecanismos de regulación homeostática y factor activador de plaquetas (PAF).

Estas atraen células al sitio o su acción es similar a la histamina. En ocasiones se produce serotonina (5-hidroxitriptamina) en lugar de histamina o al igual que esta. Otros tipo de mediadores son sintetizados durante el proceso entre estos tenemos a la serie de metabolitos del ácido araquidónico a partir de los lípidos de membrana formados a través de las vías de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa estos son los leucotrienos, las prostaglandinas respectivamente y los tromboxanos ocasionan los mismos efectos que la histamina pero con mayor lentitud y por más tiempo.

Durante estos procesos también se liberan citocinas como IL-5 que es un quimioattractante de eosinófilos, así como el $TNF\alpha$ y la IL-4 las cuales inducen la síntesis de eotaxina por los fibroblastos del tejido adyacente, la eotaxina a su vez es una quimiocina que recluta eosinófilos.

La liberación de todos estos mediadores producen un aumento rápido del flujo sanguíneo local, aumento de la permeabilidad vascular y la contracción de músculo liso, esta respuesta ocasiona reclutamiento de elementos de la respuesta inmune al lugar de la inflamación, ocasionando una liberación masiva de estas sustancias (59) (60).

1.5 Fase tardía

Los objetivos de la producción de algunos mediadores en la reacción inmediata es la atracción de eosinófilos, linfocitos y mastocitos los cuales forman infiltrados inflamatorios y a esto se le denomina la reacción de la fase tardía, la cual es un mecanismo de defensa del huésped frente a algunas infecciones por helmintos y artrópodos normalmente. Sin embargo en una respuesta alérgica esta reacción se encuentra muy aumentada y sin control las cuales a largo plazo (enfermedad crónica), se ocasiona un daño tisular y por lo tanto una remodelación de este tejido dañado, lo que ocasiona disfunción del tejido. Una de las formas mas graves de la hipersensibilidad inmediata es el asma alérgica, en la cual el órgano afectado es el pulmón (59) (60).

1.6 Patogenia del asma

El asma alérgica puede considerarse como un síndrome que se manifiesta por obstrucción bronquial causado por hiperproducción de moco y espasmo bronquial y un proceso inflamatorio crónico que lleva a la remodelación pulmonar. La patogenia del asma es compleja y multifactorial, pues involucra interacciones entre factores genéticos y estímulos ambientales. Se presenta en personas que tienen predisposición a desarrollar respuestas inmunitarias desreguladas con producción de IgE a ciertos alérgenos (7).

Estudios epidemiológicos han demostrado que los factores genéticos tienen un fuerte peso en el desarrollo de AHR, así como con la incidencia, la persistencia y la severidad del asma. (8-12). Sin embargo, otros factores muy importantes que contribuyen a que se desarrolle asma incluyen el ambiente intrauterino, la dieta materna e infantil, las infecciones respiratorias, la ocupación, la exposición a contaminantes del medio ambiente (13) y a contaminantes domiciliarios, especialmente el tabaco (6).

El aspecto más importante en la patogenia del asma es la producción de citocinas que inducen una respuesta inflamatoria pulmonar. Se considera que la respuesta alérgica implica un rompimiento del balance Th-1/Th-2 con predominio de una respuesta Th-2 hacia un alérgeno con la consecuente inflamación y remodelación pulmonar. (14;15). Se sugiere que un individuo puede desarrollar respuestas alérgicas por cualquiera de los siguientes mecanismos:

1. Los antígenos inhalados pueden ser presentados más eficientemente presentados por monocitos y células dendríticas a través de la vía exógena o de MHC de clase II.
2. El tipo de receptor específico de los linfocitos T en combinación con ciertas moléculas de clase II pueden inducir una respuesta más eficiente de linfocitos T CD4+ Th-2.

3. Producción elevada o con mayor actividad de IL-4 que ocasiona producción exagerada de IgE.

4. Mayor actividad de receptores para IgE de alta afinidad en células cebadas, basófilos u otras células efectoras que conducen a una respuesta exacerbada debida a la interacción alérgeno-IgE, con inducción de mediadores inflamatorios, que su vez aumentan los niveles de IgE.

5. Contracción de músculo liso en respuesta a la liberación de agonistas por células efectoras debido a un defecto o una disminución de receptores β_2 adrenérgicos.

6. Cambios en receptores específicos que favorecen mayor respuesta a antígenos inhalados.

La mayoría de las observaciones clínicas y experimentales acerca de la patogenia del asma alérgica permiten concluir que la enfermedad se debe a un "desbalance" entre el fenotipo Th-1 (inmunidad mediada por células) y el Th-2 (Inmunidad mediada por anticuerpos) en los linfocitos T CD4⁺ específicos para un alérgeno. En 1986, Mosmann y colaboradores, describieron dos diferentes poblaciones de linfocitos T CD4⁺ en ratones, las cuales se diferencian de acuerdo al tipo de citocinas que producen (16). Los linfocitos llamados Th-1 producen principalmente IL-2, IFN γ , y TNF α . En contraste, los Th-2 producen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13 (17). Las citocinas producidas por cada una de estos subtipos funciona de manera autocrina y promueve el crecimiento de su propio fenotipo. La retroalimentación de IL-4 producida por linfocitos Th-2 puede mantener esta población activada. Además, existe una regulación positiva de los linfocitos Th-2 por IL-4 y de los linfocitos Th-1 por IFN- γ . Estas citocinas pueden a su vez disminuir la actividad de células T de tipo opuesto. La IL-2 y el IFN- γ que son producidos por linfocitos Th-1 pueden amplificar la respuesta Th-1, lo cual a su vez inhibe una respuesta Th-2.

La diferenciación hacia linfocitos Th-1 o Th-2 depende del microambiente en que se desarrolla la sinapsis inmunológica. Si las células presentadoras de

antígenos presentan a un antígeno a una linfocito T virgen o "naive" en presencia de IL-12, dicha célula se diferenciará hacia Th-1 (18), en tanto que el desarrollo de las linfocitos Th-2 depende de la presencia de IL-4 (19). El mecanismo por el que cual la IL-12 y la IL-4 determinan esta diferenciación funcional todavía no está claro.

La endotoxina, los componentes virales, y las bacterias intracelulares (*Legionella* y *Mycoplasma*), estimulan la producción de IL-12 y pueden favorecer una respuesta de tipo Th-1. Sin embargo, si la IL-4 está presente en el microambiente, puede dominar sobre las demás citocinas (17). La concentración del antígeno también es muy importante en el proceso de diferenciación, pues concentraciones bajas de antígeno generan preferentemente respuestas Th-2, mientras que dosis altas de antígeno incrementan la producción de IL-4, favoreciendo una respuesta de tipo Th-2 (17).

Aunque la mayor parte de los datos que se tienen hasta en la actualidad han sido derivados de modelos murinos, es claro que la diferenciación funcional Th-1/Th-2 ocurre en la respuesta inmunitaria del humano. Esto es particularmente evidente en las enfermedades alérgicas. En células obtenidas de lavados bronquioalveolares de pacientes con asma alérgica se ha demostrado una alta proporción de células productoras de IL-4, IL-5 y GM-CSF (20). En biopsias bronquiales de pacientes con asma, los niveles del mRNA para IL-4 e IL-5 se encuentran elevados (21). La expresión del factor de transcripción GATA-3, el cual es necesario para la producción de IL-5 y se encuentra exclusivamente en linfocitos Th-2, se encuentra incrementado en las vías aéreas de sujetos asmáticos (22).

El asma alérgica se desencadena después de un proceso de "sensibilización", el cual inicia con la inhalación de un antígeno del medio ambiente. La inhalación del antígeno evita la eliminación del mismo y penetra hasta el epitelio, en donde es captado por células dendríticas (23), las cuales se

trasladan a los nódulos linfáticos regionales, donde actúan como células presentadoras de antígeno a los linfocitos B y T. En presencia de IL-4 e IL-13, los linfocitos B maduran a células plasmáticas productoras de IgE (24). En ensayos *in vitro*, la IL-4 y la IL-13 pueden inducir la liberación de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión (25). La inhalación de IL-4 causa AHR en respuesta a la metacolina e incrementa la cantidad de eosinófilos en esputo de pacientes asmáticos (26). Por otro lado, los ratones transgénicos que sobreexpresan la IL-13, desarrollan AHR, activación de células caliciformes (productoras de moco) y eosinofilia en vías aéreas (27).

Además, el tejido pulmonar de pacientes con asma alérgica presenta abundantes linfocitos Th-2 activadas productoras de IL-4 (28). Si se bloquea la IL-4 durante la sensibilización antigénica se suprime el desarrollo del asma alérgica. Sin embargo, si se bloquea la IL-4 antes o durante el reto antigénico no se inhibe la inflamación o el AHR (29). La IL-13 se une a la cadena alfa del receptor de la IL-4. Si se bloquea IL-13 da como resultado una reversión completa de la AHR y la producción de moco inducida por el alergeno. La administración de IL-13 recombinante induce un incremento en la producción de moco en vías aéreas (30).

Después de la activación primaria de las células T por las células presentadoras de antígeno, los linfocitos B producen la IgE específicas para el alergeno. Esta IgE es liberada a torrente sanguíneo y rápidamente se unen a receptores IgE de alta afinidad (FcεRI) que se encuentran en la superficie de células cebadas y basófilos de sangre periférica y a los receptores de IgE de baja afinidad (FcεRII o CD23) que se encuentran en la superficie los linfocitos, eosinófilos, plaquetas y macrófagos (24). Una vez que las IgE específicas para el antígeno se encuentran unidas a las células cebadas, futuras exposiciones con el antígeno puede inducir una rápida activación.

Las células cebadas expresan el receptor FcεRI, cuando las moléculas de IgE específicas para el alergeno que se encuentran en la superficie de las células

cebadas, interactúan con el alérgeno, ocurre el entrecruzamiento del complejo IgE-receptor. Este entrecruzamiento induce la activación de una cascada de señales, que causa la liberación de gránulos preformados que contienen histamina, triptasas, ecosanoides, radicales libres y citocinas de tipo Th-2 (24). Esta exocitosis de mediadores preformados constituye la reacción de fase temprana. Los mediadores de acción inmediata son responsables de los síntomas que se presentan en los episodios agudos del asma alérgica. La histamina induce la contracción del músculo liso de las vías aéreas, la secreción de moco, y la vasodilatación. La pérdida de la integridad de microvasculatura, y el paso de las proteínas del plasma a las paredes de las vías aéreas causa la el estrechamiento del lumen (31). La triptasa potencia el efecto de la histamina, causando contracción del músculo liso (31). La liberación de leucotrienos también induce inflamación y son los causantes de la reacción de fase tardía, la cual principalmente involucrado en el reclutamiento y activación de los eosinófilos, células T CD4+ de tipo Th-2, macrófagos, y neutrófilos (32). Una vez que la reacción de fase tardía inicia, los eosinófilos son los principales mediadores de la inflamación crónica en los pacientes con asma.

