



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

*FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES*

**Detección de quimiocinas y su relación con
el infiltrado celular en cobayos expuestos a
ovoalbúmina**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

Bióloga

P R E S E N T A:

Olivia Téllez Jiménez

TUTORA:

Biól. Patricia Ramos Ramírez





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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Téllez
Apellido materno	Jiménez
Nombre(s)	Olivia
Teléfono	56905852
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de Cuenta	303298108
2. Datos del Tutor (a)	2. Datos del Tutor (a)
Grado	Biól
Nombre (s)	Patricia
Apellido paterno	Ramos
Apellido materno	Ramírez
3. Datos del Sinodal 1	3. Datos del Sinodal 1
Grado	Dra
Nombre (s)	María de Lourdes
Apellido paterno	Segura
Apellido materno	Valdez
4. Datos del Sinodal 2	4. Datos del Sinodal 2
Grado	Dra
Nombre (s)	Blanca Margarita
Apellido paterno	Bazán
Apellido materno	Perkins
5. Datos del Sinodal 3	5. Datos del Sinodal 3
Grado	Dr
Nombre (s)	Eduardo Alberto
Apellido paterno	García
Apellido materno	Zepeda
6. Datos del Sinodal 4	6. Datos del Sinodal 4
Grado	M en C
Nombre (s)	Georgina
Apellido paterno	Nieto
Apellido materno	Castañeda
7. Datos del trabajo escrito	7. Datos del trabajo escrito
Título	Detección de quimiocinas y su relación con el infiltrado celular en cobayos expuestos a ovoalbúmina
Subtitulo	
Número de páginas	61
Año	2012

Jurado asignado

Presidente: Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Vocal: Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

Secretario: Biól. Patricia Ramos Ramírez

Primer suplente: Dr. Eduardo Alberto García Zepeda

Segundo suplente: M. en C. Georgina Nieto Castañeda

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Hiperreactividad Bronquial
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
"Ismael Cosío Villegas"

Asesora

Biól. Patricia Ramos Ramírez

Sustentante

Olivia Téllez Jiménez



**Este trabajo se realizó en el Departamento de hiperreactividad bronquial del
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“Ismael Cosío Villegas”, de la Secretaría de Salud bajo la asesoría de la Biól.
Patricia Ramos Ramírez y de la Dra. Blanca M. Bazán Perkins, y con el apoyo
de Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de
Alta Especialidad mediante el programa de becas de inicio a la investigación
(PROBEI)**

Agradecimientos personales

- ❖ Gracias a la vida por todas las bendiciones, la fuerza y el conocimiento.

- ❖ Agradezco a mis padres y hermanos por ser parte de una hermosa familia llena de amor y comprensión. Gracias por su confianza y apoyo incondicional.

- ❖ Gracias a mi maestra y tutora Patricia Ramos Ramírez por la gran paciencia para culminar este proyecto, pero sobre todo por brindarme su grande y valiosa amistad.

- ❖ Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas, formarme como profesionista y por permitirme ser parte de la Facultad de Ciencias y enseñarme el amor al estudio de la vida.

- ❖ Finalmente agradezco a mis amig@s por su comprensión, su cariño, su apoyo en esta etapa de mi vida y por confiar en mí.

Agradecimientos para la realización del presente trabajo

- ❖ A la Bióloga Patricia Ramos Ramírez por su tiempo y asesoría en todos los experimentos del proyecto.

- ❖ Al laboratorio de Autoinmunidad del INER por el espacio para la realización de los experimentos.

- ❖ Al laboratorista Eduardo Flores por su apoyo técnico.

- ❖ A la Dra. Blanca Bazán por incluirme en su equipo de trabajo y al laboratorio de Hiperreactividad Bronquial del INER por el apoyo en el desarrollo del proyecto.

- ❖ Al Dr. Eduardo García Zepeda por su gran apoyo académico y al CBRL del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por facilitar el uso de algunos reactivos y la toma de las microfotografías.

- ❖ Al maestro Alejandro Martínez y al laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias por el préstamo del equipo fotográfico.

Abreviaturas	Significado
APC	Célula presentadora de antígeno
CCL	Ligando de quimiocina de la familia CC
CCR	Receptor de quimiocina de la familia CC
CXCL	Ligando de quimiocina de la familia CXC
CXCR	Receptor de quimiocina de la familia CXC
DP ₂₀₀	Dosis provocativa 200
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
FcεRI	Receptor de alta afinidad de inmunoglobulina E
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
íB	Índice de bronco-obstrucción
IgE	Inmunoglobulina E
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
LBA	Lavado bronquioalveolar
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de tipo II
OVA	Ovoalbúmina
SSF	Solución salina fisiológica
TCR	Receptor de célula T
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VA	Vías aéreas

RESUMEN

La inflamación es un proceso que ocurre para restaurar la estructura y función del tejido dañado e involucra el reclutamiento y activación de células inflamatorias. La inflamación en las vías aéreas (VA) puede llegar a ser una respuesta exacerbada y desencadenar enfermedades como el asma. En el asma la inflamación crónica está asociada con la hiperreactividad de las VA que conduce a episodios recurrentes de bronco-obstrucción caracterizados por síntomas respiratorios. En estudios previos en un modelo de cobayos sensibilizados y retados con ovoalbúmina (OVA), un grupo de cobayos siempre presentó respuesta bronco-obstruccionista después del reto (modelo de asma) y otro grupo no mostró dicha respuesta (cobayos no respondedores, NR). Los cobayos del modelo de asma se caracterizaron por presentar un aumento en el número de células inflamatorias infiltradas en el lavado bronquioalveolar (LBA), específicamente eosinófilos, neutrófilos y linfocitos después de ser retados con OVA, mientras que en el grupo de cobayos NR estas células inflamatorias no se incrementaron. El reclutamiento, la acumulación y la activación de las células inflamatorias en las VA dependen de mediadores como las quimiocinas. Es posible que los niveles de quimiocinas se encuentren disminuidos en el grupo de cobayos NR. El objetivo de este estudio fue medir los niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 y correlacionarlas con el número de células inflamatorias infiltradas en el LBA 24 horas después del tercer reto con OVA. Adicionalmente, se identificaron las posibles fuentes celulares de estas quimiocinas por medio de análisis inmunohistoquímico de secciones de pulmón. Para este estudio, cobayos machos de la cepa HsdPoc:DH que fueron sensibilizados y retados con OVA y la hiperreactividad a la histamina fue evaluada durante el tercer reto antigénico. El grupo del modelo de asma y el grupo de cobayos NR desarrollaron hiperreactividad a la histamina. El número de células inflamatorias totales aumentó significativamente en el grupo de cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo de cobayos NR y el grupo control. El número de eosinófilos se incrementó en el LBA del grupo de cobayos del modelo de asma, mientras que el número de neutrófilos se incrementó en el LBA del grupo de cobayos NR. Los niveles de las quimiocinas CCL3 y CCL5 se incrementaron de manera significativa en el grupo de cobayos del modelo de asma. En las secciones de pulmón CCL3 se observó en las células estructurales y en el infiltrado celular, mientras que CCL5 solo en el infiltrado celular peribronquial. Los niveles de CCL3 en el pulmón se relacionaron de manera positiva con el número de linfocitos en el LBA, mientras que los niveles de CCL5 en el pulmón se correlacionaron positivamente con el número de eosinófilos en el LBA. Los niveles de CCL11 se incrementaron en el

LBA y en homogenado pulmonar del grupo del modelo de asma y en el homogenado pulmonar del grupo de cobayos NR. CCL11 se observó en las células epiteliales del grupo de cobayos del modelo de asma y de manera escasa en el grupo de cobayos NR y el grupo control. Esta quimiocina no se relacionó con la cantidad de células inflamatorias infiltradas en el LBA. Finalmente los niveles de CXCL8 se incrementaron en el grupo de cobayos del modelo de asma y se observó en las células estructurales de los cobayos del modelo de asma y del grupo de cobayos NR. CXCL8 no se asoció con la cantidad de células inflamatorias infiltradas en el LBA. Nuestros datos sugieren que la disminución de las células inflamatorias en el LBA del grupo de cobayos NR probablemente se debe a los bajos niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5 y CXCL8. La ausencia de estas células inflamatorias que liberan mediadores proinflamatorios podría contribuir con la falta de respuesta bronco-obstructiva en el grupo de cobayos NR.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	7
Resumen.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Vías aéreas.....	12
1.2 Asma.....	13
1.2.1 Clasificación de asma.....	14
1.3 Hiperreactividad.....	15
1.4 Bronco-obstrucción.....	16
1.5 Inflamación de las vías aéreas.....	17
1.5.1 Inflamación aguda.....	18
1.5.2 Inflamación crónica.....	19
1.6 Quimiocinas inflamación y tráfico leucocitario.....	19
1.6.1 Quimiocinas estructura y clasificación.....	20
1.6.2 Quimiocinas y su papel en el asma alérgica.....	22
1.6.3 CCL3 características estructurales y funcionales.....	23
1.6.4 CCL5 características estructurales y funcionales.....	24
1.6.5 CCL11 características estructurales y funcionales.....	24
1.6.6 CXCL8 características estructurales y funcionales.....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1 Animales.....	29
6.2 Sensibilización antigénica.....	29

6.3	Pletismografía barométrica.....	30
6.4	Retos antigénicos.....	32
6.5	Reactividad de las vías aéreas.....	32
6.6	Conteo total y diferencial de células infiltradas en el lavado bronquioalveolar.....	32
6.7	Detección de quimiocinas por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	33
6.8	Detección de las quimiocinas por inmunohistoquímica.....	34
6.10	Análisis estadístico.....	34
7.	RESULTADOS	36
7.1	Obstrucción de las vías aéreas inducida por ovoalbúmina en cobayos sensibilizados.....	37
7.2	Reactividad de las vías aéreas.....	37
7.3	Conteo celular total y diferencial en lavado bronquioalveolar.....	38
7.4	Cuantificación de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 en LBA y en sobrenadante de homogenado pulmonar mediante ELISA.....	39
7.5	Identificación de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 mediante inmunohistoquímica.....	43
7.6	Relación entre los niveles de quimiocinas y el número de células inflamatorias de LBA	45
8.	DISCUSIÓN	47
9.	CONCLUSIONES	54
10.	REFERENCIAS	55

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vías aéreas

El aparato respiratorio de mamíferos se divide en una parte conductora, una parte respiratoria y un mecanismo de ventilación (Geneser F., 2000). La parte conductora, conocida como vías aéreas (VA), consiste en una serie de tubos ramificados que se vuelven más estrechos, más cortos y más numerosos a medida que penetran dentro del pulmón (West J., 2005). Las VA superiores están formadas por las fosas nasales, la cavidad oral y la faringe, mientras que las VA inferiores son la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos (Geneser F., 2000; West J., 2005).

La pared de las VA consiste en una capa mucosa, una capa de músculo liso y una capa fibrosa (Ochs M., 2008). La capa mucosa incluye al epitelio, la membrana basal y la lámina propia. La capa de músculo liso disminuye conforme las VA disminuyen su calibre y desaparece en la parte respiratoria, los alvéolos. La capa fibrosa está conformada por cartílago y se encuentra solo en la tráquea y los bronquios (Ochs M., 2008; Jaramillo F., 2000) (Fig.1).

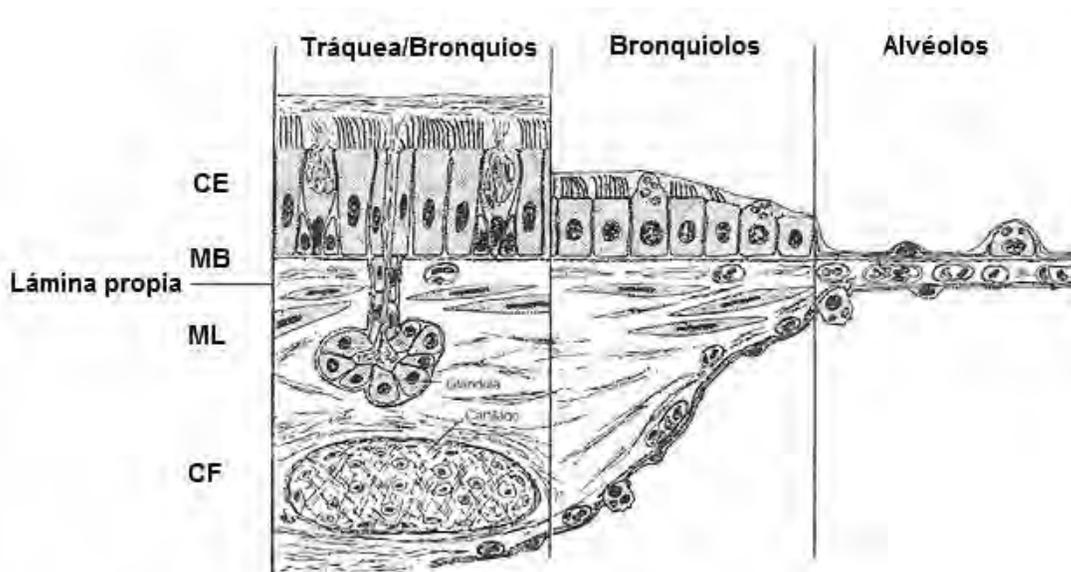


Figura 1. Estructura de la pared de las vías aéreas. Capa epitelial (CE), membrana basal (MB), capa de músculo liso (ML) y capa fibrosa (CF).

Las VA tienen la función de conducir el aire hacia los alvéolos (West J., 2005). Adicionalmente, en las VA el aire inspirado se entibia, se humedece y se eliminan los vapores hidrosolubles, el polvo y las bacterias ya que son captados por la membrana mucosa (Geneser F., 2000). Los desórdenes funcionales y estructurales en las VA se han asociado a diversas enfermedades, entre ellas se encuentra el asma.

1.2 Asma

El asma es una enfermedad compleja y heterogénea que se ha definido por sus características clínicas, fisiológicas y patológicas como una enfermedad inflamatoria crónica de las VA en la que participan diversas células y elementos celulares (GINA 2009, Shin S., 2009; Kim Y., 2010). La inflamación crónica está asociada con el aumento en la reactividad de las VA que se manifiesta mediante episodios recurrentes de síntomas respiratorios como sibilancias, disnea, opresión torácica y tos. Estos síntomas se asocian con la obstrucción generalizada, pero variable, al flujo de aire y frecuentemente es reversible de manera espontánea o con tratamiento (Ying S. 2006; GINA 2009).

Los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de asma pueden ser factores relacionados con el huésped y factores ambientales (GINA 2009; Kim Y., 2010). Entre los primeros se encuentran genes que predisponen al incremento en los niveles de inmunoglobulina E (IgE) específica para antígenos inocuos del medio ambiente, o alérgenos, fenómeno conocido como atopia (Des J.T., 1993; Bousquet J., 2000). Otros genes predisponen a la generación de mediadores inflamatorios que contribuyen a la disfunción de las VA. También se ha descrito que la obesidad y el sexo son factores de riesgo para desarrollar asma (GINA 2009). Entre los factores ambientales se encuentran aquellos que influyen en la expresión de los síntomas de la enfermedad, como la exposición a alérgenos, la contaminación ambiental, las infecciones virales, el humo del tabaco, los sensibilizadores ocupacionales, el ejercicio, la dieta y algunos fármacos como la aspirina (Ying S. 2006; GINA 2009).

El asma es un problema de salud pública que afecta aproximadamente a 300 millones de personas en el mundo y su prevalencia se ha incrementado en las últimas tres décadas en países occidentales (GINA 2009; Kim H., 2010). En México la prevalencia de asma varía del 5 al 12% (Vargas M., 2009a). El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) reportó que en el 2010 el asma fue la principal causa de atención en la consulta externa y ocupó el primer lugar entre las diez principales causas de atención en la unidad de urgencias respiratorias (Informe anual INER, 2010).

El asma representa una significativa carga económica para las personas que la padecen ya que genera elevados costos directos e indirectos. Los ingresos a hospitales y los costos en medicamentos son considerados costos directos, mientras que los costos indirectos incluyen el ausentismo laboral y escolar. Así mismo, la calidad de vida de los pacientes se ve afectada de manera importante ya que repercute sobre aspectos sociales y afectivos (GINA 2009). Debido a que el asma es una enfermedad con múltiples fenotipos se han propuesto diferentes esquemas para clasificarla lo que permite un mejor tratamiento clínico (King C. and Moores L., 2008; GINA 2009).

1.2.1 Clasificación de asma

Diversos criterios han sido establecidos para agrupar a los pacientes con asma. De acuerdo a la frecuencia de los síntomas, el asma se ha clasificado en episódica, persistente, estacional y nocturna o matutina. La clasificación según el control de la enfermedad divide al asma en controlada y no controlada, esta clasificación tiene como criterio la calidad de vida del paciente y la cantidad de medicamentos que se requieren para su control (Graham L., 2006; Salas H., 2009). El criterio según la severidad de la enfermedad combina la frecuencia de los síntomas, pruebas de función pulmonar y marcadores de inflamación, por lo que el asma se puede clasificar como intermitente y persistente, ésta a su vez, en persistente leve, moderada o severa (Graham L., 2006; GINA 2009). De acuerdo a su etiología, el

asma se ha clasificado en extrínseca o alérgica e intrínseca o no alérgica (Vargas M., 2005). El asma alérgica se origina por una reacción de hipersensibilidad tipo I (Des J.T., 1993) y los síntomas aparecen como consecuencia del contacto con alérgenos como el polen, los ácaros o los hongos, éstos conducen al sistema inmune a una reacción inflamatoria exacerbada. Por otro lado, en el asma no alérgica los síntomas no se asocian con la exposición a ningún alérgeno y los pacientes reaccionan ante un variado número de estímulos como el aire frío o seco, el exceso de humedad, el ejercicio físico o las emociones, y se ha sugerido que puede ser una forma de autoinmunidad o autoalergia debido a la activación anormal de linfocitos (Kim Y., 2010). El asma no alérgica es menos frecuente que la alérgica (Des J.T., 1993). Estas dos formas de asma son clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similares, por ejemplo, en ambos tipos de asma existe una elevada producción de linfocitos T cooperadores de la clase 2 (Th2), eosinófilos y mediadores proinflamatorios que en conjunto inducen el incremento en la reactividad de las VA (Humbert M., 1999; Vargas M., 2005).

1.3 Hiperreactividad de las vías aéreas

La hiperreactividad se refiere al estado en que las VA disminuyen excesivamente su calibre ante estímulos que en sujetos sanos causarían poco o ningún efecto debido al incremento en la sensibilidad del músculo liso por agonistas que provocan su contracción (Vargas M., 2005; GINA 2009). La hiperreactividad es una característica clínica importante del asma y generalmente es proporcional al grado de severidad de la enfermedad (O'Byrne P., 2003; Cockcroft D., 2006).

La hiperreactividad de las VA suele evaluarse mediante la administración de concentraciones crecientes de un agente bronco-constrictor, como histamina o metacolina, que provoca la contracción del músculo liso. Esta respuesta se evalúa por medio de la dosis provocativa 20 (PD₂₀, por sus siglas en inglés, *provocative dose*) que se refiere a la concentración del agente que induce la disminución del 20% en la función pulmonar y el parámetro que evalúa directamente la obstrucción del flujo de aire es el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁, por

sus siglas en inglés, *forced expiratory volume in the first second*) (O'Byrne P., 2003; West J., 2005; Vargas M., 2005, 2009b). En sujetos sanos se requieren concentraciones elevadas del agente para inducir la disminución del 20% del FEV₁, mientras que en sujetos con asma esta disminución se alcanza con concentraciones menores (O'Byrne P., 2003; GINA 2009; Busse W., 2010) (Fig. 2).

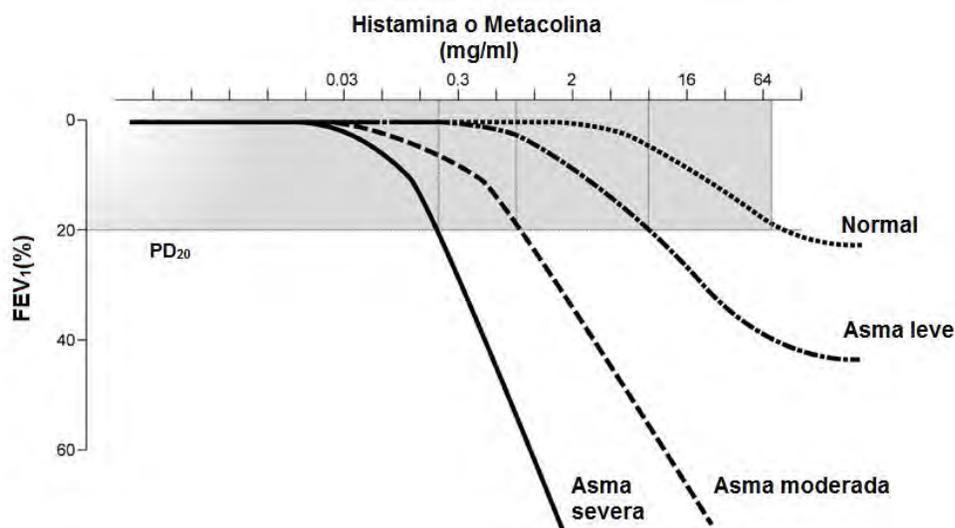


Figura 2. Curvas dosis-respuesta que muestran los cambios en el FEV₁ inducido por distintas dosis de histamina o metacolina en un sujeto sano y en pacientes con asma leve, moderada y severa. Se observa que la PD₂₀ es menor en sujetos con asma severa (GINA 2009).

Los factores que contribuyen a la hiperreactividad de las VA se han dividido en variables y persistentes (Busse W., 2010). Los factores variables se asocian con el proceso inflamatorio y pueden ser influenciados por eventos ambientales como la exposición a alérgenos e infecciones respiratorias. Los factores persistentes han sido atribuidos a cambios en la estructura de las VA como efecto del proceso de remodelación, este proceso incluye el engrosamiento de la capa subepitelial, la hipertrofia e hiperplasia del músculo liso y el depósito de proteínas de matriz extracelular en las VA (O'Byrne P., 2003; Cockcroft D., 2006; Busse W., 2010). Los cambios en la estructura de las VA y el proceso inflamatorio están involucrados directamente con el desarrollo de la obstrucción del flujo de aire (O'Byrne P., 2003).

1.4 Bronco-obstrucción

La obstrucción del flujo de aire es ocasionada por la disminución del calibre de las VA debido a la contracción del músculo liso, la formación de edema, la hipersecreción de moco y el engrosamiento de la pared traqueobronquial. Esta obstrucción suele ser episódica y da lugar a la crisis o exacerbación asmática (GINA 2009; Vargas M., 2009b). Sin embargo, en algunos pacientes, esta obstrucción se vuelve permanente como resultado del proceso alterado de reparación inducido por la inflamación crónica.

1.5 Inflamación de las vías aéreas

La inflamación es una respuesta fisiológica ante diversos estímulos e involucra el reclutamiento y activación de células encargadas de eliminar organismos infecciosos y restaurar la estructura y función del tejido dañado (Poerber J., 2007; Goldsby R., 2006). Sin embargo, la inflamación crónica en las VA tiene consecuencias patológicas y conduce al desarrollo de asma alérgica (GINA 2009). La inflamación alérgica en las VA inicia después de la exposición al alérgeno en un individuo previamente sensibilizado (Galli S., 2008).

El proceso de sensibilización ocurre cuando el alérgeno es captado en el lumen de las VA por células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés, *antigen-presenting cell*) particularmente células dendríticas y macrófagos. Las APC degradan al alérgeno y unen los péptidos al complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II, por sus siglas en inglés, *major histocompatibility complex*) (Galli S., 2008). Posteriormente las APC migran hacia los nódulos linfáticos locales e interactúan, a través del MHC-II, con el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés, *T Cell Receptor*) cooperadores inmaduros lo que conduce a su activación (Ying S., 2006; Goldsby R. 2006). Una vez activado, en presencia de interleucina (IL)-4, el linfocito T se diferencia hacia un linfocito Th2 que secreta IL-4 e IL-13. Los linfocitos Th2 activan al linfocito B y promueven la producción de IgE que se fija a su receptor FcεRI sobre la superficie

de células cebadas y basófilos dando lugar a la sensibilización antigénica (Vargas M., 2005; Ying S., 2006) (Fig. 3).

La inflamación alérgica se clasifica en tres fases temporales. La primera es la reacción de fase temprana o inmediata y ocurre pocos minutos después de la exposición al alérgeno. La segunda es la reacción de fase tardía y ocurre después de varias horas de la exposición al alérgeno. Finalmente, la inflamación alérgica crónica es persistente y ocurre como consecuencia de la exposición repetida al alérgeno (Bousquet J., 2000; Galli S., 2008).

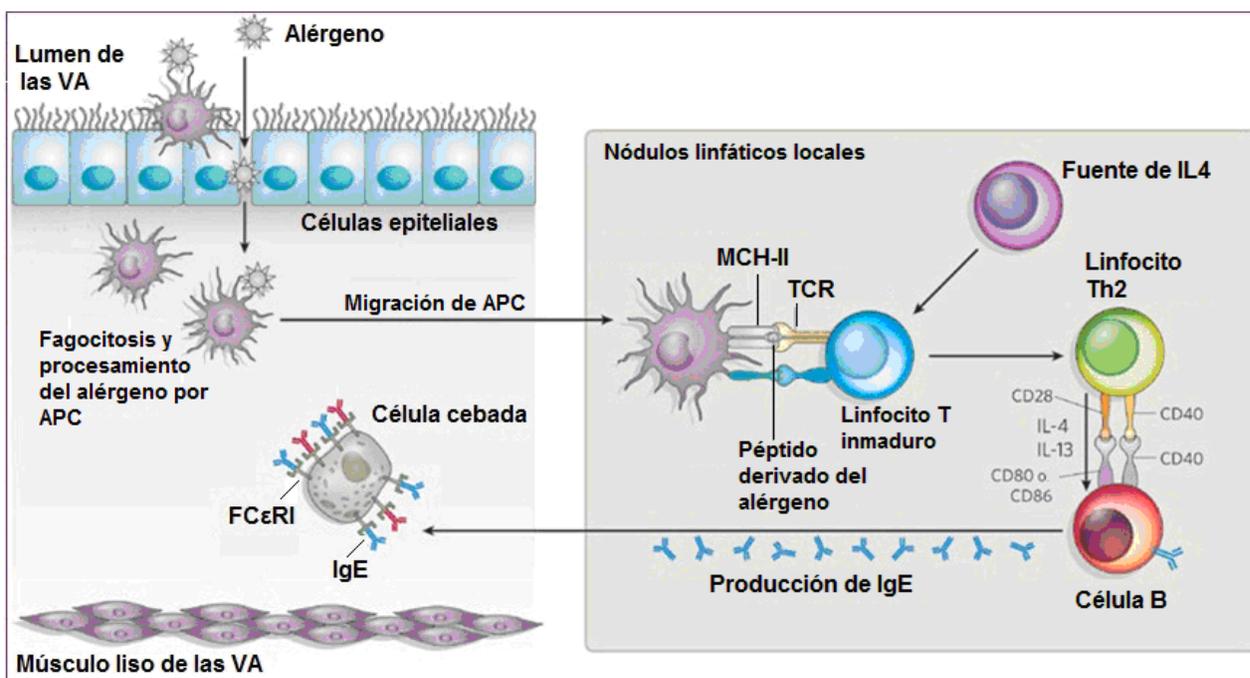


Figura 3. Sensibilización al alérgeno en las vías aéreas. APC, célula presentadora de antígeno; FCεRI, receptor de IgE de alta afinidad; IgE, inmunoglobulina E; MCH-II, complejo principal de histocompatibilidad tipo II; TCR, receptor de célula T; VA, vías aéreas (Modificado de Galli S., 2008).

1.5.1 Inflamación aguda

La reacción de fase temprana ocurre cuando el alérgeno entra nuevamente en contacto con la mucosa traqueobronquial y es reconocido por la IgE específica sobre las células sensibilizadas que liberan mediadores preformados, éstos incluyen aminas biogénicas, como la histamina, citocinas como el factor de necrosis

tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor α*), factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés, *factor growth endothelial vascular*) y mediadores derivados de lípidos, como prostaglandinas y leucotrienos (Galli S., 2008; Fernández V., 2010). La liberación de estos mediadores provoca la contracción del músculo liso bronquial, la secreción de moco, la vasodilatación y el incremento en la permeabilidad vascular que contribuyen a la manifestación de los síntomas de la enfermedad (Bousquet J., 2000; Fernández V., 2010).