La IL-5 es la principal citocina responsable de la diferenciación de los eosinófilos. En ratones, la sobreproducción de IL-5 mediante un transgene induce una eosinofilia muy marcada. En contraste, cuando el gene de la IL-5 es eliminado, se reduce de manera muy significativa la eosinofilia después del reto antigénico. Los eosinófilos son reclutados al pulmón por quimiocinas (eotaxina 1 y 2) liberadas principalmente por células cebadas y linfocitos T. Cuando los eosinófilos llegan a las vías aéreas, liberan sus gránulos y causan daño directo a tejido, contracción de músculo liso e incremento de la permeabilidad vascular (32). Cuando se establece el círculo vicioso de daño tisular y reclutamiento de células inflamatorias el asma se convierte en un proceso crónico con ataques agudos aún en ausencia del alérgeno, pues se desencadenan con cualquier factor que dispare el fenómeno inflamatorio.

En condiciones normales y en términos generales el sistema inmunitario tiene la función de protección (contra infecciones, rechazo a injertos, desarrollo de tumores o contra cualquier patógeno extraño al organismo) y tiene la capacidad de distinguir entre lo propio y lo extraño. Pero en algunas ocasiones la protección que brinda el sistema inmunitario suele ser perjudicial. Esto puede ser por que su funcionamiento se modifica por exposición a agentes infecciosos o bien por defectos hereditarios. Esto se observa en patologías como la hipersensibilidad, la inmunodeficiencia y la autoinmunidad.

1.7 Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de citocinas con propiedades quimioattractantes. Se dividen en cuatro subfamilias: C, CC, CXC y CX3C, de las cuales las CXC (α quimiocinas) y CC (β quimiocinas) son las más ampliamente estudiadas. Esta clasificación se basa en su homología y en la posición de los dos primeros residuos de cisteínas de su extremo amino terminal. Entre las quimiocinas CC que tienen importancia en la patogenia del asma se encuentran RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) (CCL5), MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-3) (CCL7), MCP-4 (CCL13), MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein 1 alpha) (CCL3) y las eotaxinas 1 a 4. y entre las quimiocinas CXC que intervienen en el desarrollo de asma se encuentran la IL-8 (CXCL8) y el SDF-1 (Stromal cell-derived factor) (CXCL12) (33).

Se ha descrito que varias quimiocinas están relacionadas con la severidad de la respuesta inflamatoria y la AHR en el asma alérgica. Algunas han sido localizadas en poblaciones específicas de células pulmonares (como macrófagos y células epiteliales) de estos pacientes (34;35) y se ha demostrado que las eotaxinas, IL-8, RANTES, MCP-3 y MCP-4, están directamente relacionadas con el reclutamiento de eosinófilos y consecuentemente con el desarrollo del infiltrado inflamatorio del parénquima pulmonar. Las quimiocinas también reclutan

leucocitos activados, inducen la degranulación de basófilos, células cebadas, neutrófilos y eosinófilos, ocasionando la liberación de mediadores inflamatorios y AHR (35;36). En particular, se ha demostrado que MCP-1 participa de manera importante durante la fase temprana de la respuesta alérgica, debido a su propiedad de activar células cebadas y liberar LTC4 en las vías aéreas (37).

Diversas quimiocinas CC tienen la capacidad de reclutar eosinófilos. Estudios en modelos animales han permitido identificar que MIP-1 α , eotaxina, MCP-3, y RANTES intervienen en el reclutamiento de eosinófilos durante la respuesta alérgica de vías aéreas (38;39). La migración de los eosinófilos desde el espacio intravascular hasta el intersticio del pulmón es dependiente de RANTES y MIP-1 α . La eotaxina es necesaria para la acumulación de eosinófilos durante el estado crónico de la respuesta. MCP-3 y MCP-4, no solo reclutan, son potentes quimioattractantes de eosinófilos, sino que también pueden reclutar monocitos, los cuales tienen un papel esencial en la respuesta inflamatoria crónica.

Además de iniciar y mantener la acumulación de leucocitos en el tejido pulmonar, estas quimiocinas CC tienen la capacidad de aumentar o de inducir la diferenciación de linfocitos hacia el subtipo Th-2 (39). En particular, MCP-1 puede dirigir la población de linfocitos T CD4⁺ no diferenciados (Th-0) hacia linfocitos Th-2 productores de IL-4. Las quimiocinas también inducen el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en linfocitos B, favoreciendo la producción de IgE (40).

Existen por lo menos nueve diferentes familias de receptores para las quimiocinas CC (41). La información acerca de la expresión y función específica de estos receptores en modelos animales o en enfermedades humanas es todavía muy limitada. En general, las quimiocinas CC se unen de manera "promiscua" a diversos receptores. Aunque la distribución de estos receptores no está completamente descrita, se infiere que de manera conjunta pueden reclutar y activar diferentes poblaciones celulares encontradas en las vías aéreas de pacientes asmáticos. CCR2 está presente en monocitos, linfocitos, células

cebadas y basófilos. CCR3 se expresa en eosinófilos, basófilos, células epiteliales y en pequeñas cantidades en linfocitos Th-2 (42;43), los cuales también expresan CCR3, CCR4 y CCR8 (44). Esta información sugiere que estos últimos receptores pueden estar involucrados preferentemente en el reclutamiento de linfocitos. El bloqueo de algunos de estos receptores ha sido propuesto como una alternativa terapéutica. En particular de CCR2, que se une a miembros de la familia de MCP-1, y de CCR3, el cual se une específicamente a eotaxina.

El SDF-1 y su receptor CXCR4 participan en el "homing" de células progenitoras de médula ósea, (45) y en la organogénesis embrionaria pues constituyen la principal guía de las células progenitoras a sitios de expansión rápida vascular. Recientemente, se demostró que la expresión del gene SDF-1 en células endoteliales se encuentra regulada por HIF-1. La expresión de SDF-1 *in vivo* esta correlaciona con la reducción en la tensión de oxígeno e incrementa la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo la migración y el "homing" de células progenitoras CXCR4 positivas. Cuando se bloquea la expresión de SDF-1 o de CXCR4 en tejido isquémico, se inhibe el reclutamiento de células progenitoras al sitio del daño. En consecuencia, se puede inferir que el reclutamiento de células progenitoras CXCR4 positivas que regeneran el tejido, está mediado por un gradiente de hipoxia (46).

La reparación y regeneración de tejidos dañados involucra el reclutamiento selectivo de células progenitoras o pluripotenciales de sangre periférica o residentes. La importancia de SDF-1 en este proceso ha sido bien establecido, pues se ha observado que su expresión correlaciona con el reclutamiento de células progenitoras al tejido en regeneración (47). Aunque existen diversos factores que pueden regular la expresión de SDF-1 durante el daño tisular, como son los mediadores inflamatorios (IL-1 o TNF- α) o los cambios en la matriz extracelular y la alteración en las fuerzas mecánicas, la hipoxia parece ser el estimulante esencial. La actividad de HIF-1 α disminuye durante el envejecimiento, por lo que con la edad disminuye la capacidad de regenerar tejidos (48).

Recientemente se identificó que SDF-1 participa en la remodelación pulmonar en asma, pues mediante técnicas de inmunohistoquímica se demostró que la expresión de SDF-1 correlaciona con la generación de vasos en la mucosa bronquial (49). Sin embargo, no existen a la fecha trabajos que demuestren una conexión entre hipoxia, HIF-1 α , expresión de SDF-1 y CXCR4 en el proceso de remodelación pulmonar que se presenta en el asma alérgica.

Debido a la complejidad y organización del tejido pulmonar, las investigaciones acerca de la patogénesis del asma ha sido probado en modelos animales y la información obtenida se ha extrapolado en la enfermedad humana. Numerosos experimentos en modelos animales se han reportado en la literatura, los cuales incluyen ratas, cobayos, gatos, ratones, entre otros animales. Muchos estudios se han realizado en ratones usando OVA como alérgeno y diferentes regímenes experimentales se han probado utilizando alérgeno en forma de aerosol solo o junto con adyuvantes en diferentes vías de inmunización como intraperitoneal, subcutánea, intranasal e intratraqueal.

En este trabajo reproducimos 2 nuevas variantes experimentales descritas previamente en nuestro laboratorio, ambas inducen inflamación alérgica en ratones. Estas fueron comparadas con un modelo bien establecido, descrito en la literatura. Para cada uno de estos tres modelos, las alteraciones histopatológicas en los pulmones fueron analizadas y medidas con un analizador de imágenes automático, el número y tipo de células inflamatorias se determinó en lavados bronquioalveolares (BAL), los niveles de IgE en suero y la producción de IL-4, IL-5, IL-13, IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, eotaxina-2 y SDF-1 se analizaron mediante inmunohistoquímica. Con esto demostramos que estos dos nuevos modelos experimentales inducen un tipo moderado y severo de inflamación pulmonar.

2. JUSTIFICACIÓN

El asma alérgica continúa siendo un problema de salud muy importante en nuestro país. Se trata de un problema que afecta fundamentalmente a la población infantil con un costo económico muy importante y con un impacto en la calidad de vida de los pacientes.

Conocer mejor la participación de las quimiocinas e interleucinas durante los procesos fisiopatología de la inflamación alérgica pulmonar en diferentes grados de severidad en modelos animales permitirá diseñar medidas preventivas y terapéuticas más efectivas en humanos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las quimiocinas y las interleucinas tienen un papel central en el proceso de la inflamación alérgica pulmonar, participan en el reclutamiento de células inflamatorias al tejido, en consecuencia a mayor expresión de quimiocinas e interleucinas existe mayor inflamación, lo cual puede causar daños irreversibles que disminuyen la calidad de vida de los pacientes. No se conocen con exactitud todos los factores que determinan el proceso inflamatorio alérgico pulmonar, pero se sabe que las quimiocinas e interleucinas participan en el inicio y persistencia del fenómeno inflamatorio, además estas citocinas se expresan de manera diferente durante los diversos grados de la enfermedad. Por lo que consideremos que en la inflamación alérgica pulmonar existe una relación directa de la expresión local de las quimiocinas y las interleucinas, con la severidad de dicha enfermedad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Como se encuentra la expresión de las quimiocinas IP-10, IL-8, MCP-1, MIG, eotaxina-2 y SDF-1 y las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar con diferentes grados de severidad?

5. HIPÓTESIS

Las quimiocinas IP-10, IL-8, MCP-1, MIG, eotaxina-2 y SDF-1 e interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 tienen un papel central en el proceso inflamatorio alérgico pulmonar. Participan en el reclutamiento de células inflamatorias al tejido, por ello es razonable pensar que su expresión en pulmón puede correlaciona directamente con el grado de severidad de inflamación pulmonar en un modelo experimental.

6. OJETIVO

6.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de las quimiocinas IP-10, IL-8, MCP-1, MIG, eotaxina-2 y SDF-1, y las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar con diferentes grados de severidad.