La reacción de fase tardía ocurre varias horas después de la exposición al alérgeno e involucra el reclutamiento y activación de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos Th2. Adicionalmente se incrementa la expresión de moléculas de adhesión celular y la secreción de mediadores proinflamatorios por células residentes y células reclutadas hacia las VA (Galli S., 2008; Pease J., 2011). Los linfocitos Th2 secretan citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que promueven la producción de IgE por las células B, inducen el reclutamiento de eosinófilos y la hipersecreción de moco (Bousquet J., 2000; Zimmermann N., 2003).

1.5.2 Inflamación crónica

La inflamación crónica es inducida por la exposición repetitiva al alérgeno y se caracteriza por la presencia de un gran número de células del sistema inmune, cambios en la composición de la matriz extracelular y alteraciones en la cantidad, fenotipo y función de las células estructurales de las VA, proceso conocido como remodelación (Bousquet J., 2000; Vignola A., 2003; Vargas M., 2005). El proceso de remodelación busca restaurar la estructura de las VA y depende de células estructurales y de células inflamatorias reclutadas hacia las VA. El mantenimiento de la inflamación crónica involucra diferentes mediadores y moléculas que recluten y activen células inflamatorias hacia las VA (Lukacs N., 1999; García-R., 2002).

1.6 Quimiocinas, inflamación y tráfico leucocitario

El reclutamiento y mantenimiento de las células inflamatorias en las VA esta mediado por moléculas de adhesión celular como integrinas, cadherinas, selectinas y adresinas; citocinas tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y quimiocinas, entre las que destacan CCL1, 3, 5, 11, 17, 22 y CXCL8 (Palmqvist C., Goldsby R., 2006; Galli S., 2008). En conjunto, estos mediadores provocan la persistencia de la inflamación y por tanto la perpetuación de la enfermedad.

El proceso de reclutamiento requiere que los leucocitos migren a través de los vasos sanguíneos y entren a las VA (Ley K., 2007). Los reguladores más importantes y versátiles del tráfico leucocitario son las quimiocinas, estas moléculas inducen el reclutamiento de células inflamatorias hacia las VA por medio de quimiotaxis que es un proceso de migración celular dirigida hacia la fuente de quimiocinas en los sitios de inflamación (Pease J., 2011).

1.6.1 Quimiocinas estructura y clasificación

Las quimiocinas son proteínas quimiotácticas de bajo peso molecular, entre 8 y 15 kDa (Zlotnik A., 2000; Palmqvist C., 2007), que contribuyen de manera importante en procesos fisiológicos como la embriogénesis, el desarrollo y la función del sistema inmune y en procesos patológicos como la inflamación crónica y el cáncer (Comerford I. and McColl S., 2011). Las quimiocinas inducen la quimiotaxis de la célula que expresa su receptor hacia áreas con elevada concentración de quimiocina (Olson T., and Klaus L., 2002). Adicionalmente, las quimiocinas controlan de forma selectiva la adhesión celular y la activación de los leucocitos (Brühl H., 2001).

La estructura terciaria de las quimiocinas presenta una α -hélice cerca del dominio carboxilo terminal y tres hojas β -plegada en el extremo amino terminal donde poseen un motivo conservado de cisteínas. De acuerdo a la posición de estos residuos de cisteínas se han clasificado en cuatro subfamilias; CC, CXC,

CX₃C y C, donde X es cualquier aminoácido (Zlotnik A., 2000; Murphy P., 2000) (Fig. 4).

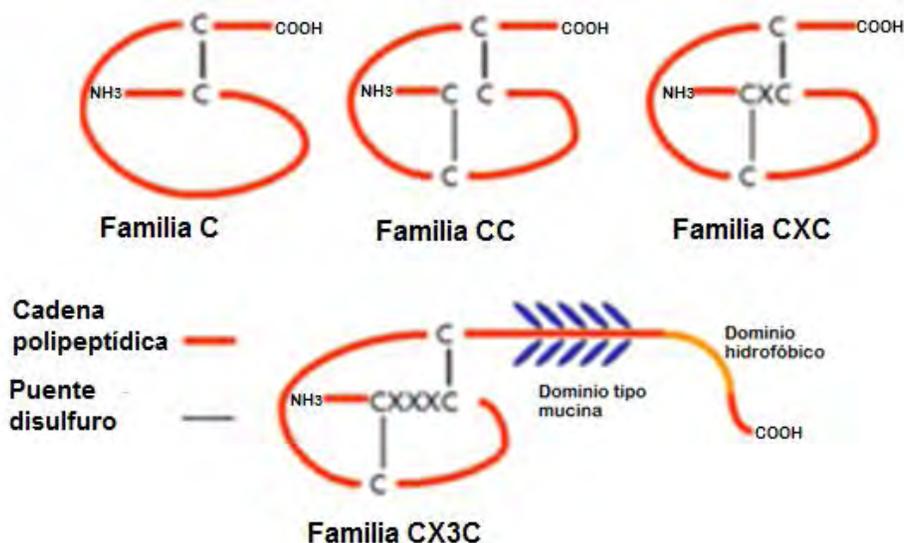


Figura 4. Esquema de las características estructurales de las familias de quimiocinas (Basado en Allen S., 2007).

La familia CC se caracteriza por ser quimioatrayente de linfocitos T, células B, células dendríticas, timocitos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y basófilos. Esta familia es la más numerosa y sus miembros tienen efectos biológicos muy diversos. Algunos miembros participan en la hematopoyesis, la apoptosis y la respuesta inflamatoria (Lukacs N., 1996; Zimmermann N., 2003). La familia CXC induce la respuesta inflamatoria aguda y actúa principalmente sobre granulocitos. Esta familia se divide en dos subgrupos de acuerdo a la presencia del motivo ELR (ácido glutámico, leucina y arginina) y se denominan ELR⁺ o ELR⁻ (Luster A., 1998). Las quimiocinas ELR⁺, como CXCL8, atraen principalmente a neutrófilos al sitio de inflamación e inducen la exocitosis de los gránulos contenidos en las células, el estallido respiratorio y la angiogénesis (Lukacs N., 1996; Mukaida N., 2003). Las quimiocinas CXC ELR⁻ tienen la capacidad de atraer a linfocitos y monocitos e inhiben la angiogénesis (Luster A., 1998; Strieter R., 2002). La familia CX₃C contiene como único miembro a la fractalina ó CX₃CL1 que es una

quimiocina que se encuentra embebida en la membrana plasmática. CX3CL1 tiene una región tipo mucina con receptores serina-treonina y actúa principalmente sobre células NK, linfocitos T, monocitos y neuronas (Luster A., 1998). La familia C está conformada por dos miembros, XCL1 y XCL2. Esta familia es estructuralmente similar a las quimiocinas de la familia CC, sin embargo carece de una cisteína cerca del extremo amino terminal. Los miembros de la familia C inducen la quimiotaxis de linfocitos pero no de monocitos ni neutrófilos (Allen S., 2007).

Las quimiocinas se unen a uno o varios receptores del tipo de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR, por sus siglas en inglés, *G protein-coupled receptors*) que son expresados diferencialmente en leucocitos. Estos receptores reconocen, con diferente afinidad, a más de un ligando de quimiocina de la misma familia (Luster A., 1998; Rot A. and von Andrian U., 2004). En humanos se han descrito 44 quimiocinas y 21 receptores de quimiocinas (Rot A. and von Andrian U., 2004; Comerford I. and McColl S., 2011) (Fig. 5).

Subfamilias de quimiocinas																							
CXC	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Receptor</th> <th>Ligando (s)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CXCR1</td> <td>CXCL8, CXCL6</td> </tr> <tr> <td>CXCR2</td> <td>CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8</td> </tr> <tr> <td>CXCR3A</td> <td>CXCL9, CXCL10, CXCL11</td> </tr> <tr> <td>CXCR3B</td> <td>CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL4</td> </tr> <tr> <td>CXCR4</td> <td>CXCL12</td> </tr> <tr> <td>CXCR5</td> <td>CXCL13</td> </tr> <tr> <td>CXCR6</td> <td>CXCL16</td> </tr> <tr> <td>CXCR7</td> <td>CXCL11, CXCL12</td> </tr> </tbody> </table>	Receptor	Ligando (s)	CXCR1	CXCL8, CXCL6	CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	CXCR3A	CXCL9, CXCL10, CXCL11	CXCR3B	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL4	CXCR4	CXCL12	CXCR5	CXCL13	CXCR6	CXCL16	CXCR7	CXCL11, CXCL12				
	Receptor	Ligando (s)																					
	CXCR1	CXCL8, CXCL6																					
	CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8																					
	CXCR3A	CXCL9, CXCL10, CXCL11																					
	CXCR3B	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL4																					
	CXCR4	CXCL12																					
CXCR5	CXCL13																						
CXCR6	CXCL16																						
CXCR7	CXCL11, CXCL12																						
CC	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Receptor</th> <th>Ligando (s)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CCR1</td> <td>CCL3, CCL3L1, CCL5, CCL7</td> </tr> <tr> <td>CCR2A/B</td> <td>CCL2, CCL7, CCL8, CCL13</td> </tr> <tr> <td>CCR3</td> <td>CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL28</td> </tr> <tr> <td>CCR4</td> <td>CCL7, CCL22</td> </tr> <tr> <td>CCR5</td> <td>CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5</td> </tr> <tr> <td>CCR6</td> <td>CCL20</td> </tr> <tr> <td>CCR7</td> <td>CCL19, CCL21</td> </tr> <tr> <td>CCR8</td> <td>CCL1</td> </tr> <tr> <td>CCR9</td> <td>CCL25</td> </tr> <tr> <td>CCR10</td> <td>CCL27, CCL28</td> </tr> </tbody> </table>	Receptor	Ligando (s)	CCR1	CCL3, CCL3L1, CCL5, CCL7	CCR2A/B	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13	CCR3	CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL28	CCR4	CCL7, CCL22	CCR5	CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5	CCR6	CCL20	CCR7	CCL19, CCL21	CCR8	CCL1	CCR9	CCL25	CCR10	CCL27, CCL28
	Receptor	Ligando (s)																					
	CCR1	CCL3, CCL3L1, CCL5, CCL7																					
	CCR2A/B	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13																					
	CCR3	CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL28																					
	CCR4	CCL7, CCL22																					
	CCR5	CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5																					
	CCR6	CCL20																					
	CCR7	CCL19, CCL21																					
	CCR8	CCL1																					
CCR9	CCL25																						
CCR10	CCL27, CCL28																						
C	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Receptor</th> <th>Ligandos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>XCR1</td> <td>XCL1, XCL2</td> </tr> </tbody> </table>	Receptor	Ligandos	XCR1	XCL1, XCL2																		
Receptor	Ligandos																						
XCR1	XCL1, XCL2																						
CX3C	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Receptor</th> <th>Ligando</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CX₃CR1</td> <td>CX₃CL1</td> </tr> </tbody> </table>	Receptor	Ligando	CX ₃ CR1	CX ₃ CL1																		
Receptor	Ligando																						
CX ₃ CR1	CX ₃ CL1																						

Figura 5. Receptores de Quimiocinas. Las quimiocinas inflamatorias están resaltadas en rojo, las constitutivas se muestran en verde y las que poseen un papel dual se muestran en amarillo (Modificado de Comerford I. and McColl S., 2011).

1.6.2 Quimiocinas y su papel en el asma alérgica

Diversos estudios han demostrado que las quimiocinas orquestan múltiples aspectos de la respuesta inmune en el asma. Las quimiocinas y sus receptores están involucrados en procesos que contribuyen al reclutamiento y activación de células inflamatorias, la hiperreactividad y la remodelación de las VA (Blease K., 2001; Zimmermann N., 2003). Por ello las quimiocinas son mediadores importantes durante el inicio y el mantenimiento de la enfermedad. Adicionalmente, diferentes quimiocinas se han propuesto como posibles blancos terapéuticos ya que pueden conducir hacia nuevas vías de control de la respuesta inflamatoria en el asma (Lukacs N., 2001; Palmqvist C., 2007).

Los miembros de las familias de quimiocinas CC y CXC han sido involucrados en el asma alérgica (Folkard S., 1997). Por ejemplo, CCL11 ha sido

identificada como atrayente y activador de eosinófilos en las VA durante la inflamación aguda (Conroy D., 1999; Schuh M., 2002). CCL3 y CCL5 se han relacionado con la hiperreactividad de las VA ya que se han encontrado en lavado bronquialveolar de pacientes asmáticos (Bousquet J., 2000, Palmqvist C., 2007). CXCL8 posee una potente actividad quimiotáctica sobre neutrófilos durante el asma severa (Luster A., 1998; King M. and Moores L., 2008).

1.6.3 CCL3 características estructurales y funcionales

CCL3 pertenece a la familia de quimiocinas CC y fue identificada, junto con la quimiocina CCL4, al aislar dos moléculas de bajo peso molecular secretadas por macrófagos murinos tras la exposición a lipopolisacárido. Estas proteínas promovieron una respuesta inflamatoria al ser inyectadas en ratones e *in vitro* mostraron actividad quimiotáctica de leucocitos, por lo que fueron designadas como proteínas inflamatorias de macrófagos 1 α y 1 β (MIP-1 α y MIP-1 β , del inglés *macrophage inflammatory protein-1 α y 1 β* , CCL3 y CCL4 respectivamente). Wolpe y Cerami sugirieron que estas dos proteínas eran homólogas, sin embargo son diferentes en secuencia y actividad biológica (Wolpe S. and Cerami A., 1989; Sherry B. and Franchin G., 2000). El gen de CCL3 fue designado como SCYA3 y en humanos se localiza en el cromosoma 17 (Zlotnik A., 2000; Murphy P., 2000). Esta quimiocina es sintetizada como un precursor de 92 aminoácidos que posteriormente es cortado para producir una proteína madura de 70 aminoácidos que puede formar dímeros o tetrámeros (Covell D., 1994; Sherry B. and Franchin G., 2000). Los principales receptores a los que se une CCL3 son CCR1 y CCR5 (Zlotnik A., 2000). Ambos receptores son expresados en monocitos, eosinófilos, células dendríticas, linfocitos T, células NK y fibroblastos por lo que puede inducir quimiotaxis sobre estos tipos celulares (Luster A., 1998; Sherry B. and Franchin G., 2000; Palmqvist C., 2007). CCR4 y CCR9 también han sido reportados como receptores de CCL3 pero sus interacciones aún no son claras (Nibbs R., 1997). CCL3 es una proteína sintetizada y secretada rápidamente en respuesta a estímulos como lipopolisacárido, TNF- α , IFN- γ e IL-1 (Sherry B. and Franchin G., 2000). Las células que secretan esta quimiocina son monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células

cebadas, linfocitos y fibroblastos. Se ha descrito que los macrófagos alveolares secretan CCL3 durante reacciones alérgicas (Dery R. and Bissonnette E., 1999).

1.6.4 CCL5 características estructurales y funcionales

CCL5 pertenece a la familia de quimiocinas CC y se describió durante el estudio de genes de expresión tardía en linfocitos T, esta quimiocina se designó como RANTES (por sus siglas en inglés, *Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted*) (Schall T., 1988). En humanos el gen de CCL5 fue designado como SCYA5 y se localiza en el cromosoma 17 (Murphy P., 2000). El producto del gen de CCL5 es aproximadamente de 10 kDa, tiene 68 residuos de aminoácidos y forma dímeros (Chung C., 1995). CCL5 se une a los receptores CCR1, CCR3 y CCR5 que se expresan sobre células dendríticas, células NK, células cebadas, linfocitos T, eosinófilos, basófilos y monocitos (Luster A., 1998; Appay, V., 2001; Palmqvist C., 2007) y conducen hacia la activación de integrinas y la degranulación de basófilos y eosinófilos (Koya T., 2006). La producción de CCL5 se ha detectado en un gran número de órganos y células del sistema inmune y no inmune y su expresión se incrementa en los sitios de inflamación (Appay, V., 2001). Esta quimiocina es secretada principalmente por linfocitos T CD8+, células epiteliales, fibroblastos, plaquetas, células cebadas y monocitos (Koya T., 2006; Palmqvist C., 2007). CCL5 se expresa en pulmones de pacientes con asma y se ha encontrado en altos niveles en lavado bronquioalveolar (Folkard S., 1997; Robroeks C., 2010).

1.6.5 CCL11 características estructurales y funcionales.

CCL11 se identificó como un potente quimioatrayente de eosinófilos en lavado bronquioalveolar de cobayos sensibilizados y retados con OVA (Griffiths-J., 1993), posteriormente la microsecuencia reveló una nueva proteína de 73 aminoácidos que fue denominada como eotaxina (Conroy D., 1999). Esta proteína pertenece a la familia de quimiocinas CC. En humanos el gen de CCL11 se designó como SCYA11 y se encuentra en el cromosoma 17, este gen codifica un péptido de 97

aminoácidos que al ser cortado produce una proteína madura de 74 residuos de aminoácidos (García Z., 1997; Conroy D., 1999; Murphy P., 2000). CCL11 se une con alta afinidad al receptor CCR3 y con menor afinidad a CCR5 y a CCR2 (García Z., 1997; Murphy P., 2000; Zlotnik A., 2000; Palmqvist C., 2007) e induce la quimiotaxis de eosinófilos, monocitos, linfocitos T, células dendríticas y células NK. CCL11 es una quimiocina secretada principalmente por células epiteliales, células endoteliales y células cebadas (García Z., 1997; Palmqvist C., 2007).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que CCL11 participa en el reclutamiento de eosinófilos hacia los sitios de inflamación y en la producción de eosinófilos en la médula ósea. Adicionalmente, CCL11 regula la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1 y VCAM-1 sobre células endoteliales (Hohki G., 1997). En pacientes con asma, CCL11 se expresa después de la exposición al alérgeno e induce la quimiotaxis de eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2 (Conroy D., 1999; Zietkowski Z., 2011). En el pulmón de cobayos CCL11 se expresa constitutivamente, sin embargo se incrementa en el lavado bronquioalveolar, esputo y en la pared de las VA durante la respuesta alérgica (Rothenberg M., 1995; Conroy D., 1999, 2001).

1.6.6 CXCL8 características estructurales y funcionales

CXCL8 pertenece a la familia de quimiocinas CXC y fue descrita como un factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de células mononucleares humanas estimuladas con lipopolisacárido (Yoshimura T., 1987). En el humano el gen de CXCL8 fue designado como *IL8* y se localiza en el cromosoma 4 (Zlotnik A., 2000; Murphy P., 2000). CXCL8 es un homodímero cuyo peso molecular corresponde aproximadamente a 10 kDa (Yoshimura T., 1987). El cDNA de CXCL8 codifica para una proteína precursora de 99 aminoácidos con una secuencia señal que es cortada para producir una proteína madura de 77 o 72 residuos de aminoácidos (Mukaida N., 2003). La estructura terciaria del homodímero de CXCL8 consiste en dos α -hélices antiparalelas situadas sobre seis hojas β -plegadas antiparalelas (Mukaida N., 2003). Se ha descrito que a pesar de formar un homodímero, CXCL8

tiene actividad biológica en su forma monomérica (Burrows S., 1994; Mukaida N., 2003).

Los principales receptores a través de los que CXCL8 ejerce sus funciones fisiológicas son CXCR1 y CXCR2 (Zlotnik A., 2000; Murphy P., 2000) que se expresan en neutrófilos, linfocitos T y monocitos (Palmqvist C., 2007). Esta quimiocina es secretada por monocitos, linfocitos T, neutrófilos, fibroblastos, monocitos, células endoteliales y epiteliales (Mukaida N., 2000; Palmqvist C., 2007). La producción de CXCL8 es inducida por citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α además de virus y bacterias (Mukaida N., 2000). Se ha descrito que en el asma esta quimiocina es el principal quimioatrayente de neutrófilos y promueve la liberación de histamina y leucotrienos que inducen la bronco-obstrucción de las VA (White M., 1989, Fujimura M., 1999).

2. JUSTIFICACIÓN

El asma es una enfermedad que en las últimas tres décadas ha aumentado considerablemente en países occidentales (Kim HY 2010; Pease J., 2011). La característica patológica fundamental del asma es la inflamación crónica. El inicio y el mantenimiento de la inflamación involucra el reclutamiento de células inflamatorias hacia las VA. Las quimiocinas son las principales moléculas que reclutan a las células inflamatorias hacia los sitios de inflamación. Diversos estudios demuestran que el reclutamiento de eosinófilos es dependiente de CCL3 y de CCL5 y se han encontrado elevados niveles de estas quimiocinas en LBA y pulmón de pacientes con asma (Campbell E., 1998; Lukacs N., 1996, 1999, 2001; Palmqvist C., 2007; Zietkowski Z., 2011). Adicionalmente, CCL11 se ha caracterizado como un atrayente y activador de eosinófilos en las VA durante la inflamación aguda y CXCL8 posee una potente actividad quimiotáctica sobre neutrófilos (Luster A., 1998; Conroy D., 1999; Schuh M., 2002; Taube C., 2003; King M., 2008). Por ello, el estudio de la expresión y función de las quimiocinas en modelos animales nos permitirá conocer el papel de estos mediadores en el desarrollo de patologías inflamatorias como el asma.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos en un modelo de cobayos sensibilizados y retados con ovoalbúmina (OVA) se identificó un grupo de cobayos que desarrolla una respuesta bronco-obstructiva después del reto con OVA, este grupo ha sido referido como modelo de asma alérgica (Bazán P., 2009; Moreno A., 2010). Adicionalmente, un grupo de cobayos no presenta esta respuesta bronco-obstructiva después del reto con OVA por lo que fueron denominados no respondedores (NR) (Ramos R., et al. *manuscrito en preparación*). En estos dos grupos de cobayos se encontraron diferencias en el número y tipo de células inflamatorias infiltradas en el lavado bronquioalveolar (LBA) de manera inmediata al reto con OVA. En el grupo NR no se incrementa el número de células inflamatorias en el LBA, mientras que el grupo de cobayos del modelo de asma se caracteriza por presentar elevados niveles de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos de manera inmediata al reto con OVA. Adicionalmente el grupo de cobayos NR desarrolla hiperreactividad a histamina como el grupo del modelo de asma (Ramos R., et al. *manuscrito en preparación*).

El mecanismo por el cual se presenta o no la respuesta bronco-obstructiva en cobayos sensibilizados y retados con OVA puede deberse a diversos factores. Sin embargo, las células inflamatorias infiltradas hacia las VA son las principales orquestadoras del proceso alérgico y su disminución puede asociarse con la ausencia de la respuesta bronco-obstructiva. Las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 tienen un papel importante en el reclutamiento de las células inflamatorias hacia las VA durante el asma, por lo que en este estudio queremos determinar si los niveles de estas quimiocinas se asocian con las células inflamatorias infiltradas en el LBA de los cobayos del modelo de asma y en el grupo de cobayos NR.

4. HIPÓTESIS

Si el reclutamiento de células inflamatorias hacia las VA es dependiente de quimiocinas, entonces los niveles de CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 estarán disminuidos en los cobayos no respondedores (NR).

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar los niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 y su relación con el infiltrado de células inflamatorias en el LBA de cobayos expuestos a OVA.

Objetivos Particulares

- Medir la respuesta bronco-obstructiva inducida por OVA en cobayos sensibilizados mediante pletismografía barométrica.
- Medir la hiperreactividad de las VA inducida por reto con OVA en cobayos.
- Realizar conteo total y diferencial de células infiltradas en el LBA 24 horas después del reto con OVA.
- Cuantificar los niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 en el LBA y en los sobrenadantes de homogenado pulmonar de cobayos expuestos a OVA mediante ELISA.
- Identificar las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 en secciones de pulmón de cobayos expuestos a OVA mediante inmunohistoquímica.
- Correlacionar los niveles de las quimiocinas con el infiltrado de células inflamatorias en el LBA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este estudio se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa HsdPoc:DH de Harlan México con pesos aproximados de 350 a 400 g al inicio del protocolo. Los cobayos se mantuvieron en condiciones convencionales de temperatura, humedad y alimentación en el bioterio del INER que consistieron en aire acondicionado filtrado a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50 a 60% de humedad, 12/12 horas de ciclo luz y oscuridad y cama esterilizada, los animales se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan, S.A de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Este proyecto fue aprobado por el comité ético y científico del INER.

Sensibilización antigénica

El primer día los animales fueron sensibilizados con OVA por vía intraperitoneal y subdérmica mediante una inyección que contenía 0.5 ml de una solución de OVA (0.06 mg/ml, Sigma S.t Louis, E.U.) e hidróxido de aluminio (1 mg/ml, J.T. Backer, NJ, E.U.) disueltos en solución salina fisiológica (SSF) (modificado de Campos G., 2001) (Figura 6).

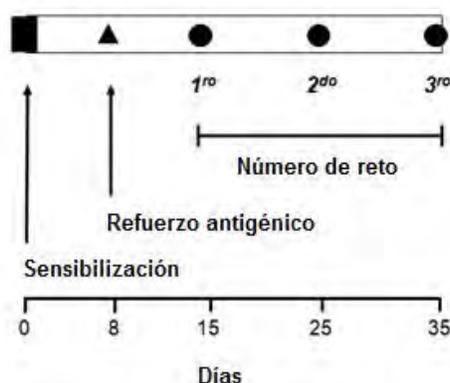


Figura 6. Esquema de sensibilización y retos antigénicos

El día ocho se reforzó la sensibilización antigénica suministrando aerosoles de OVA. Los cobayos fueron colocados por separado dentro de una cámara

provista de flujo de aire continuo (10 ml/s) y que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. La OVA fue nebulizada (3 mg/ml SSF) durante 5 minutos con un nebulizador US-Bennett (flujo de 2 ml/min). Este nebulizador produce una mezcla de partículas en donde el 44% es menor a 4 μm de diámetro, el 38% de 4 a 10 μm y el 18% mayor a 10 μm . Cinco minutos antes y durante una hora posterior al refuerzo antigénico se evaluó la función pulmonar de los cobayos mediante pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, E.U.) (Fig. 7).

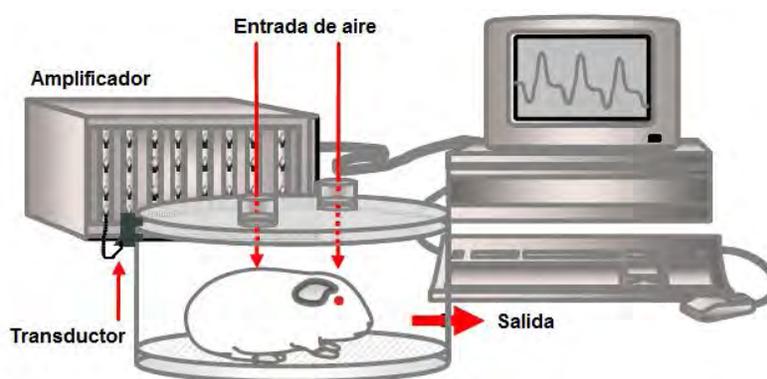


Figura 7. Dibujo del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. El transductor de presión diferencial registra los cambios de presión dentro de la cámara con relación a la presión atmosférica que es constante. La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente a una computadora para su procesamiento.

Pletismografía Barométrica

El sistema de pletismografía barométrica está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara y las compara con una cámara de referencia (Bazán P., 2004). Dichas fluctuaciones se registraron con un transductor de presión diferencial (SCXL4DN SenSym, Milpitas, CA, E.U.) conectado a un preamplificador. La señal generada fue procesada y analizada mediante un programa (Buxco Biosistem XA v1.1). Este programa fue ajustado para incluir solamente volúmenes corrientes de 1 ml o más con un tiempo mínimo espiratorio de 15 s, tiempo inspirado de 3 s y una diferencia máxima entre los

volúmenes inspirados y expirados del 10%. El ajuste de estos parámetros en el programa se realizó con el fin de no incluir artefactos en los registros. De esta forma aproximadamente del 7 al 10% de las ventilaciones de cada periodo fueron eliminadas principalmente por movimientos del cobayo. El valor del índice de bronco-obstrucción (íB) consistió en el promedio de 15 s de lecturas y de éstas, el promedio de los últimos 5 minutos de cada periodo.