6.2 Objetivos específicos

- 1.** Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para la evaluación de la expresión de las quimiocinas IP-10, IL-8, MCP-1, MIG, eotaxina-2 y SDF-1 en tejido pulmonar, en un modelo murino de asma alérgica.
- 2.** Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para la evaluación de la expresión de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 en tejido pulmonar, en un modelo murino de asma alérgica.
- 3.** Evaluar mediante análisis morfométrico la correlación entre la expresión IL-4, IL-5 e IL-13 con el grado de severidad de la inflamación alérgica pulmonar.

7. Material y Métodos

7.1 Antígeno

En todas las inmunizaciones se uso, ovoalbúmina (OVA) grado V (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. USA).

7.2 Anticuerpos

Para el análisis de inmunohistoquímica, se utilizaron los siguientes anticuerpos

Interleucinas:

- ❖ Anticuerpo policlonal anti- IL-5 de ratón hecho en cabra (R&D System)
- ❖ Anticuerpo policlonal anti-IL-13 de ratón hecho en cabra (R&D System)
- ❖ Anticuerpo policlonal anti- IL-4 de ratón hecho en cabra (R&D System)

Quimiocinas:

- ❖ Anticuerpo policlonal anti IP-10 de ratón hecho en conejo (Peprotech)
- ❖ Anticuerpo policlonal anti IL-8 de humano hecho en conejo (Peprotech)
- ❖ Anticuerpo policlonal anti MIG de humano hecho en conejo (Peprotech)
- ❖ Anticuerpo policlonal anti eotaxina-2 de ratón hecho en cabra (Peprotech)
- ❖ Anticuerpo policlonal anti MCP-1 de ratón hecho en conejo (Peprotech)
- ❖ Anticuerpo policlonal anti SDF-1 de ratón hecho en cabra (Santa Cruz)

Inmunohistoquímica:

Para disminuir la in-especificidad utilizamos un solución bloqueadora que contenía una mezcla de bloqueador universal (DAKO corporation) y Albúmina sérica bovina al 1 % (Sigma).

En este trabajo se utilizó en "kit" comercial DAKO LSAB + peroxidase universal (K0690) (DAKO Corporation).

Como sustrato para desarrollar el color en las inmunotinciones se utilizó DAKO LIQUID DAB + Substrate-Chromogen Solution (K3468) (DAKO Corporation).

Para contravenir utilizamos hematoxilina de Harrison (Termo Electrón Corporation).

7.3 Modelos experimentales de Inflamación Pulmonar

Grupos de 10 ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad libres de patógenos, se usaron en los diferentes experimentos. Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, "Salvador Zubirán". En todos los experimentos los animales fueron tratados de acuerdo a las normas establecidas por la Ley de Protección a los Animales en el DF, y por la NOM-062-ZOO1999 de éticas de cuidado y manejo de animales.

Los esquemas de sensibilización fueron los siguientes y estos se resumen en la Tabla 2.

Modelo 1 (M-1). Los ratones fueron sensibilizados con 10 µg de OVA disuelta en 100 µl de SS vía i.p. Después de 14 días los animales se retaron con 50 µl de solución de OVA 1.5% por vía i.t. Diez días recibieron un segundo reto con OVA i.t a la misma concentración y fueron sacrificados al día 28.

Modelo 2 (M-2). Los ratones reciben 10 µg de OVA en 100 µl de SS-1 mg de alumbre vía i.p en los días 0 y 5, en el día 12 se retaron con solución de OVA 0.75% en 100 µl de SS vía i.t. Cuatro días después se sacrificaron.

Modelo 3 (M-3). Los ratones recibieron 10 µg de OVA en 100 µl de SS-1 mg de alumbre vía i.p los días 0 y 5, en el día 12 y 22 se retaron vía i.t con OVA 0.75% disuelta en 100 µl de SS. Cuatro días después se sacrificaron.

Los grupos controles también de 10 ratones para cada uno de los esquemas, recibieron SS en lugar de OVA.

Los ratones fueron anestesiados en una cámara de cloroformo y posteriormente sacrificados por exanguinación. El suero se colectó y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Tabla 2. Modelos de Sensibilización

Modelos	Sensibilización	Reto	Sacrificio
1	10 µg OVA en 100 µl SS I.P. (Día 0)	50 µl sol OVA 1.5% en SS I.T. (Día 14 y 24)	Día 28
2	10 µg OVA en 100 µl SS-1 mg alumbre I.P. (Día 0 y 5)	OVA 0.75% sol en 100 µl SS I.T. (Día 12)	Día 16
3	10 µg OVA en 100 µl SS-1 mg alumbre I.P. (Día 0 y 5)	OVA 0.75% sol en 100 µl SS I.T. (Día 12 y 22)	Día 26
Grupos controles esquemas iguales pero utilizando SS solamente			

7.4 Preparación del tejido para el análisis histopatológicos

Grupos de 5 animales fueron sacrificados por exanguinación, uno de los pulmones se perfundió vía i.t con 1 ml de etanol absoluto. Después de 24 horas de tratamiento los pulmones fueron deshidratados y embebidos en parafina.

Secciones seriadas de 4 μm fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E) y con ácido periódico de Schiff (PAS) para identificar las células productoras de moco. Para la cuantificación, se usaron 5 laminillas con lóbulos pulmonares seleccionados al azar, con aumento de 40 x se determina el área del infiltrado inflamatorio peribronquial y perivascular en cuadrantes usando un analizador automático de imágenes (Leica Qwin).

7.5 Cuenta total y diferencial de células de lavados bronqueoalveolares (LBA)

Grupos de 5 animales se sacrificaron por exanguinación. LBA se obtuvieron introduciendo una cánula en una pequeña incisión en la traquea, con esta se lavaron los pulmones 6 veces con 1 ml de solución salina isotónica (SSI) a 4° C.

Los fluidos de LBA se centrifugaron a 1200 rpm por 10 min y el botón de células se resuspendió en 1 ml SSI. El número de células totales se determina usando un hematocitómetro. La cuenta diferencial de células fue determinado utilizando un frotis de LBA después de ser teñidos con H&E. El tipo de células se expresó en porcentaje de 200 células contadas por preparación.

7.6 Inmunohistoquímica

Las tinciones de inmunohistoquímica se realizaron a partir de secciones seriadas del mismo tejido pulmonar embebido en parafina, se montaron en laminillas cubiertas con silano (Sigma, Cal. USA). Las secciones del tejido fueron desparafinadas en un horno de calentamiento a 62°C por 1 hora, posteriormente el tejido fue hidratado sumergiéndolo en xilol 3 veces por 8 min, etanol 100% 2 veces, etanol 90%, etanol 70% y agua destilada 5 min después se realizó la recuperación de antígeno utilizando citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) en baño maría a ebullición por 25 min, se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno (3% por 25 min). Se bloqueó con una mezcla de bloqueador universal (DAKO) y albúmina sérica bovina (BSA) al 1% por 60 min. Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en agitación con los diferentes anticuerpos (IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IP-10, MIP-1, MIP-5, MIG, EOT-2 y SDF-1) en diluciones 1:250 en PBS-BSA. Después de lavar las secciones de tejido se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina (Link, DAKO LSAB + kit) y después con Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR), por último el color se generó mediante la adición de substrato DAB (diamino benzidina) (DAKO Liquid DAB+ Kit) (1-2 min) se detuvo la reacción con agua destilada y se contratiñó con hematoxilina, posteriormente se deshidrató con agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xilol 5 minutos en cada uno, el tejido se preservó con un medio de montaje (resina)

De este modo se procedieron a hacer las comparaciones entre los ratones tratados con SS y OVA.

7.7 Microscopía y análisis morfométrico

La laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células y los infiltrados inflamatorios se cuantificaron 8 campos en 4 pulmones diferentes, utilizando un analizador de imágenes con el programa Image-Pro® Plus (Media Cybernetics®, Silver Spring, MD, USA).

7.8 Procesamiento de los datos

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa SPSS ver 10.0 para Windows®. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas y desviación estándar. Si los coeficientes de variación son mayores al 20% se presentarán las medianas y los cuartiles. Se utilizarán pruebas no paramétricas para establecer si existen diferencias de la proporción de células.

8. RESULTADOS

8.1 Resultados preliminares

8.1.1 Evaluación de los modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar

Se evaluaron tres modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar en ratones utilizando OVA como alérgeno, uno de estos modelos (M-1) ha sido descrito previamente, fue comparado con dos variantes experimentales (M-2, M-3) que se estandarizaron en nuestro laboratorio .(50)

8.1.2 Evaluación de la inflamación pulmonar

La figura 1 muestra que la administración de SS en animales control indujo inflamación moderada de tipo mononuclear en el área peribronquial ($7000 \text{ m}\mu^2 \pm 628$) y perivascular ($3000 \text{ m}\mu^2 \pm 959$). La administración de OVA por inyección i.t. en animales previamente sensibilizados con el mismo alérgeno por vía i.p. sin alum, produjo un ligero incremento de la inflamación perivascular y peribronquial (Figura 1A y 1B). En contraste, la sensibilización i.p. con OVA y alum acompañada de la inyección i.t. de una sola dosis de OVA indujo un incremento del 300% de el área de inflamación perivascular y en animales con el mismo esquema de sensibilización pero con dos inyecciones i.t. de OVA produjo un incremento del área inflamatoria de 600% y 300% en el compartimiento perivascular y peribronquial respectivamente en comparación con los animales control (Figura 1A y 1B).

8.1.3 Medición de la producción de moco por células calciformes y determinación de la eosinofilia en LBA

En la figura 2A se muestra que la cuantificación automatizada de células calciformes productoras de moco también correlaciona con la extensión del infiltrado inflamatorio producido por los diferentes modelos para producir inflamación alérgica pulmonar. El porcentaje de células calciformes producido por la administración de OVA mediante M-1 produjo menos del 10% de células calciformes. En contraste, los animales sensibilizados con OVA y alum que recibieron dos inyecciones de OVA i.t. (M-3) tuvieron más del 80% de células productoras de moco. Porcentajes menores pero de más del 60% de células productoras en el epitelio bronquial se observó en los ratones que recibieron OVA mediante M-2. Mientras que los grupos que recibieron solo SS el porcentaje de células productoras de moco fue del 0 – 4% en todos los modelos evaluados.

Figura 2B. En esta figura se muestra la cuantificación del infiltrado de eosinófilos en LBA de los ratones después de la sensibilización con OVA utilizando los diferentes modelos ya mencionados, comparados con los controles de SS. El cálculo se realizó a partir de preparaciones de los LBA teñidos con H/E se identificaron morfológicamente 200 células. En los animales sensibilizados con el M-1, 96 h después del último reto, el porcentaje de eosinófilos aumenta significativamente con respecto a los controles ($p \leq 0.05$). Los valores obtenidos con este modelo de sensibilización son consistentes con lo reportado anteriormente. Sin embargo, en los grupos de ratones inmunizados con M-2 y M-3 se induce una inflamación intensa no reportada con anterioridad, ya que el porcentaje de eosinófilos es mucho mayor con respecto a los controles, 5 veces más altos en el caso de M-2 y 8 veces para M-3 ($p \leq 0.05$).