El íB refleja el grado de obstrucción de las VA y se fundamenta en los cambios de volumen del aire ambiental y del que está dentro de los pulmones del cobayo. Durante la inspiración el aire ambiental se calienta de 25° a 37°C y se humidifica al 100% una vez que está dentro de los pulmones. Los sensores de la cámara de pletismografía detectan el cambio en el volumen como un aumento en la presión en el interior de la cámara. Este incremento en la presión es transitorio pues disminuye conforme el animal exhala el aire, el aire exhalado pierde humedad y temperatura rápidamente bajando el volumen del aire dentro de la cámara y este proceso se registra como una disminución en la presión. Aunque el transductor no mide directamente los flujos espiratorios e inspiratorios, el programa de la computadora, previamente calibrado, puede calcular el flujo de manera indirecta evaluando los cambios de presión durante la inspiración y la espiración en el tiempo (Hamelmann E., 1997). La información es procesada mediante el programa referido anteriormente. Para calcular el valor del íB el programa utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{íB} = [(\text{Te}-\text{Tr}) / \text{Tr}] [\text{PFE} / \text{PFI}]$$

Dónde:

Te= Tiempo total espiratorio (s)

Tr= Tiempo total de relajación (s)

PFE= Pico de flujo espiratorio (presión pasiva máxima, cmH₂O)

PFI= Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH₂O)

Retos antigénicos

Ocho días después del refuerzo antigénico, es decir el día 15, los cobayos sensibilizados recibieron el primer reto con OVA (1mg/ml SSF) siguiendo el protocolo de pletismografía del refuerzo antigénico. Los siguientes retos con OVA se administraron cada diez días en dosis de 0.5 mg/ml de SSF hasta completar grupos de cobayos con tres retos antigénicos. Los cobayos control solo recibieron SSF durante los retos. Todos los retos duraron un minuto y el íB fue registrado durante una hora.

Reactividad de las vías aéreas

La reactividad de las VA se evaluó en el grupo control y en los grupos experimentales durante el tercer reto con OVA comparando curvas dosis-respuesta a histamina inhalada antes y después de la administración de OVA. Inicialmente se obtuvo el íB basal y posteriormente se nebulizaron durante un minuto dosis crecientes de histamina (0.013 a 0.32 mg/ml; Sigma St Louis, E.U.). Para cada dosis se registró el íB durante 5 minutos y se obtuvo el valor promedio. El intervalo entre cada dosis fue de 10 minutos. La curva dosis-respuesta se terminó una vez que la histamina produjo una bronco-obstrucción que triplicara el íB basal (dosis provocativa 200, DP₂₀₀). Posteriormente se esperó a que la bronco-obstrucción disminuyera a un íB aproximado al 50% del valor basal (Bazán P., 2004) y se retó durante un minuto con aerosoles de OVA solo a los cobayos de los grupos experimentales (0.05mg/1ml SSF). La segunda curva a histamina se realizó tres horas después del reto con OVA siguiendo el mismo protocolo de la primera curva (Sommer B., 2001).

Conteo total y diferencial de células infiltradas en el lavado bronquioalveolar

Veinticuatro horas después de la segunda curva de histamina los animales fueron sobredosificados con pentobarbital sódico (28 mg/Kg) para inducir paro cardiorrespiratorio. Posteriormente se realizó una incisión en la tráquea para introducir una cánula por donde se administraron 5 ml de SSF estéril mantenida a

37°C. La solución fue recuperada lentamente después de un minuto, este procedimiento se repitió y el fluido obtenido fue mezclado con el primero. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm y a una temperatura de 4°C en una centrifuga (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania), el sobrenadante fue recuperando y el sedimento celular se resuspendió con 1 ml de SSF. El número total de células en el LBA se estableció tomando 10 µl de la suspensión celular y se colocaron en 40 µl de azul de tripan al 0.4% (Sigma, S.t Louis, E.U.), la muestra se depositó en una cámara de Neubauer para realizar el conteo directo de las células en 25 cuadros. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución (5) y por el factor de la cámara (10,000) expresado como el número de células por mililitro de LBA. El volumen celular se ajustó hasta obtener 1×10^6 células/ml adicionando SSF y de esta solución se tomaron 50 µl que se centrifugaron a 850 rpm durante 5 minutos para obtener un botón celular que fue teñido con la técnica de Romanowsky para realizar conteo diferencial. Esta tinción se realizó utilizando una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (Laboratorios Wescor, Hematology Reagent ABC, E.U.) mediante la que se tiñen los núcleos y gránulos de neutrófilos en púrpura, gránulos de eosinófilos en rosa-naranja y eritrocitos en rosa. Se contaron un mínimo de 200 células, sin incluir eritrocitos, con un microscopio de luz (Olympus, Japón) en un aumento 100X.

Detección de quimiocinas por ensayo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA)

Después de haber obtenido el LBA se disectó el lóbulo inferior derecho del pulmón y se depositó en 195 µl de solución de lisis celular (BioRad, E.U.) que contenía 5 µl de inhibidor de proteasas (PMSF 0.2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM y Pepstatina A 0.2 mM, Sigma, St Louis MO, E.U.). El lóbulo pulmonar fue disgregado mecánicamente empleando un homogenizador (Polytron PT3100, Suiza). El sobrenadante del LBA y del homogenado pulmonar fueron utilizados como muestras para la detección de las quimiocinas mediante ELISA de tipo directo.

Las placas de ELISA (Costar, E.U.) fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con 50 µl de sobrenadante de LBA o de homogenado pulmonar diluido 1:10 en solución amortiguadora de carbonatos (NaCO₃ 0.015M, NaHCO₃ 0.035 M, pH 9.6). El volumen de las placas fue decantado y los pozos fueron lavados con solución amortiguadora de sales y fosfatos (PBS) (NaH₂PO₄ 13 mM, Na₂HPO₄ 88mM, NaCl 150 mM; pH 7.2) que contenía Tween 20 al 0.05% (Sigma, St Louis MO, E.U.) (PBS-T). Los sitios inespecíficos fueron bloqueados durante 3 horas a 37°C con albúmina bovina fracción V (Sigma, St Louis MO, E.U.) al 1% en PBS-T. Los pozos fueron incubados durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios dirigidos contra CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 adquiridos de R&D Systems, EUA en una concentración final de 1 µg/ml en PBST que contenía albúmina sérica bovina al 1%. Los pozos se incubaron durante dos horas a 37 °C con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, St Louis MO, E.U.) y durante quince minutos en una solución de ortofenil diaminobencilina (Sigma, St Louis MO, E.U.) que contenía 0.2% de peróxido de hidrógeno (Merck KGaA, Alemania). La reacción se detuvo con 50 µl por pozo de ácido sulfúrico 2.5 N. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector colorimétrico automatizado (LabSystems, modelo Multiskan, E.U.), las densidades ópticas de las muestras fueron ajustadas a partir de las densidades ópticas obtenidas de las proteínas recombinantes para cada citocina (R&D Systems, E.U.).

Detección de quimiocinas por Inmunohistoquímica

El lóbulo inferior izquierdo fue incluido en parafina y se realizaron secciones de 3 µm de grosor fijadas a laminillas de vidrio silanizadas (Sigma, St Louis MO, E.U.). Los cortes de pulmón fueron desparafinados en un horno de hibridación a una temperatura de 56°C durante 30 minutos y rehidratados usando alcoholes graduados, xilol, etanol absoluto, etanol al 90% y agua destilada. La recuperación antigénica se realizó utilizando una solución amortiguadora de citrato de sodio (0.01 M, pH 6.0) a máxima potencia en un horno de microondas durante cinco minutos y se dejó enfriar durante 20 minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 30% (Merck KgaA,

Alemania) y los sitios inespecíficos se bloquearon con suero universal de caballo (Vectastain Universal Quick Kit, VECTOR, E.U.) en PBS. Las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos dirigidos contra CCL3 en una dilución de 1:50 y para CCL5, CCL11 y CXCL8 en una dilución de 1:100 en la solución de bloqueo. La detección de la unión específica del anticuerpo se realizó utilizando un anticuerpo secundario universal biotinilado y una solución del complejo preformado de estreptavidina-peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit, VECTOR E.U.). Las laminillas se lavaron dos veces con PBS entre todas las incubaciones durante cinco minutos a 130 rpm. Posteriormente se utilizó una solución de 3,3'-diaminobenzidina (BioRad, E.U.) como cromógeno y peróxido de hidrógeno como sustrato. La reacción cromogénica fue observada bajo un microscopio de campo claro y se detuvo con agua corriente. Finalmente las secciones de pulmón fueron deshidratadas y contrateñidas con hematoxilina de Harris. Para controlar la unión inespecífica del anticuerpo secundario, secciones de pulmón del mismo cobayo fueron incubadas en ausencia de los anticuerpos primarios y procesados de la forma descrita. Las secciones de pulmón fueron analizadas en un microscopio de campo claro (Olympus, Provis AX-70, Japón).

Análisis estadístico

La reactividad de las VA a la histamina fue evaluada mediante la dosis provocativa 200% (DP₂₀₀), i.e., la dosis de histamina interpolada que causa que se triplique el íB basal. Las comparaciones entre los grupos fueron evaluadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para la asociación entre las células inflamatorias infiltradas en el LBA y los niveles de quimiocinas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos las significancias se establecieron con una $P < 0.05$. Los valores en las figuras fueron expresados como la media \pm el error estándar de seis cobayos por grupo.

7. RESULTADOS

7.1 Obstrucción de las vías aéreas inducida por ovoalbúmina en cobayos sensibilizados

Los cobayos NR, a pesar de haber sido sensibilizados y retados con OVA, no presentan respuesta bronco-obstructiva de la misma forma que el grupo control que sólo recibió SSF. En todos los retos los cobayos del modelo de asma incrementaron en más de un 200% su íB basal en comparación con el grupo control y con el grupo de cobayos NR ($P < 0.05$, $n=6$); (Fig. 8).

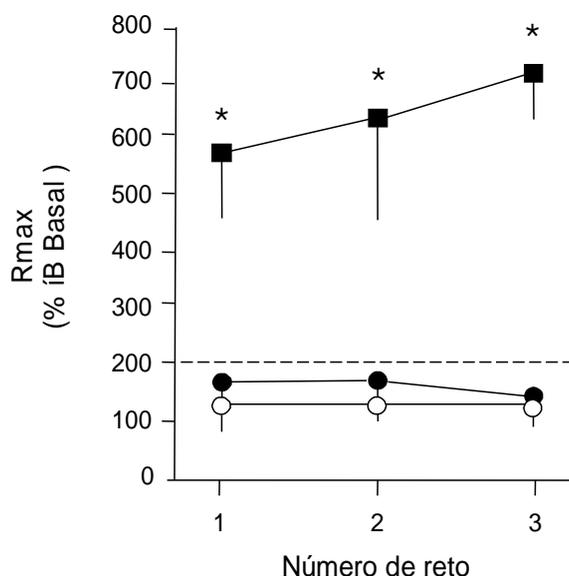


Figura 8. Respuesta bronco-obstructiva máxima inducida por reto con OVA en cobayos sensibilizados. Los valores corresponden al grupo control (círculos blancos), grupo de cobayos NR (círculos negros) cobayos con respuestas $< 200\%$ del íB basal y grupo del modelo de asma (cuadros negros) con respuestas $\geq 200\%$ del íB basal. $*P < 0.05$, ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiples de Tukey, $n = 6$ cobayos por grupo. *Rmax*, respuesta máxima; *íB*, índice de bronco-obstrucción.

7.2 Reactividad de las VA.

La reactividad de las VA fue evaluada comparando curvas dosis-respuesta a histamina antes y después del reto con OVA, las curvas fueron terminadas una vez que los cobayos alcanzaron la dosis provocativa 200 (DP_{200}) es decir aquella

dosis que triplicó el valor basal del íB. El cociente DP_{200} post-reto/ DP_{200} basal representa el grado de reactividad de las VA y fue mayor a 1 en el grupo control, lo que significa que los cobayos necesitaron una concentración mayor de histamina en la segunda curva en comparación con la primera curva. Los cobayos del grupo del modelo de asma y del grupo NR mostraron una DP_{200} post-reto menor a la DP_{200} basal lo que representa un incremento en la reactividad de las VA (Fig. 9).

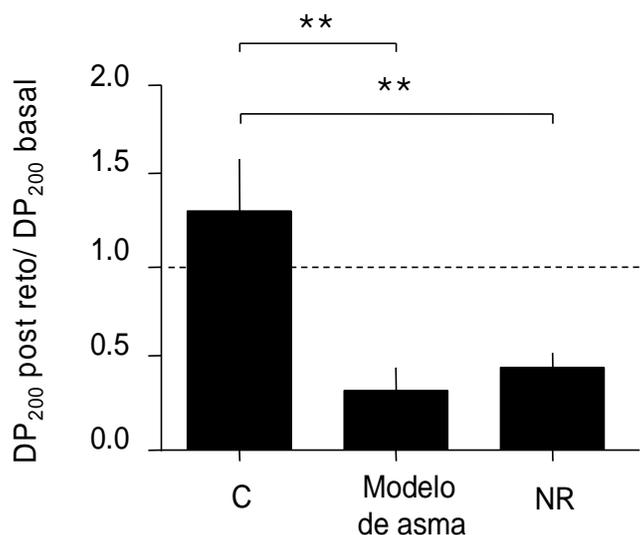


Figura 9. Reactividad de las VA a la histamina en cobayos expuestos a reto antigénico. La gráfica muestra el cociente DP_{200} post-reto/ DP_{200} basal. La línea discontinua en el centro de la gráfica señala el límite entre hiporreactividad e hiperreactividad. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar, $n = 6$ cobayos por grupo. ** $P < 0.01$ ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C, grupo control; NR, no respondedor.

7.3 Conteo celular total y diferencial en lavado bronquioalveolar

El conteo celular total en el LBA se obtuvo por tinción vital y se expresó en millones de células/ml. El número de células totales en los cobayos del grupo del modelo de asma aumentó significativamente en comparación con el grupo control ($P < 0.001$, $n=6$) y con el grupo de cobayos NR ($P < 0.01$, $n=6$); (Fig. 10).

El conteo celular diferencial se realizó mediante la tinción Romanowsky y se expresó en miles de células/ml. El número de eosinófilos aumentó significativamente en el grupo del modelo de asma en comparación con el grupo

control y el grupo de cobayos NR ($P < 0.001$, $n = 6$). En el grupo de cobayos NR se observó un incremento significativo en el número de neutrófilos en comparación con el grupo control ($P < 0.01$, $n = 6$). No se observaron diferencias significativas en el número de macrófagos y linfocitos (Fig.10).

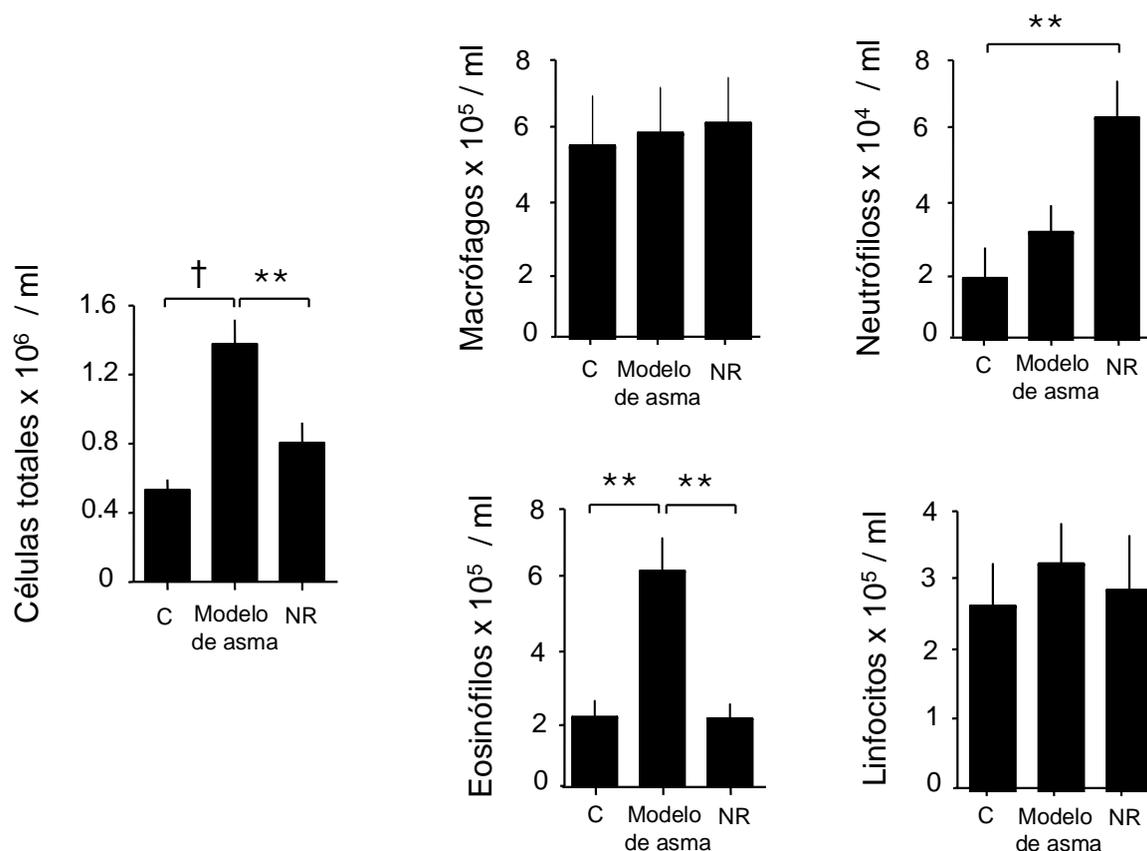


Figura 10. Conteo celular total y diferencial en lavado bronquioalveolar de cobayos expuestos a reto con OVA. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar, $n = 6$ animales en cada grupo. ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$ ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C, grupo control; NR, no respondedor.

7.4 Cuantificación de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 en LBA y en sobrenadante de homogenado pulmonar mediante ELISA

Los niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 se determinaron mediante ELISA de tipo directo en sobrenadantes de LBA y en homogenado pulmonar y se expresaron en ng de quimiocina/ml. La quimiocina CCL3 sólo fue

detectada en el LBA del grupo de cobayos del modelo de asma (Fig. 11A). Los niveles de CCL3 en el homogenado pulmonar se incrementaron en el modelo de asma en comparación con el grupo control y con el grupo NR (Fig. 11B).

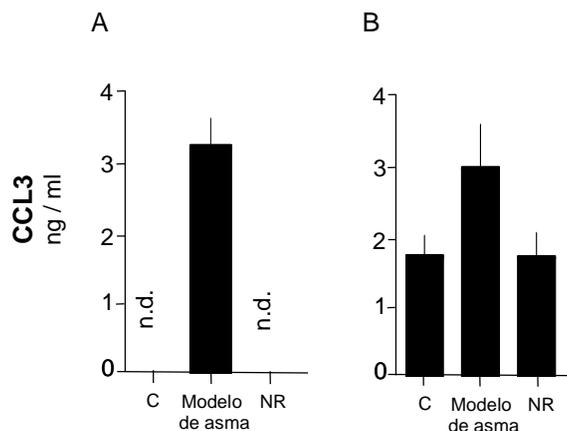


Figura 11. Niveles de CCL3 en (A) LBA y (B) homogenado pulmonar de cobayos expuestos a reto con OVA. Las barras corresponden a las medias de la concentración de quimiocina expresada como ng/ml \pm error estándar, $n = 6$ animales en cada grupo. n.d., no detectado; C, grupo control; NR, no respondedor.

Los niveles de CCL5 aumentaron de manera significativa en el LBA del grupo del modelo de asma en comparación con el grupo control ($P < 0.05$, $n = 6$); (Fig. 12A) y en el homogenado pulmonar en comparación con el grupo control y con el grupo de cobayos NR ($P < 0.05$, $n = 6$); (Fig. 12B).

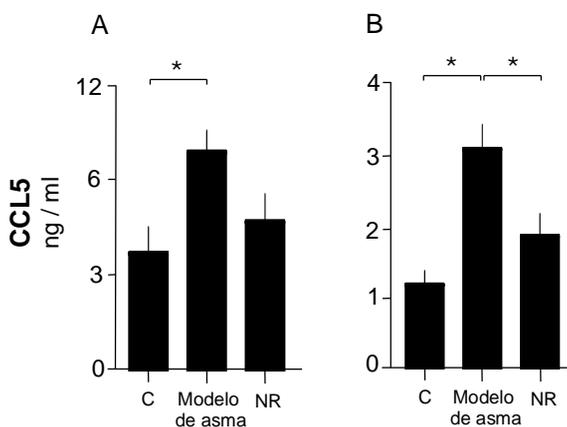


Figura 12. Niveles de CCL5 en (A) LBA y (B) homogenado pulmonar de cobayos expuestos a reto con OVA. Las barras corresponden a las medias de la concentración de quimiocina

expresada como ng/ml \pm error estándar, $n = 6$ animales en cada grupo. * $P < 0.05$ ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C, grupo control; NR, no respondedor.

Los niveles de la quimiocina CCL11 aumentaron significativamente en LBA y en el homogenado pulmonar del grupo de cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo control (** $P < 0.01$, $n=6$) y los NR (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, $n=6$, respectivamente); (Fig.13A y 13B). Esta quimiocina aumentó de manera significativa en el homogenado pulmonar del grupo de cobayos NR en comparación con el grupo control (* $P < 0.05$, $n=6$); (Fig.13B).

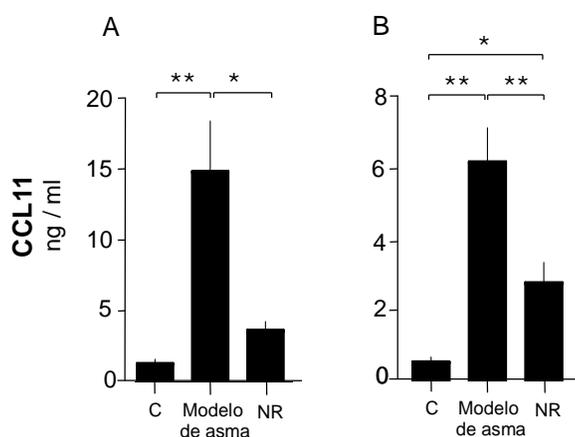


Figura 13. Niveles de CCL11 en A) LBA y B) homogenado pulmonar de cobayos expuestos a reto con OVA. Las barras corresponden a las medias de la concentración de quimiocina expresada como ng/ml \pm error estándar, $n = 6$ animales en cada grupo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C, grupo control; NR, no respondedor.

Los niveles de CXCL8 en LBA y en homogenado pulmonar mostraron un aumento significativo en el grupo de cobayos del modelo de asma con respecto al grupo control ($P < 0.05$, $n=6$; Fig. 14A y B).

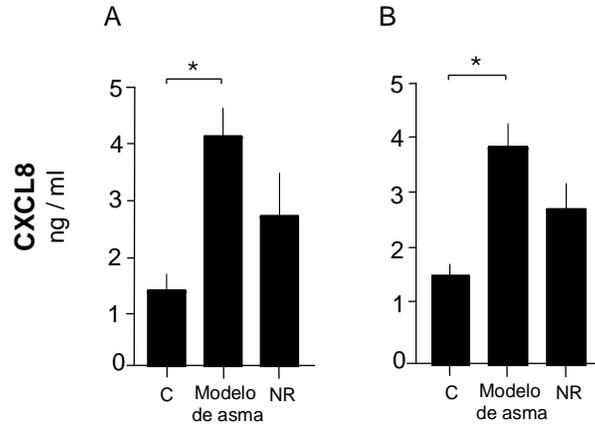


Figura 14. Niveles de CXCL8 en A) LBA y B) homogenado pulmonar de cobayos expuestos a reto con OVA. Las barras corresponden a las medias de la concentración de quimiocina expresada como ng/ml \pm error estándar, $n = 6$ animales en cada grupo. * $P < 0.05$ ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. C, grupo control; NR, no respondedor.

7.5 Identificación de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 mediante inmunohistoquímica

Las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 se identificaron sobre secciones de tejido pulmonar mediante análisis de inmunohistoquímica (IHQ) y se analizaron en un microscopio de campo claro. La expresión de CCL3 se observó sobre las células estructurales y en células inflamatorias infiltradas del grupo del modelo de asma. Las secciones de tejido pulmonar de los cobayos del grupo NR y del grupo control no mostraron inmunotinción (Fig.15).

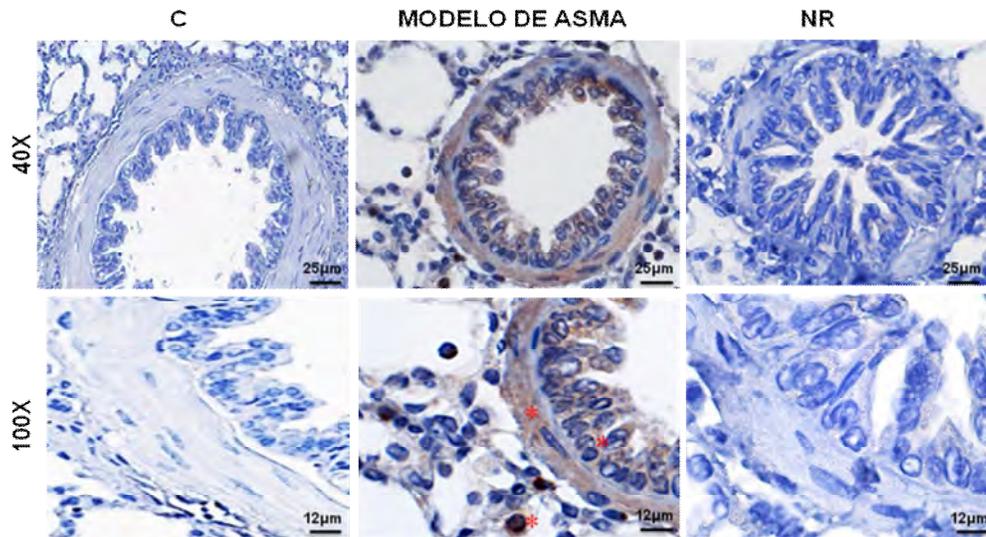


Figura 15. Microfotografías de secciones pulmonares donde se identificó la expresión de CCL3 en las VA mediante IHQ. La escala de las barras corresponde a 25 µm (40X) y 12 µm (100X). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. *C*, grupo control; *NR*, no respondedor.

La expresión de CCL5 se identificó únicamente en el infiltrado celular peribronquial del grupo del modelo de asma. Las secciones de tejido pulmonar del grupo de cobayos NR y el grupo control no mostraron inmunotinción (Fig. 16).

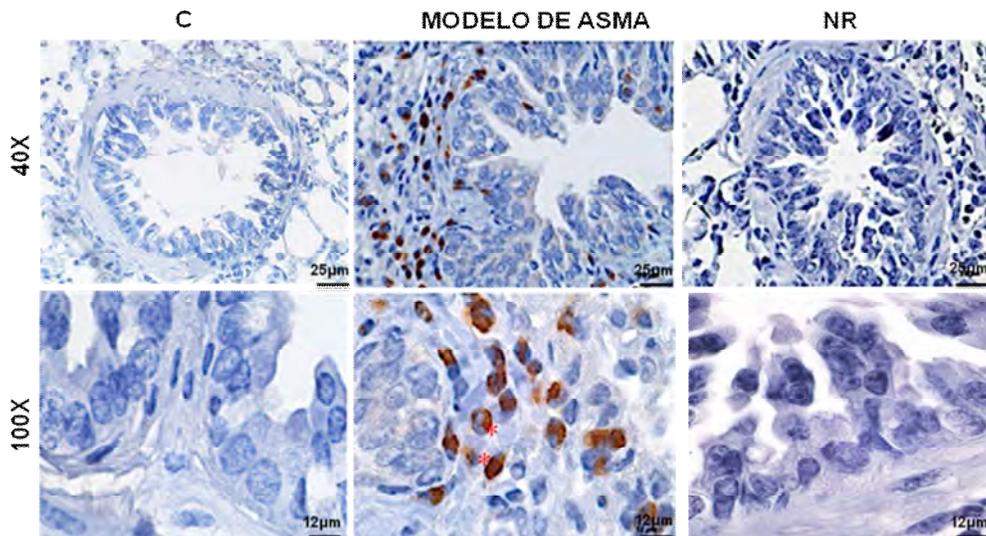


Figura 16. Microfotografías de secciones pulmonares donde se identificó la expresión de CCL5 en las VA mediante IHQ. La escala de las barras corresponde a 25 µm (40X) y 12 µm (100X). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. *C*, grupo control; *NR*, no respondedor.

La expresión de CCL11 se ubicó principalmente en las células epiteliales del grupo del modelo de asma y su expresión en el grupo de cobayos NR y en el grupo control fue escasa (Fig.17).