8.1.4 Análisis histológico

Las imágenes de las secciones de tejido pulmonar de ratones parafinado que se tiñeron con H/E se muestran en la figura 3, el M-1 presentó una inflamación pulmonar leve (Fig. 3A); en cambio el M-2 induce inflamación moderada (Fig. 3C) y el M-3 inflamación severa (Fig. 3E). Por otro lado, las secciones teñidas con PAS para detectar mucina (producción de moco), muestran que se presenta escaso material PAS-positivo en el lumen bronquial en los ratones sensibilizados con M-1 (Fig. 3B), mientras que los sensibilizados con M-2 presentan mayor cantidad de este material (Fig. 3D). Los ratones sensibilizados con M-3 muestran una abundante producción de moco que invade casi en su totalidad la luz del bronquio (Fig. 3F). Es importante señalar que los ratones que recibieron solo SS con cualquiera de estos modelos, mostraron una leve inflamación pulmonar y escaso material PAS-positivo (Dato no presentado).

8.2 Resultados del trabajo

8.2.1 Reproducción de los modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar

Se reprodujeron tres modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar en ratones utilizando OVA como alérgeno, uno de estos modelos (M-1) ha sido descrito previamente, fue comparado con dos variantes experimentales (M-2, M-3) que se estandarizaron en nuestro laboratorio. Para confirmar que los modelos presentaran inflamación leve (M-1), moderada (M-2) y severa (M-3) se realizó una tinción del tejido con H/E (dato no mostrado).

8.2.2 Inmunohistoquímica

Se evaluó la expresión de las diferentes quimiocinas e interleucinas en las secciones pulmonares de los ratones sensibilizados con M-3 (severo) mediante inmunohistoquímica, se utilizaron anticuerpos específicos para cada una de las quimiocinas e interleucinas estudiadas y se reveló con un sistema basado en peroxidasa de rábano.

Expresión de IP-10

Como se muestra en la figura 4 la expresión de IP-10 en el tejido pulmonar de ratones que recibieron OVA (alérgeno) fue principalmente localizada en linfocitos e histiocitos de infiltrados inflamatorios tanto en el área peribronquial como en el área perivascular. La foto muestra un abundante infiltrado inflamatorio con diversas células positivas para IP-10 con inmunotinción principalmente en el citoplasma, aunque también puede observarse tinción en la membrana citoplásmica. Mientras que en los controles se muestra una importante tinción basal en las células del epitelio bronquial.

Expresión de IL-8

La figura 5 muestra la expresión de IL-8 principalmente en linfocitos, e histiocitos presentes en el intenso infiltrado peribronquial y así como también en células que están formando el epitelio bronquial las cual se observan intensamente teñidas en ratones tratados con OVA. La inmunotinción se observa tanto en citoplasma como en la membrana celular. La figura también muestra que existe una inmunotinción basal en las células del epitelio bronquial del tejido pulmonar de los controles.

Expresión de MCP-1

La figura 6 muestra la expresión de MCP-1 exclusivamente en histiocitos presentes en el infiltrado inflamatorio tanto perivascular, como peribronquial en los ratones que recibieron OVA. La inmunotinción es intensa en el citoplasma y membrana celular. Nótese la negatividad de la tinción en los demás subtipos celulares presentes en el infiltrado, así como en los controles.

Expresión de MIG

Como se muestra en la figura 7 la expresión de MIG es principalmente en linfocitos e histiocitos presentes en los infiltrados perivasculares y peribronquiales, así como en células del epitelio bronquial en ratones que recibieron OVA. En todas estas células se observa una tinción intensa tanto en citoplasma como en la membrana celular. Mientras que en los controles no se observa tinción.

Expresión de Eotaxina-2

Como se muestra en la figura 8 la expresión de eotaxina 2 es principalmente observada en linfocitos e histiocitos que forman parte del infiltrado perivascular peribronquial de los ratones que fueron tratados con OVA, la tinción aunque no es

muy intensa se observa en citoplasma y membrana celular. En los controles se observa una leve tinción basal en las células del epitelio bronquial.

Expresión de SDF-1

La figura 9 muestra la expresión de SDF1 la cual se observa principalmente en células del epitelio bronquial las cuales se tiñen de manera muy intensa tanto en el citoplasma como en la membrana celular. También se observa una clara expresión en linfocitos y una leve expresión en histiocitos, presentes en infiltrados perivasculares y peribronquiales, esto en los ratones tratados con OVA. Nótese que en los controles no se observa tinción.

Expresión de IL-4

Como se muestra en la figura 10 la expresión de IL-4 se observa exclusivamente en los abundantes linfocitos presentes en los infiltrados perivasculares y peribronquiales en el tejido pulmonar de los ratones que recibieron OVA. La tinción se observa muy intensa en citoplasma y membrana celular, a diferencia de los controles en donde no se observa tinción.

Expresión de IL-5

La figura 11 muestra la expresión de IL-5 también se observa en los linfocitos, los cuales se encuentran en gran número formando parte de los infiltrados perivasculares y peribronquiales, esto en los tejidos pulmonares de los ratones que recibieron OVA. La expresión es muy intensa tanto en el citoplasma, como en la membrana celular. No se observa tinción en los controles.

Expresión de IL-13

Como se muestra en la figura 12 la expresión de IL-13 se observa con intensa positividad en el citoplasma y membrana celular de linfocitos e histiocitos de infiltrados inflamatorios perivasculares para los ratones que fueron tratados con OVA. A diferencia de los controles en donde no se observó tinción.

8.2.3 Análisis Morfométrico.

Se evaluó de manera cuantitativa la expresión de IL-4 a partir de las tinciones de inmunohistoquímica realizadas. Esta evaluación se realizó en los 3 diferentes modelos de sensibilización (M-1, M-2 y M-3), en cada modelo se evaluaron por lo menos 5 diferentes campos (a 40X) en cada uno de los tejidos pulmonares de al menos 4 ratones por cada modelo. Tanto en los ratones tratados con OVA, como en los controles.

Expresión de IL-4

La figura 13 muestra que la administración de SS en animales no se observa la presencia de células IL-4 positivas tanto en el área peribronquial (fig. 13A), como perivascular (fig. 13B). La administración de OVA por vía i.t. en animales previamente sensibilizados con el mismo alérgeno por vía i.p. En el M-1 se observa la presencia de células IL-4 positivas de casi un 20% ($300 \mu\text{m}^2$), mientras que en M-2 se observa un 35% de células IL-4 positivas tanto en infiltrados perivasculares (Fig. 13A) como en infiltrados peribronquiales (Fig. 13B). Para el caso de M-3 se observa un incremento significativo de células IL-4 positivas, en donde se alcanza un casi un 60% en infiltrados perivasculares (Fig. 13A) y de un 70% en infiltrados peribronquiales (Fig. 13B).

Expresión de IL-5

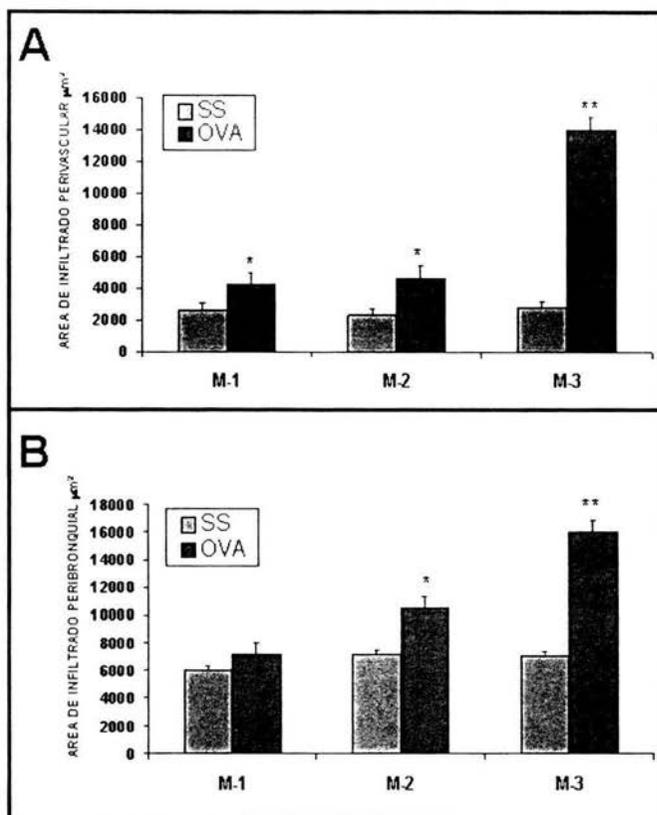
La figura 14 muestra que la cuantificación de células positivas para IL-5 de en animales que recibieron OVA y los controles de SS. La administración de OVA por vía i.t. en animales previamente sensibilizados con el mismo alérgeno por vía i.p. En el M-1 se observa menos del 2% de células IL-5 positivas en infiltrados perivasculares (Fig. 14A), como en el área peribronquial (Fig. 14B), mientras que en M-2 se observa un 6% de células IL-5 positivas infiltrados en perivasculares (Fig. 14A) y de un 18% en los infiltrados peribronquiales (Fig. 14B). Para el caso de M-3 se observa un 8% en infiltrados perivasculares (Fig. 14A) y un incremento significativo del 25% en infiltrados peribronquiales (Fig. 14B).

Expresión de IL-13

La figura 15 muestra que la cuantificación de células positivas para IL-13 de en animales que recibieron OVA y los controles de SS. La administración de OVA por vía i.t. en animales previamente sensibilizados con el mismo alérgeno por vía i.p. En el M-1 se observa menos del 5% de células IL-13 positivas en infiltrados perivasculares (Fig. 15A), como en el área peribronquial (Fig. 15B), mientras que en M-2 se observa un 18% de células IL-13 positivas infiltrados en perivasculares (Fig. 15A) y de un 10% en los infiltrados peribronquiales (Fig. 15B). Para el caso de M-3 se observa un incremento significativo de células IL-13 positivas, en donde se alcanza un casi un 25% en infiltrados perivasculares (Fig. 15A) y de un 55% en infiltrados peribronquiales (Fig. 15B).