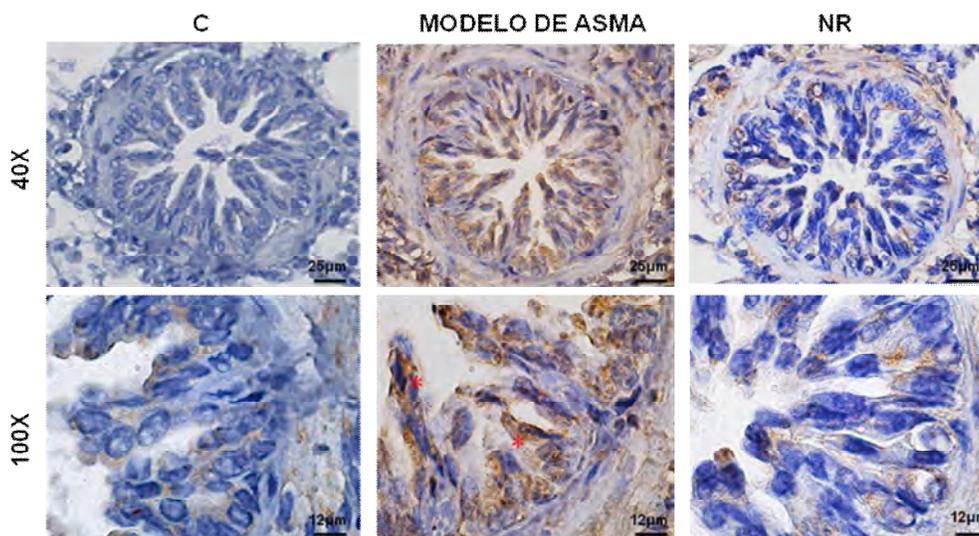


Figura 17. Microfotografías de secciones pulmonares donde se identificó la expresión de CCL11 en las VA mediante IHQ. La escala de las barras corresponde a 25 µm (40X) y 12 µm (100X). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. *C*, grupo control; *NR*, no respondedor.

La expresión de CXCL8 se identificó sobre el músculo liso y el epitelio sin grandes diferencias entre el grupo del modelo de asma y el grupo de cobayos NR. El grupo control no mostró inmunotinción (Fig.18).

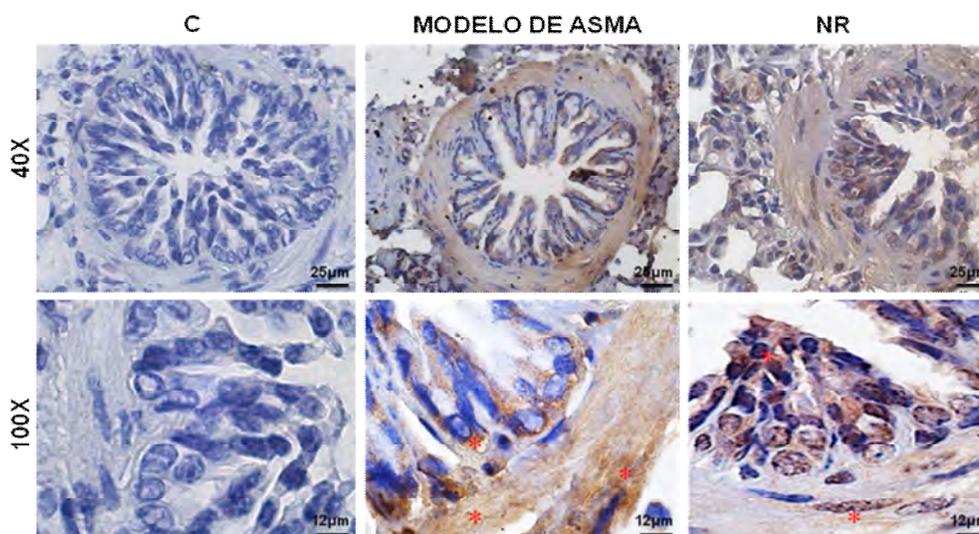


Figura 18. Microfotografías de secciones pulmonares donde se identificó la expresión de CXCL8 en las VA mediante IHQ. La escala de las barras corresponde a 25 μm (40X) y 12 μm (100X). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. C, grupo control; NR, no respondedor.

7.5 Relación entre los niveles de quimiocinas y el número de células inflamatorias de LBA

En la tabla 1 se muestran los coeficientes de correlación entre los niveles de quimiocinas en el LBA y en el homogenado pulmonar, y el número de células inflamatorias infiltradas en el LBA.

Los niveles de CCL5 en el pulmón se asociaron de manera positiva y estadísticamente significativa con el número de eosinófilos infiltrados en el LBA ($P < 0.001$, $n = 18$). La correlación positiva indica que a mayor cantidad de CCL5 mayor número de eosinófilos. Mientras que los niveles de CCL3 en el pulmón se correlacionaron positiva y significativamente ($P < 0.01$, $n = 18$) con el número de linfocitos infiltrados en el LBA. No se encontró ninguna relación entre los niveles de las quimiocinas CCL11 y CXCL8 y el número de células inflamatorias en el LBA.

	LBA				PULMÓN			
	CCL3	CCL5	CCL11	CXCL8	CCL3	CCL5	CCL11	CXCL8
Células totales	-0.060	0.111	0.290	0.139	0.040	0.278	-0.003	0.267
Macrófagos	0.505	-0.291	0.087	-0.114	0.085	-0.207	-0.137	-0.101
Neutrófilos	-0.044	-0.280	0.313	0.121	0.365	0.429	-0.206	0.423
Eosinófilos	-0.211	0.307	-0.376	-0.072	-0.321	0.505†	-0.341	-0.106
Linfocitos	0.005	0.165	-0.165	0.098	0.561**	-0.005	0.229	0.320

Tabla 1. Coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de quimiocinas y el número de células inflamatorias en el LBA. ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$. Prueba de t de Student.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron dos grupos de cobayos, el grupo del modelo de asma que siempre mostró una respuesta bronco-obstructiva después del reto con OVA y el grupo de cobayos no respondedores (NR) que no mostró dicha respuesta después del reto. La respuesta bronco-obstructiva es la alteración funcional básica durante el asma y ocurre después de la exposición al alérgeno debido a la liberación de mediadores proinflamatorios (Galli S., 2008; GINA, 2009; Vargas M., 2009b). Estos mediadores son liberados principalmente por las células inflamatorias infiltradas en las VA, lo que contribuye a la bronco-obstrucción (Galli S., 2008). Probablemente las células inflamatorias no están siendo reclutadas hacia las VA de los cobayos NR, lo que puede contribuir a la ausencia de respuesta bronco-obstructiva. Adicionalmente, se ha descrito que algunos sujetos atópicos presentan una respuesta bronco-obstructiva solo cuando son expuestos a grandes dosis de alérgeno (Álvarez P., 2001; Cockcroft D., 2006). Es probable que en los cobayos NR tanto la dosis como el tiempo de exposición al alérgeno no sean suficientes para inducir una respuesta bronco-obstructiva.

Una característica que observamos en este estudio fue que los cobayos NR desarrollaron hiperreactividad de las VA al igual que el grupo del modelo de asma. En el asma la hiperreactividad se manifiesta mediante crisis recurrentes de síntomas respiratorios que están asociados con la obstrucción del flujo de aire (Ying S., 2009; GINA, 2009). La obstrucción del flujo de aire se asocia con el reclutamiento de células inflamatorias, como los eosinófilos (Haldar P., 2009), mientras que la hiperreactividad se regula principalmente por alteraciones en la estructura de las VA (Kariyawasam H., 2007; Busse W., 2010). Sin embargo, los mediadores provenientes de células estructurales y otras células inflamatorias, como células cebadas y neutrófilos, son importantes para desarrollar hiperreactividad de las VA (Blease K., 2001; Nagarkar D., 2009; Sawaguchi M., 2012). Probablemente, en ambos grupos de cobayos el desarrollo de hiperreactividad es independiente del infiltrado de eosinófilos y está regulado por

la interacción entre células estructurales de las VA y células inflamatorias como las células cebadas y los neutrófilos.

En estudios previos se ha observado que los cobayos del modelo de asma incrementan de manera inmediata al reto con OVA el número de células inflamatorias infiltradas en el LBA en comparación con el grupo de cobayos NR y el grupo control (Ramos-R., *manuscrito en preparación*). Se ha descrito que las células inflamatorias se incrementan en las VA después del reto con el alérgeno (Taube C., 2003). Para observar si existe un cambio temporal en el componente inflamatorio entre los grupos de cobayos, en este estudio realizamos el conteo celular total y diferencial 24 horas después del reto con OVA. Observamos que ocurre un aumento en el número de células inflamatorias totales y eosinófilos infiltrados en el LBA del grupo de cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo de cobayos NR y el grupo control. En otro modelo de inflamación alérgica en cobayos se ha descrito que el número de eosinófilos permanece elevado 24 horas después del reto con el alérgeno (Humbles A., 1997). Este dato es consistente con lo que ocurre en el grupo del modelo de asma de nuestro estudio y nos sugiere que la eosinofilia es una característica importante en el modelo. Ramos-R. observó que de manera inmediata al reto con OVA se incrementa el número de neutrófilos en el LBA del modelo de asma. Se sabe que tras la exposición al alérgeno ocurre un incremento transitorio de neutrófilos en las VA (Tomkinson A., 2001; Taube C., 2003). En este estudio observamos que 24 horas después del reto el número de neutrófilos disminuye en el grupo de cobayos del modelo de asma, mientras que se incrementa en el grupo de cobayos NR. Esto sugiere que 24 horas después del reto con OVA se desarrolla una respuesta que involucra el reclutamiento selectivo de neutrófilos hacia las VA en el grupo de cobayos NR. Probablemente este aumento en el número de neutrófilos contribuye al desarrollo de la hiperreactividad ya que estas células secretan mediadores como TNF- α y leucotrieno B₄ que inducen la hiperreactividad de las VA (Fujimura M., 1988; Anticevich S., 1996; Nagarkar D., 2009).

La inflamación alérgica es un proceso que depende tanto de células estructurales como del reclutamiento y acumulación de las células inflamatorias en las VA (Halwani R., 2011; Pease J., 2011). Las células reclutadas hacia las VA liberan diferentes mediadores que contribuyen al daño en el tejido y a la bronco-obstrucción (Williams TJ., 2004). El reclutamiento selectivo de las células inflamatorias depende de mediadores como las quimiocinas. Las quimiocinas controlan el reclutamiento, el mantenimiento y la activación de las células inflamatorias, las cuales son reclutadas hacia las VA siguiendo gradientes de concentración de quimiocinas después de la exposición al alérgeno (Olson T. and Ley K., 2002; Pease J., 2011). Las diferencias en el componente inflamatorio entre ambos grupos de cobayos probablemente dependen de los niveles de quimiocinas. En este trabajo se detectaron los niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL11 y CXCL8 en LBA y en homogenado pulmonar de cobayos expuestos a OVA y de cobayos control, y se correlacionaron con el número de células inflamatorias infiltradas obtenidas del LBA.

CCL3 se incrementó en el LBA y en el homogenado pulmonar del grupo del modelo de asma, mientras que en el grupo de cobayos NR y el grupo control los niveles de la quimiocina no se detectaron. Se ha descrito que en pacientes con asma los niveles de CCL3 aumentan después de la exposición al alérgeno (Phillips R., 2003); mientras que en un modelo de inflamación alérgica en ratones el bloqueo de CCL3 induce la reducción de la eosinofilia (Campbell E., 1998). Adicionalmente CCL3 regula la migración de células cebadas y basófilos, que al secretar histamina inducen directamente la contracción del músculo liso de las VA, lo que contribuye con la bronco-obstrucción (Miyazaki, 2005). Probablemente en el grupo del modelo de asma, CCL3 promueve el reclutamiento de estas células inflamatorias induciendo así la respuesta bronco-obstrucciona a través de sus mediadores. En las secciones histológicas de pulmón del grupo de cobayos del modelo de asma CCL3 se observó en las células estructurales de las VA y en las células inflamatorias infiltradas. Algunos estudios han reportado que durante el asma las células estructurales, como el músculo liso, los fibroblastos y el epitelio,

son una fuente importante de CCL3 (Palmqvist C., 2007; Joubert P., 2008). En el grupo de cobayos del modelo de asma, analizado en este estudio, la producción de CCL3 por las células estructurales podría contribuir a reclutar y activar a las células inflamatorias portadoras de los receptores de CCL3. Adicionalmente, las células inflamatorias infiltradas también podrían ser una fuente de CCL3 y actuar de manera autocrina. El número de linfocitos infiltrados en el LBA se correlacionó de manera positiva con los niveles de CCL3 en el pulmón. Esta correlación indica que a medida que aumenta CCL3 en el pulmón aumenta el número de linfocitos en el LBA. Se ha descrito que subpoblaciones de linfocitos secretan diferencialmente quimiocinas como CCL3, CCL5 y XCL1 durante la inflamación (Domer B., 2003). Es probable que en nuestro grupo del modelo de asma los linfocitos sean las células que secreten CCL3 para mantener el estado inflamatorio.

Los niveles de CCL5 se incrementaron en el grupo de cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo control y el grupo de cobayos NR. En pacientes con asma se ha observado un incremento en los niveles de CCL5 (Robroeks C., 2010; Zietkowski Z., 2011) así mismo, en modelos murinos el mRNA de CCL5 se incrementa en el pulmón después del reto con el alérgeno (García-R., 2002). El incremento de CCL5 en el grupo de cobayos del modelo de asma probablemente induce la activación de células inflamatorias, como eosinófilos y linfocitos, que al ser activadas podrían liberar mediadores proinflamatorios que contribuyen a la respuesta bronco-obstructiva. En las secciones histológicas de pulmón se identificó la quimiocina CCL5 en el infiltrado celular peribronquial del grupo del modelo de asma. Se sabe que durante la inflamación alérgica CCL5 es secretada por células estructurales y por células infiltradas atrayendo y activando eosinófilos (Lukacs N., 1999; Bates M., 2010). En el grupo de cobayos del modelo de asma las células inflamatorias infiltradas podrían ser una fuente importante de CCL5. Los niveles de CCL5 en el pulmón se correlacionaron de manera positiva y significativa con el número de eosinófilos. En modelos murinos de inflamación alérgica se ha descrito que el reclutamiento de

eosinófilos es dependiente de CCL5, CCL3 y CCL11 (Campbell E., 1998, 1999; Koya T., 2006). Esta asociación sugiere que los niveles de CCL5 en el pulmón podrían estar directamente relacionados con el reclutamiento de los eosinófilos hacia las VA 24 horas después del reto con OVA.