9. SECCIÓN DE FIGURAS

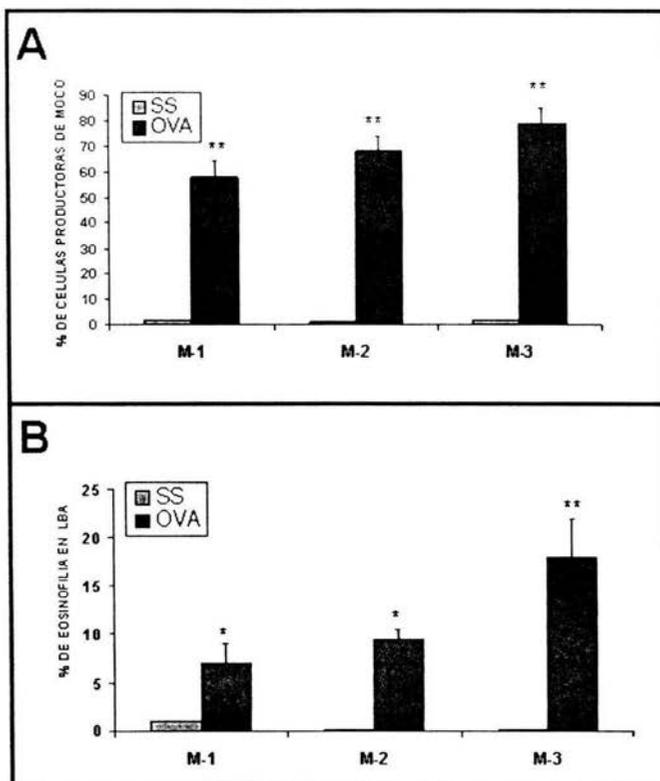
Figura 1
Evaluación de la inflamación pulmonar



Análisis morfométrico del infiltrado perivascular (A), peribronquial (B) en ratones que fueron tratados con SS o con OVA, utilizando los diferentes modelos de sensibilización mencionados en materiales y métodos. Cortes seriados de tejido pulmonar de 4 ratones por cada grupo fueron teñidos con H/E y se observaron utilizando microscopia de luz (40X de magnificación) en un analizador de imágenes como se describe en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio de cada grupo \pm DS.

* $p < 0.05$ comparado con el grupo control, ** $p < 0.02$ comparado con el grupo control

Figura 2
Medición de producción de moco y
determinación de eosinófilos en LBA

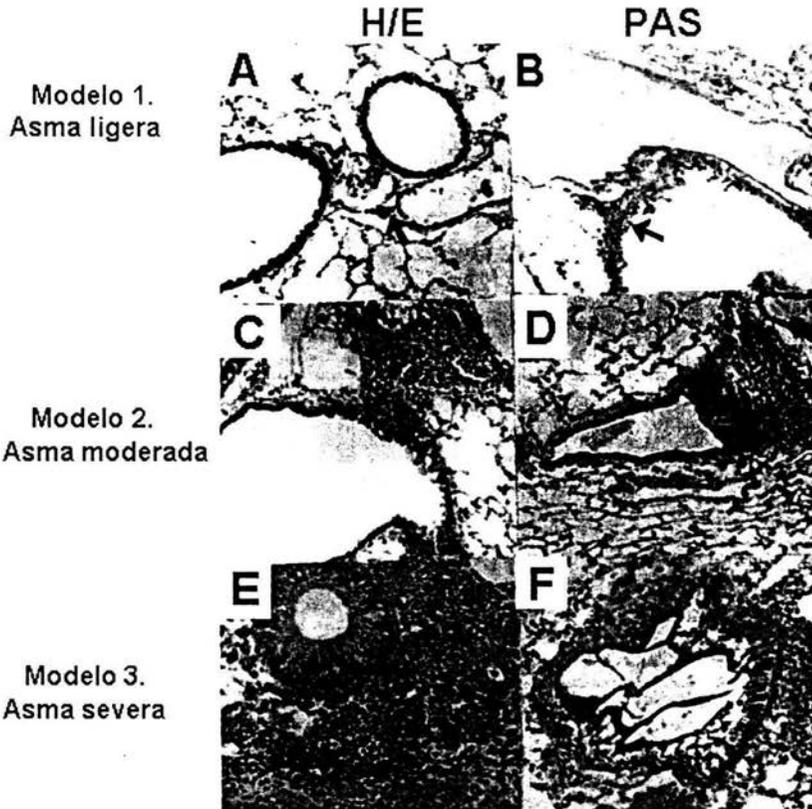


Medición de la producción de moco tejido pulmonar (A), y porcentaje de eosinófilos en LBA (B) en ratones que fueron tratados con SS o con OVA, utilizando los diferentes modelos de sensibilización mencionados en materiales y métodos. Para la medición de producción de moco, cortes seriados de tejido pulmonar de 4 ratones por cada grupo fueron teñidos con PAS y se observaron utilizando microscopia de luz (40X de magnificación) en un analizador de imágenes como se describe en materiales y métodos. Para la cuantificación de eosinófilos, la preparación de cada uno de los LBA fueron realizadas en un citospin, teñidas con H/E y contadas utilizando microscopia de luz (X100 magnificaciones). En total 200 células fueron identificadas en cada laminilla basandonos en los criterios de morfología tradicionales. Los resultados representan el promedio de cada grupo \pm DS.

* $p < 0.05$ comparado con el grupo control, ** $p < 0.02$ comparado con el grupo control

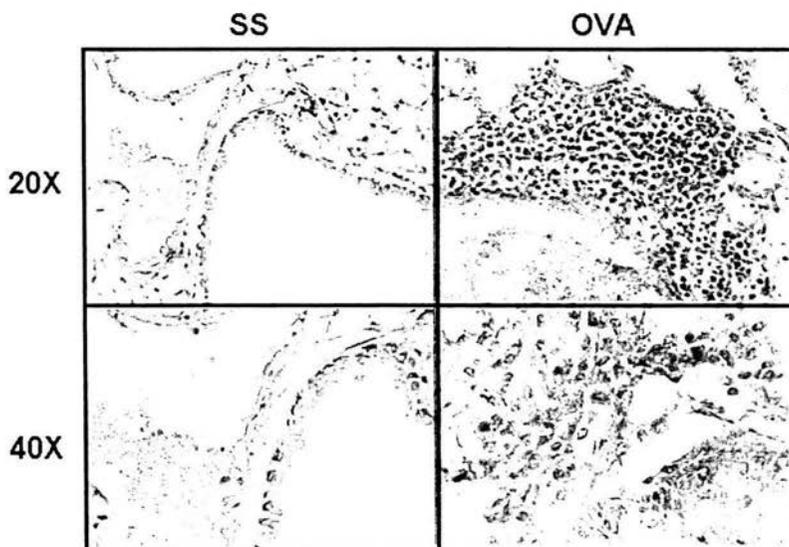
Figura 3

Análisis histológico



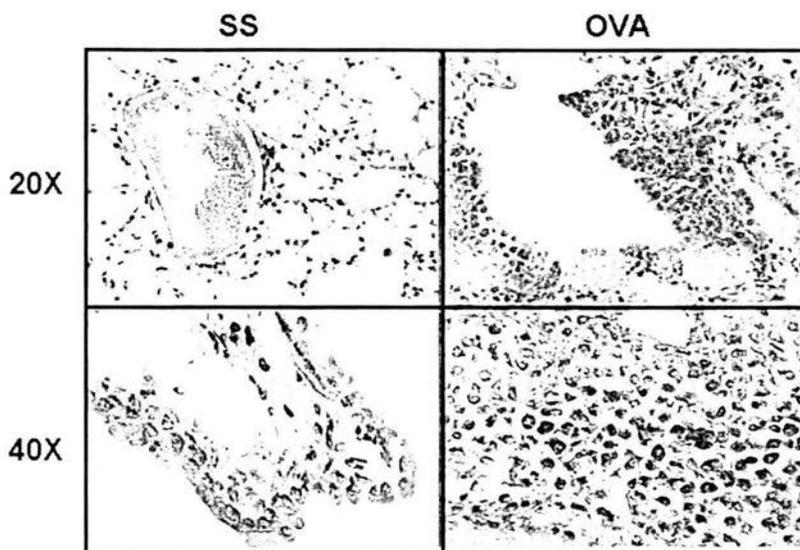
Imágenes representativas de los hallazgos histológicos a partir de pulmones de los ratones sensibilizados con los diferentes modelos mencionados en materiales y métodos. A, C y E. Secciones de tejido pulmonar teñidas con H/E y B, D y F con PAS para resaltar mucina. Ratones sensibilizados con E-1, microscopía de luz (40X) se observa un leve infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular (flechas) y en el áreas peribronquiales (cabeza de flechas). (B) en estos pulmones se observa escasa producción de moco (flecha). En comparación, los ratones sensibilizados con E-2, exhibieron moderado infiltrado perivascular y peribronquial (C); con abundante producción de moco (D). Los ratones sensibilizados con E-3, muestran una excesiva inflamación perivascular y peribronquial (E), y producción masiva de moco.

Figura 4
Expresión de IP-10 en tejido pulmonar



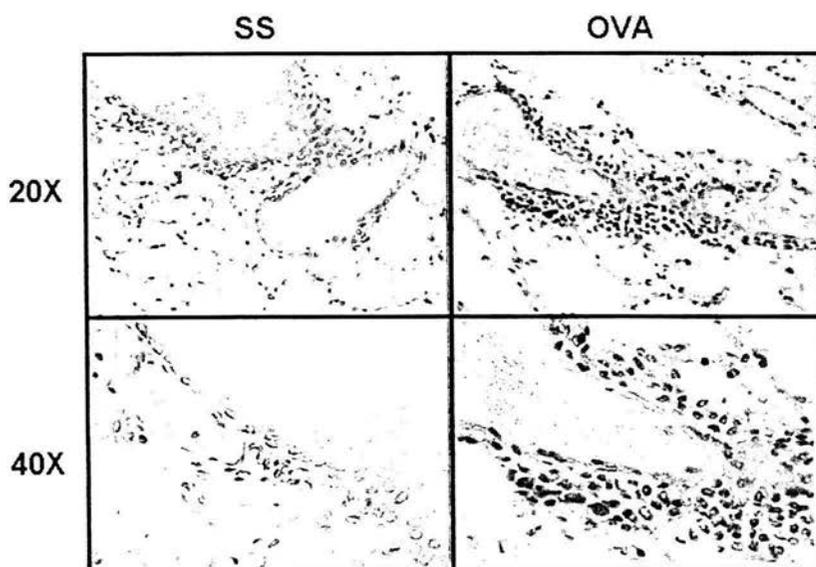
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de IP-10 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti IP-10 de ratón hecho en conejo (Peprotech) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 3:46 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X).

Figura 5
Expresión de IL-8 en tejido pulmonar



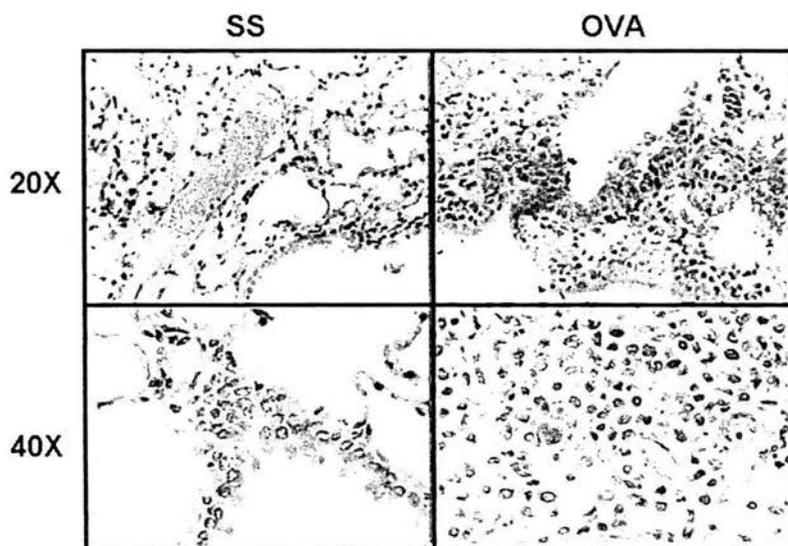
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de IL-8 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti IL-8 de humano hecho en conejo (Peprotech) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 2:30 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X).

Figura 6
Expresión de MCP-1 en tejido pulmonar



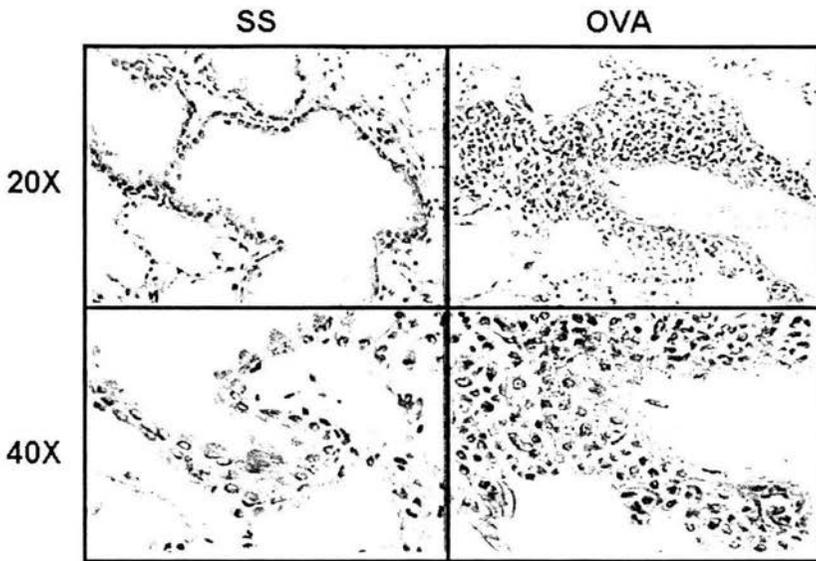
Hallazgos inmunohistoquímicos para la identificación de MCP-1 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti MCP-1 de ratón hecho en conejo (Peprotech) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 1:40 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X).

Figura 7
Expresión de MIG en tejido pulmonar



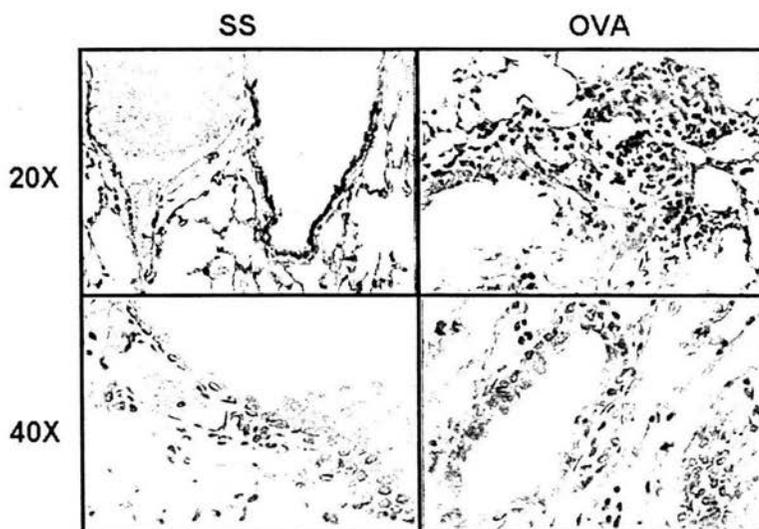
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de MIG en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti MIG de humano hecho en conejo (Peprotech) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 1:40 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X).

Figura 8 Expresión de Eotaxina-2 en tejido pulmonar



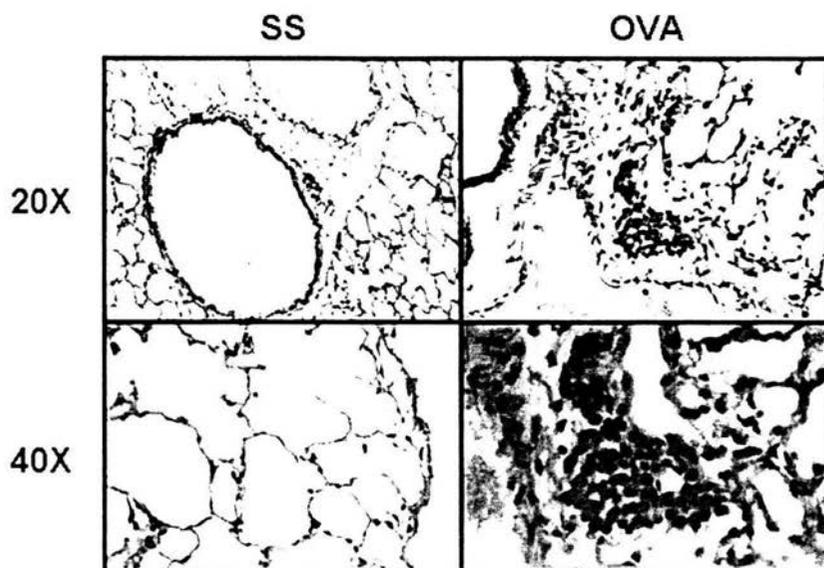
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de eotaxina-2 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti eotaxina-2 de ratón hecho en cabra (Peprotech) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 2 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X) con positividad en algunos linfocitos y en histiocitos de infiltrados inflamatorios perivasculariales para los ratones que fueron tratados con OVA.

Figura 9
Expresión de SDF-1 en tejido pulmonar



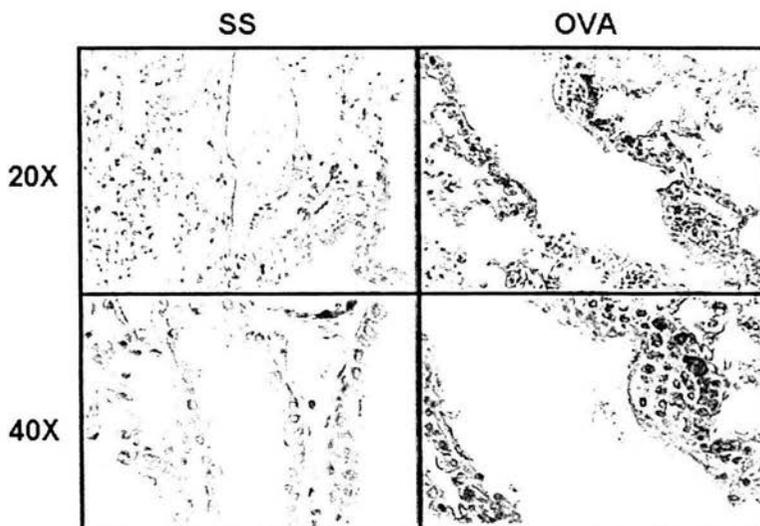
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de SDF-1 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti SDF-1 de ratón hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 3:46 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X).

Figura 10
Expresión de IL-4 en tejido pulmonar



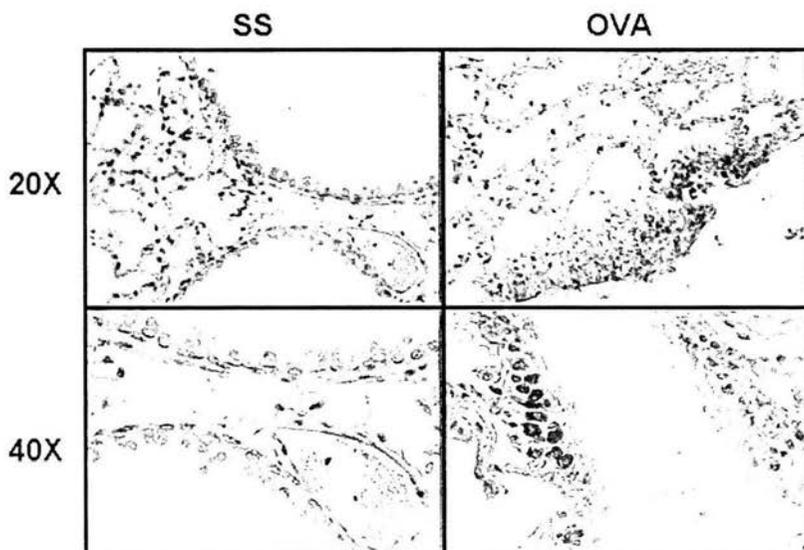
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de IL-4 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo monoclonal anti IL-4 humano hecho de ratón (R&D system) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 1 minuto, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X).

Figura 11
Expresión de IL-5 en tejido pulmonar



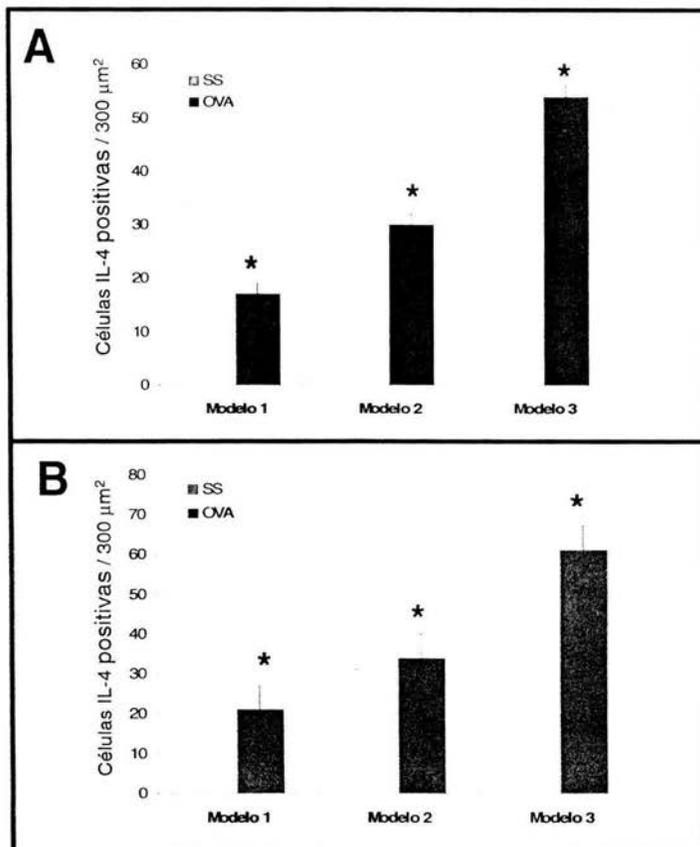
Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de IL-5 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti IL-5 de ratón hecho en cabra (R&D system) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 3:46 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X) con positividad en linfocitos e histiocitos de infiltrados inflamatorios perivasculariales para los ratones que fueron tratados con OVA.

Figura 12
Expresión de IL-13 en tejido pulmonar



Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos para la identificación de IL-13 en tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar sensibilizados por M-3. Como primer anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti IL-13 de ratón hecha en cabra (R&D system) a una dilución de 1:250 y se reveló con DAB 1:40 minutos, esto tanto para el control (SS) como para el problema (OVA). Posteriormente los tejidos se analizaron en microscopía de luz (20X y 40X)

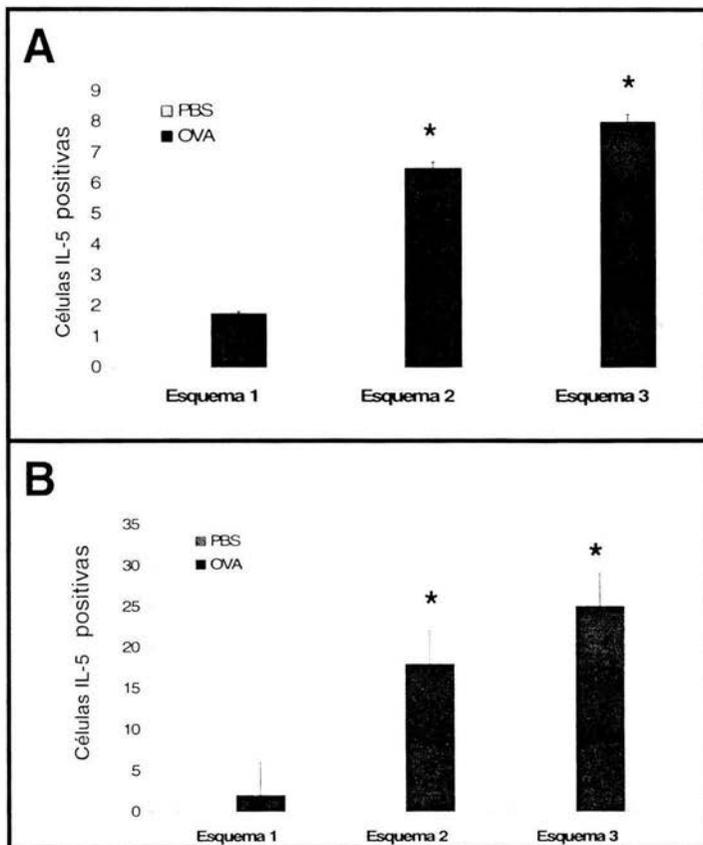
Figura 13
Cuantificación de la expresión de células IL-4 positiva



Evaluación cuantitativa de las células positivas para IL-4. Se realizó el análisis morfométrico del infiltrado perivascular (A), peribronquial (B) en ratones que fueron tratados con SS o con OVA, utilizando los diferentes modelos de sensibilización mencionados en materiales y métodos. Cortes seriados de tejido pulmonar de 4 ratones por cada grupo fueron sometido a inmunohistoquímica para IL-4 y contrateñidos con hematoxilina y se observaron utilizando microscopia de luz (40X de magnificación) en un analizador de imágenes como se describe en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio de cada grupo \pm DS.

* $p < 0.05$ comparado con el grupo control

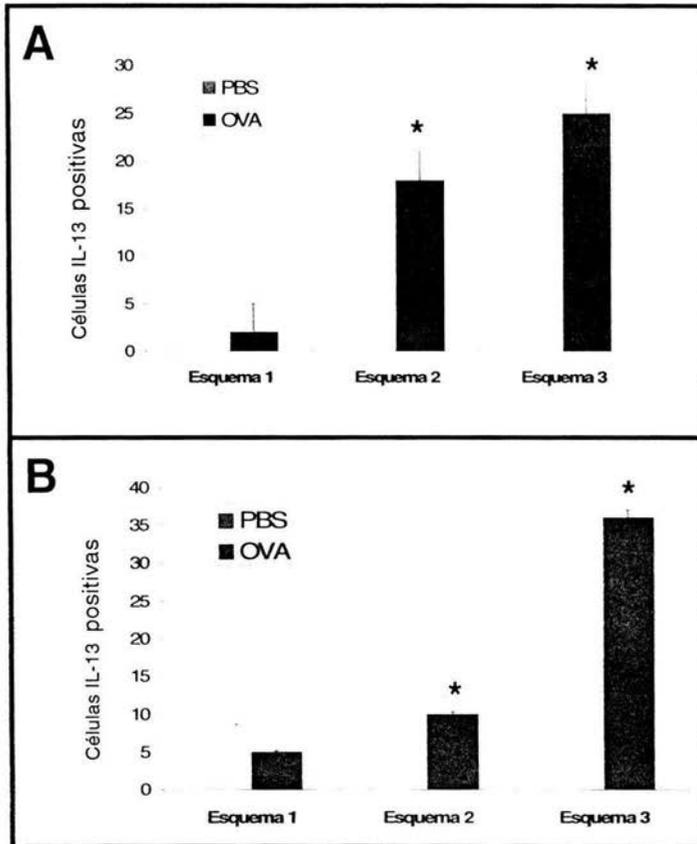
Figura 14
Cuantificación de la expresión de células IL-5 positiva



Evaluación cuantitativa de las células positivas para IL-5. Se realizó el análisis morfológico del infiltrado perivascular (A), peribronquial (B) en ratones que fueron tratados con SS o con OVA, utilizando los diferentes modelos de sensibilización mencionados en materiales y métodos. Cortes seriados de tejido pulmonar de 4 ratones por cada grupo fueron sometido a inmunohistoquímica para IL-5 y contrateñidos con hematoxilina y se observaron utilizando microscopía de luz (40X de magnificación) en un analizador de imágenes como se describe en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio de cada grupo \pm DS.

* $p < 0.05$ comparado con el grupo control

Figura 15
Cuantificación de la expresión de células IL-13 positiva



Evaluación cuantitativa de las células positivas para IL-13. Se realizó el análisis morfométrico del infiltrado perivascular (A), peribronquial (B) en ratones que fueron tratados con SS o con OVA, utilizando los diferentes modelos de sensibilización mencionados en materiales y métodos. Cortes seriados de tejido pulmonar de 4 ratones por cada grupo fueron sometido a inmunohistoquímica para IL-13 y contrateñidos con hematoxilina y se observaron utilizando microscopía de luz (40X de magnificación) en un analizador de imágenes como se describe en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio de cada grupo \pm DS.

* $p < 0.05$ comparado con el grupo control

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El asma es una enfermedad caracterizada por extensos infiltrados de eosinófilos en el tejido pulmonar, niveles elevados de IgE sérica y producción excesiva de moco en vías respiratorias. Las citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) son necesarias para la inducción de esta enfermedad. Los linfocitos CD4+ Th2 y las citocinas que ellos producen aumentan en modelos experimentales y en pacientes con asma alérgica (51-53).

En los últimos años la información acerca de la inmunopatogénesis del asma a partir de modelos experimentales ha sido basta. Existen diferentes modelos animales donde se utiliza OVA como alérgeno más común, y hay variaciones en los procesos de sensibilización, la vía de administración y el uso de adyuvantes. En estos modelos hay infiltrados de eosinófilos e hiperproducción de moco en bronquios de vías aéreas el incremento de IgE sérica. Sin embargo, no existe un modelo en donde se puedan comparar los diferentes grados de severidad de esta enfermedad.

En este trabajo evaluaron 3 modelos experimentales de inflamación alérgica pulmonar con diferentes grados de severidad usando OVA como alérgeno. Uno de estos modelos ya había sido descrito (54) (55) (56) y las otras dos variantes experimentales fueron estandarizadas en nuestro laboratorio. Nosotros observamos que el uso de alum (AL) como adyuvante durante las sensibilizaciones por vías i.p. y la administración de OVA por inyección i.t. producen una respuesta alérgica intensa. De hecho, los ratones inmunizados con OVA-AL por vía i.p. y retados en dos ocasiones con OVA i.t. (M-3), muestra tres incrementos en el infiltrado eosinófilos en el tejido pulmonar, en comparación con los ratones con la inmunización i.p. con OVA-AL y el reto con inmunización i.t. con el mismo antígeno (M-2). El M-3 muestra el conteo más alto de eosinófilos en LBA (fig. 2B). Estos resultados son los esperados ya que la IL-5 es importante para la diferenciación, activación y proliferación de este subtipo celular (57).

Los diferentes modelos de inflamación alérgica pulmonar en conjunto, reflejaron niveles de severidad diferentes, en M-1, los ratones presentaron las características histológicas y fisiopatológicas de una inflamación pulmonar ligera, en M-2, los ratones presentan una inflamación moderada y los que recibieron el alérgeno mediante en M-3, presentaron una inflamación pulmonar severa (Fig. 1, Fig. 2A y Fig. 3)

La expresión de algunas quimiocinas e interleucinas importantes en el proceso de inflamación alérgica pulmonar fue evaluado mediante inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que la expresión de IP-10, IL-8 y SDF-1 (figuras 4, 5 y 9) fue mas abundante sobre todo en células del infiltrado perivascular y peribronquial, que en el caso de MIG y eotaxina-2 (figuras 7 y 8), las cuales presentaron una expresión un poco mas discreta. Mientras que en el caso de MCP-1 (fig. 6) las células positivas fueron mucho menores pero la tinción de estas fue muy intensa, lo cual indica que una población reducida de células expresan esta quimiocina, pero esta pequeña población la expresa en grandes cantidades. En el caso de SDF-1 (Fig. 9) observamos una muy intensa expresión en el epitelio bronquial de pulmones de ratones tratados con OVA, lo cual es consistente con lo ya reportado (58). También observamos una muy importante expresión en linfocitos e histiocitos de infiltrado inflamatorio principalmente perivascular.

Debe mencionarse de manera particular el resultado observado en epitelio bronquial, ya que IL-8 es positiva en los bronquios del tejido pulmonar de ratones tratados con SS y con OVA como puede observarse en la figura 5, lo cual indica que esta quimiocina se encuentra presente en condiciones normales y patológicas (inflamación pulmonar). De igual manera sucede con eotaxina-2 (Fig. 8), en la cual se observa una expresión basal en los grupos control. Esto puede deberse al proceso de administración (invasivo) el cual se lleva a cabo también en los grupos control que recibieron SS, de la misma manera que los grupos problema recibieron OVA.

En el caso de IL-4, IL-5 e IL-13 se mostró que su expresión es muy abundante sobre todo en los linfocitos que se encuentran en los infiltrados inflamatorios. La expresión aumentada de estas interleucinas es consistente con nuestros resultados preliminares en donde cuantificamos infiltrado de eosinófilos (fig. 2A), pues como se comentó en la introducción la IL-5 participa directamente en el reclutamiento de esta célula. Lo mismo sucede con la sobre-expresión de IL-13 correlaciona con nuestros resultados preliminares en donde cuantificamos la producción de moco en tejido pulmonar (fig. 2B), pues como también comentamos la IL-13 participa directamente en la estimulación de las células caliciformes las cuales son productoras de moco. Por otro lado el aumento de la expresión de IL-4 correlaciona con nuestros resultados preliminares de la evaluación de los diferentes modelos, ya que la medición de IgE sérica específica para OVA mostró un aumento significativo en los tres modelos evaluado comparados con los controles (dato no presentado), como ya se mencionó la IL-4 dirige el cambio de isótopo de inmunoglobulinas hacia IgE.

La evaluación cuantitativa de la expresión de las quimiocinas mediante el análisis morfométrico de las tinciones de inmunohistoquímica, demostró que la IL-4 se encuentra presente con elevada similitud en infiltrados perivasculares y peribronquiales (Fig. 13 A y B), esta expresión fue directamente proporcional al grado de severidad de la inflamación pulmonar, lo cual sugiere que esta interleucina participa al inicio y durante la progresión de la enfermedad.

En cuanto a la expresión cuantitativa de IL-5, los resultados muestran una expresión menor de esta interleucina en infiltrados perivasculares (fig. 14A), y una expresión mayor en los infiltrados peribronquiales (fig. 14B). Lo cual sugiere que su efecto principal es a nivel peribronquial, en donde posiblemente se degranulen los eosinófilos (células activadas por IL-5), por lo que ocasionan espasmo bronquial. También se observa un aumento gradual que correlaciona directamente con los diferentes grados de severidad. Lo cual sugiere que esta interleucina participa al inicio y durante la progresión de la enfermedad.

En el caso de IL-13, el análisis de la expresión cuantitativa mostró mayor expresión en células presentes en infiltrado peribronquial, lo cual es esperado ya que como se comentó en la introducción la IL-13 se involucra en la activación de células productoras de moco que forman parte del epitelio bronquial, induciendo una sobreproducción de moco y una disminución del paso de aire, característico en el asma alérgica. La expresión de esta interleucina al igual que IL-4 e IL-15, correlaciona con el grado de severidad indicando su participación al inicio y durante la progresión de la enfermedad.

11. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró reproducir con éxito los tres modelos para inducir diferente grado de inflamación pulmonar, uno de ellos descrito con anterioridad (M-1) y dos reportados por nuestro grupo de trabajo (M-2 y M-3), los cuales muestran en diferentes magnitudes, inflamación pulmonar y sobreproducción de moco, dos parámetros característicos del asma alérgica.

Por otro lado se logró la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica para las quimiocinas IP-10, IL-8, Eotaxina-2, MCP-1, MIG y SDF-1, y para las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13. Lo cual es de suma importancia ya que con las condiciones óptimas para la realización de esta técnica, podremos hacer estudios más específicos de la expresión de la quimiocinas e interleucinas ya mencionadas, en los diferentes modelos de severidad de inflamación alérgica pulmonar descritos.

Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica fueron consistentes con los resultados en las pruebas de evaluación de la inflamación alérgica experimental (aumento del infiltrado inflamatorio, producción de moco, y eosinofilia).

Nuestros resultados del análisis de la expresión de las quimiocinas ya mencionadas por inmunohistoquímica, mostraron que en el modelo de inflamación pulmonar más severo (M-3), la expresión de IP-10, IL-8 y SDF-1 fue mayor en comparación con la expresión de MIG y eotaxina-2, en donde la expresión fue moderada y con MCP-1 en donde la expresión fue leve. Lo cual sugiere que la expresión de cada una de las quimiocinas evaluadas en este modelo se expresa en diferente magnitud. Este hecho resalta la importancia de papel que juegan dichas quimiocinas en los diferentes tiempos del desarrollo de la inflamación alérgica pulmonar.

En el caso de las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 la expresión evaluada por inmunohistoquímica y mediante análisis morfométrico, mostró que existe una

correlación directa entre su expresión y el grado de severidad de la inflamación alérgica pulmonar.

Lo resultados generados en este trabajo son de suma importancia, ya que utilizando los diferentes modelos, pueden realizarse estudio de fisiopatológicos, con la finalidad de buscar y realizar pruebas para nuevos y mejores agentes terapéuticos en el tratamiento de pacientes que sufren de esta enfermedad.

12. PERSPECTIVAS.

- Realizar el análisis morfométrico de las quimiocinas IP-10, IL-8, SDF-1, MIG, MCP1 y eotaxina-2, para establecer las diferencias cuantitativas de la expresión durante el desarrollo de la enfermedad alérgica pulmonar.

13. REFERENCIAS

- (1) Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Rep. No 97-4051 ed. Washintong, DC: U.S. Dep. Health Hum. Serv., Ntl. Heart Lung Blood Ins., 1997.
- (2) Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(6):2341-2351.
- (3) Palmer LJ, Cookson WO. Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res* 2000; 10(9):1280-1287.
- (4) Vargas MH, Diaz-Mejia GS, Furuya ME, Salas J, Lugo A. Trends of asthma in Mexico: an 11-year analysis in a nationwide institution. *Chest* 2004; 125(6):1993-1997.
- (5) Bascom R. Environmental factors and respiratory hypersensitivity: the Americas. *Toxicol Lett* 1996; 86(2-3):115-130.
- (6) Cavazos-Galván M, Contreras-Castillo J, Martínez-LLano E, Soni_Duque E. Estudio Económico sobre Asma en México. *Rev Alergia Mexico* 2000; 67(3):96-99.
- (7) Los H, Koppelman GH, Postma DS. The importance of genetic influences in asthma. *Eur Respir J* 1999; 14(5):1210-1227.
- (8) Peat JK, Britton WJ, Salome CM, Woolcock AJ. Bronchial hyperresponsiveness in two populations of Australian schoolchildren. III. Effect of exposure to environmental allergens. *Clin Allergy* 1987; 17(4):291-300.
- (9) Zimmerman B, Feanny S, Reisman J, Hak H, Rashed N, McLaughlin FJ et al. Allergy in asthma. I. The dose relationship of allergy to severity of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81(1):63-70.
- (10) Giles GG, Lickiss N, Gibson HB, Shaw K. Respiratory symptoms in Tasmanian adolescents: a follow up of the 1961 birth cohort. *Aust N Z J Med* 1984; 14(5):631-637.
- (11) Peat JK, Britton WJ, Salome CM, Woolcock AJ. Bronchial hyperresponsiveness in two populations of Australian schoolchildren. II. Relative importance of associated factors. *Clin Allergy* 1987; 17(4):283-290.
- (12) Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Factors associated with bronchial hyperresponsiveness in Australian adults and children. *Eur Respir J* 1992; 5(8):921-929.

- (13) Romieu I, Meneses F, Ruiz S, Huerta J, Sierra JJ, White M et al. Effects of intermittent ozone exposure on peak expiratory flow and respiratory symptoms among asthmatic children in Mexico City. *Arch Environ Health* 1997; 52(5):368-376.
- (14) Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103(2):175-183.
- (15) Castro M, Chaplin DD, Walter MJ, Holtzman MJ. Could asthma be worsened by stimulating the T-helper type 1 immune response? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22(2):143-146.
- (16) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7):2348-2357.
- (17) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603):787-793.
- (18) Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260(5107):547-549.
- (19) Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994; 265(5179):1701-1706.
- (20) Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326(5):298-304.
- (21) Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(5):1497-1504.
- (22) Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH et al. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(2 Pt 1):215-222.
- (23) Holt PG. Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S151-S156.
- (24) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344(5):350-362.

- (25) Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol* 1998; 10(10):1421-1433.
- (26) Shi HZ, Deng JM, Xu H, Nong ZX, Xiao CQ, Liu ZM et al. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(6 Pt 1):1818-1821.
- (27) Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103(6):779-788.
- (28) Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G et al. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(6 Pt 1):1407-1413.
- (29) Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M et al. Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13(1):54-59.
- (30) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282(5397):2258-2261.
- (31) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5):1720-1745.
- (32) Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1592-1600.
- (33) Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999; 65(1):6-15.
- (34) Stellato C, Collins P, Ponath PD, Soler D, Newman W, La Rosa G et al. Production of the novel C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines. *J Clin Invest* 1997; 99(5):926-936.
- (35) Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(5):1377-1383.
- (36) Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway

hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol* 1997; 158(9):4398-4404.

- (37) Stafford S, Li H, Forsythe PA, Ryan M, Bravo R, Alam R. Monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3)/fibroblast-induced cytokine (FIC) in eosinophilic inflammation of the airways and the inhibitory effects of an anti-MCP-3/FIC antibody. *J Immunol* 1997; 158(10):4953-4960.
- (38) Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Rossi AG, Jose PJ, Williams TJ. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197(3):1167-1172.
- (39) Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol* 1997; 158(9):4129-4136.
- (40) Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Fujimoto M, Lindley I, Furusho K. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells. *J Exp Med* 1996; 183(5):2397-2402.
- (41) Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:675-705.
- (42) Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997; 277(5334):2005-2007.
- (43) Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187(6):875-883.
- (44) D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A et al. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 1998; 161(10):5111-5115.
- (45) Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* 1999; 104(9):1199-1211.
- (46) Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10(8):858-864.

- (47) Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107(9):1322-1328.
- (48) Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002; 46(10):2587-2597.
- (49) Hoshino M, Aoike N, Takahashi M, Nakamura Y, Nakagawa T. Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma. *Eur Respir J* 2003; 21(5):804-809.
- (50) Yopez SH, Pando RH, Argumedeo LS, Paredes MV, Cueto AH, Isibasi A et al. Therapeutic efficacy of an E coli strain carrying an ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OMPC in a murine model of allergic airway inflammation. *Vaccine* 2003; 21(5-6):566-578.
- (51) Kim TS, DeKruyff RH, Rupper R, Maecker HT, Levy S, Umetsu DT. An ovalbumin-IL-12 fusion protein is more effective than ovalbumin plus free recombinant IL-12 in inducing a T helper cell type 1-dominated immune response and inhibiting antigen-specific IgE production. *J Immunol* 1997; 158(9):4137-4144.
- (52) Hofstra CL, Van A, I, Hofman G, Kool M, Nijkamp FP, Van Oosterhout AJ. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J Immunol* 1998; 161(9):5054-5060.
- (53) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275(5296):77-79.
- (54) Maecker HT, Hansen G, Walter DM, DeKruyff RH, Levy S, Umetsu DT. Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA protects against, and reverses established, airway hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol* 2001; 166(2):959-965.
- (55) Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irvin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89(6):1127-1138.
- (56) Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P et al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 1999; 11(4):473-482.

- (57) Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160(6):2555-2559.
- (58) Scimone ML, Felbinger TW, Mazo IB, Stein JV, Von Andrian UH, Wengler W. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 2004; 199(8):1113-1120.
- (59) Roitt I. *Inmunología Fundamentos*. 9a. edición. Editorial Médica Panamericana. (capítulo 16). España 2000.
- (60) Margni R. *Inmunología e Inmunología Fundamentos*. 5a. edición. Editorial Médica Panamericana. (capítulo 32). Argentina 1996.