Por otra parte los niveles de CCL11 también se incrementaron en el grupo de cobayos del modelo de asma en comparación con el grupo NR y el grupo control. Se ha descrito que en pacientes asmáticos ocurre un incremento de CCL11 que induce el reclutamiento y activación de eosinófilos en las VA (Lamkhioued B., 1997; Zietkowski Z., 2010). Probablemente CCL11 en el LBA del grupo del modelo de asma está participando en el reclutamiento y activación de los eosinófilos lo que podría contribuir con el desarrollo de la respuesta bronco-obstructiva. Los niveles de CCL11 aumentaron en el homogenado pulmonar del grupo de cobayos NR en comparación con el grupo control. CCR3 es uno de los receptores para CCL11 que se expresa en el músculo liso de las VA durante el asma (Joubert P., 2008; Saunders R., 2008). El músculo liso es un elemento importante en el desarrollo de la hiperreactividad de las VA (Ozier A., 2011). Así mismo, la neutralización de CCL11 disminuye la hiperreactividad en un modelo murino de inflamación de las VA (Campbell E., 1998). Estas evidencias nos sugieren que el incremento de CCL11 en el grupo de cobayos NR y en el grupo del modelo de asma podría contribuir a la presencia de hiperreactividad en las VA. CCL11 se identificó en las células epiteliales del grupo de cobayos del modelo de asma y de manera escasa sobre las células epiteliales del grupo de cobayos NR y del grupo control. Se ha descrito que CCL11 se expresa de manera constitutiva en pulmón del cobayo pero su expresión se incrementa durante la inflamación alérgica (Rothenberg M., 1995; Conroy D., 1999). Adicionalmente, las células epiteliales y otros tipos celulares como macrófagos, células endoteliales y el músculo liso producen CCL11 después de la exposición al alérgeno (Conroy D., 1999; Palmqvist C., 2007). Es posible que las células epiteliales sean la fuente principal de CCL11 en el pulmón del grupo del modelo de asma y del grupo de cobayos NR. CCL11 es una quimiocina que atrae específicamente eosinófilos en

condiciones de inflamación alérgica (Lukacs N., 1999; Conroy D., 1999). Sin embargo, CCL11 en este estudio no se correlacionó con ningún tipo de célula inflamatoria. Se ha descrito que CCL11 disminuye en las VA de cobayos 24 horas después del reto con el alérgeno, mientras que los eosinófilos se mantienen en aumento (Humbles A., 1997), por lo que a las 24 horas no se identifica una asociación positiva. Por otro lado CCL11 secretada en el pulmón podría atraer eosinófilos desde los vasos sanguíneos hacia el pulmón 24 horas después del reto con el alérgeno. Los eosinófilos en el grupo de cobayos del modelo de asma se mantienen elevados 24 horas después del reto con OVA. Se ha descrito que existe sinergismo entre CCL11 e IL-5 para aumentar y mantener el reclutamiento de eosinófilos hacia las VA (Gouwy M., 2005). Probablemente este sinergismo también ocurre en nuestro grupo del modelo de asma, además es posible que en el grupo del modelo de asma otras quimiocinas estén reclutando eosinófilos hacia las VA 24 horas después del reto con OVA.

CXCL8 se ha caracterizado por ser el principal quimioatrayente y activador de neutrófilos (Mukaida N., 2000). En nuestro estudio los niveles de CXCL8 aumentaron de manera significativa en los cobayos del modelo de asma, sin embargo este grupo no mostró un aumento significativo en el número de neutrófilos. Se ha descrito que tras el reto antigénico ocurre un incremento transitorio de neutrófilos en las VA (Taube C., 2003; Tomkinson A., 2001). Por lo que a las 24 horas después del reto con OVA el número de neutrófilos disminuye en el grupo de cobayos del modelo de asma. Adicionalmente se ha reportado que CXCL8 induce bronco-obstrucción en cobayos (Fujimura M., 1999) y que esta quimiocina también es capaz de atraer eosinófilos (Shute J., 1994). Es probable que el incremento de CXCL8 en el grupo de cobayos del modelo de asma pueda contribuir con el desarrollo de la respuesta bronco-obstructiva. CXCL8 se expresó sobre las células estructurales del grupo del modelo de asma y en el grupo de cobayos NR. Se ha descrito que las células epiteliales y el músculo liso de las VA de pacientes asmáticos son una fuente importante de CXCL8 (Joubert P., 2008; John A., 2009). Durante el asma la unión de CXCL8 a su receptor sobre células

del músculo liso de las VA incrementa la movilización de calcio intracelular induciendo la contracción del músculo liso (Saunders R., 2009). Adicionalmente se ha descrito que la administración de CXCL8 en cobayos causa hiperreactividad de las VA y acumulación de neutrófilos (Fujimura M., 1998). Es posible que CXCL8 proveniente de las células estructurales de las VA del grupo de cobayos del modelo de asma y del grupo de cobayos NR este contribuya con el desarrollo de la hiperreactividad de las VA. Finalmente, los niveles CXCL8 no se correlacionaron con el número de células inflamatorias infiltradas en el LBA 24 horas después del reto con OVA.

Nuestros datos siguieron que los bajos niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5 y CXCL8 en el grupo de cobayos NR probablemente contribuyen con la disminución del número de células inflamatorias infiltradas en el LBA. La disminución de células inflamatorias, y por lo tanto la disminución de mediadores proinflamatorios secretados por estas células, podría contribuir con la ausencia de la respuesta bronco-obstructiva en el grupo de cobayos NR.

9. CONCLUSIONES

- La disminución de las células inflamatorias totales en el LBA del grupo de cobayos NR probablemente se debe a los bajos niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5 y CXCL8, esta disminución en el número de células inflamatorias podría contribuir a la ausencia de respuesta bronco-obstructiva.
- 24 horas después del reto con OVA los eosinófilos infiltrados en el LBA permanecen incrementados en el grupo de cobayos del modelo de asma, mientras que en el grupo de cobayos NR ocurre un reclutamiento de neutrófilos.
- El número de eosinófilos infiltrados en el LBA 24 horas después del reto con OVA probablemente se asocia con el incremento de CCL5 en el grupo de cobayos del modelo de asma.
- La quimiocina CXCL8 no se asoció con el incremento en el número de neutrófilos infiltrados en el LBA del grupo de cobayos NR.
- La quimiocina CCL11 no se asoció con el número de eosinófilos infiltrados en el LBA del grupo de cobayos del modelo de asma 24 horas después del reto con OVA.

10. REFERENCIAS

1. Allen S., Crown S., Handel T. 2007. **Chemokine receptor structure, interactions and antagonism.** *Annu Rev. Immunol.* 25: 787:820.
2. Alvarez P., Olaguibel-R., Urbiola-M., Gracia E., Tabar-P. 2001. **Determinants of allergen-induced late bronchial responses in mild asthmatics.** *Chest*; 119; 120-127.
3. Anticevich S., Hughes J., Black J. and Armour C. 1996. **Induction of hyperresponsiveness in human airway tissue by neutrophils--mechanism of action.** *Clin Exp Allergy.* 26(5): 154-237.
4. Appay, V., and S. L. Rowland-Jones. 2001. **RANTES: A versatile and controversial chemokine.** *Trends Immunol.* 22: 83–87.
5. Bates M., Sedgwick J., Zhu Y. Et al. 2010. **Human airway eosinophils respond to chemoattractants with enhanced edn release, adherence to fibronectin and activation of the ras/erk pathway than blood eosinophils.** *J Immunol.* 184(12): 7125–7133.
6. Bazán P. B., Vargas M., Sánchez G., Chávez J, Montaña L. 2004. **Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmographi: role of catecholamine and nitric oxide.** *Exp Physiol.* 89:623-628.
7. Bazán-P. B., E. Sánchez-G., Vargas M. H., Martínez-C. E., Ramos-R. P., Álvarez-S. M., Hiriart G., Gaxiola M., Hernández-P. 2009. **β 1-integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways.** *Clinical & Experimental Allergy.* 39: 740–751.
8. Blease K., Lukacs N., Hogaboam C., Kunkel S. 2001. **Chemokines and their role in airway hyper-reactivity.** *Respir Res*; 1:54-61.
9. Bousquet J., Jeffery P. K., Busse W., Malcolm J. and Vignola A. M. 2000. **From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling.** *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1720–1745.
10. Brühl H. et al. 2001. **Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases.** *Clin Exp Immunol.* 126:551-559.
11. Burrows S., Doyle M., Murphy K., Franklin S., White J., Brooks I, McNulty DE, Scott MO, Knutson JR, Porter D, Young PR, and Hensley P. 1994. **Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations.** *Biochemistry.* 33: 12741–12745.
12. Busse W. MD. 2010. **The Relationship of airway hyperresponsiveness and airway Inflammation.** *Chest*; 138 (2) (Suppl): 4S–10S.
13. Campbell E., Kunkel S.L, Strieter R.M., Lukacs N.W. 1998. **Temporal role of chemokines in a murine model of cockroach allergeninduced airway hyperreactivity and eosinophilia.** *J Immunol*; 161: 7047–7053.
14. Campos G., Toxqui E., Tortoriello J., Oropeza M.V, Ponce H., Vargas M.H, Montaña L.M. 2001. **Galphimia glauca organic fraction antagonizes LTD4-induced contraction in guinea pig airways.** *Ethnofarmacol.* 74:7-15.
15. Chung C., Cooke R., Proudfoot A., Wells T. 1995. **The three-dimensional**

- solution structure of RANTES.** *Biochemistry.* 34(29):9307–14.
16. Cockcroft D. and Davis E. 2006. **Mechanisms of airway of hyperresponsiveness.** *J Allergy Clin Immunol.* 118 (3): 551-558.
 17. Cockcroft D., Davis B. 2006. **Airway hyperresponsiveness as a determinant of the early asthmatic response to inhaled allergen.** *J Asthma.* 43(3): 175-8.
 18. Comerford I. and McColl S. 2011. **Mini-review series: focus on chemokines.** *Immunology and Cell Biology.* 89:183–184.
 19. Conroy D. M. and Williams T. J. 2001. **Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung.** *Respir Res.* 2:150–156.
 20. Conroy D., 1999. **Eotaxin in disease.** En: *Chemokine in Disease: Biology and Clinical Research.* Hébert C., Hunana Press Inc., Totowa, NJ.
 21. Covell D.G., Smythers G.W, et al .1994. **Analysis of hydrophobicity in the alpha and beta chemokine families and its relevance to dimerization.** *Protein Science* 3: 2064-72.
 22. Dery, R. E., and Bissonnette, E. Y. 1999. **IFN-gamma potentiates the release of TNF-alpha and MIP-1alpha by alveolar macrophages during allergic reactions.** *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20, 407-412.
 23. Des J.T, Balderrama E. F. 1993. **Enfermedades respiratorias, manifestaciones clínicas,** ed. El manual moderno, 453 pág.
 24. Domer BG, Steinbach S, et al, 2003. **Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry.** *J Immunol Methods.*1;274(1-2):83-91.
 25. Fernández V. M, Galindo J. Hernández S.J. *Asma.* En: Cano Valle F. **Enfermedades del aparato respiratorio.** 1° ed. Editores Mendez. 2008. 185-208.
 26. Folkard S., Westwick J., Millar A. 1997. **Production of interleukin-8, RANTES and MCP-1 in intrinsic and extrinsic asthmatics.** *Eur Respir J;* 10:2097–2104.
 27. Fujimura M., Myou S., Nomura M., Mizuguchi M., et al. 1999. **Interleukin-8 inhalation directly provokes bronchoconstriction in guinea pigs.** *Allergy.* 54(4):386-91.
 28. Fujimura M., Xiu Q., Tsujiura M., et al. 1998. **Role of leukotriene B4 in bronchial hyperresponsiveness induced by interleukin-8.** *Eur Respir J.* 11: 306–311.
 29. Galli S. J., Tsai M. & Piliponsky A. **The development of allergic inflammation.** *Nature* 2008; 454: 445-455.
 30. García-R., Marques T., Prasts N. et al. 2002. **Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation.** *J. Immunol.* 169(11): 6467-6473.
 31. García-Zepeda EA, Rothenberg ME, Weremowicz S, et al. 1997. **Genomic organization, complete sequence, and chromosomal location of the gene for human eotaxin (SCYA11), an eosinophil-specific CC chemokine.** *Genomics.*1; 41(3):471-6.
 32. Geneser F. 2000. **Histología.** 3°ed. Ed. Medica Panamericana.

33. Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J. 2006. **Immunology**. 6° ed. Ed. Macmillan Higher Education.
34. Gouwy M., Struyf S., Proost P. and Van Damme J. 2005. **Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response**. Cytokine Growth Factor Rev. 16 (6): 561-80.
35. Graham L.M. 2006. **Classifying Asthma** Chest. 130:13S–20S.
36. Griffiths-J., Collins, P., Rossi, A., et.al. 1993. **The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro, and causes their accumulation into the lung in vivo**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 197.1167-1172.
37. Haldar P., Brightling C., Hargadon B., et al. 2009. **Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma**. N Engl J Med. 360 (10): 973-984.
38. Halwani R., et al. 2011. **CC and CXC chemokines induce airway smooth muscle proliferation and survival**. J Immunol. 186 (7): 4156-63.
39. Hamelmann E., Schwarze J. Takeda K. et al. 1997. **Noninvasive measurement airway responsiveness in allergic using barometric plethysmography**. Am J Respr Crit Care Med. 156: 766-775.
40. Hohki G., 1997. Terada N., Hamano N. et al. 1997. **The effects of eotaxin on the surface adhesion molecules of endothelial cell and on eosinophil adhesion to microvascular endothelial cell**. Biophys. Res. Commun. 241: 136.141.
41. Humbert M., Menz G., Ying S., Corrigan C.J., Robinson D.S, Durham S.R, Kay A.B. 1999. **The immunopatology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non- atopic) asthma: more similarities than differences**. Immunol Today. 20: 528-533.
42. Humbles A., Conroy M., Marleau S. 1997. **Kinetics of Eotaxin Generation and Its Relationship to Eosinophil Accumulation in Allergic Airways Disease: Analysis in a Guinea Pig Model in Vivo**. J. Exp. Med. 186 (4): 601–612.
43. Informe anual de labores INER, 2010. Página electrónica: http://www.iner.gob.mx/archivos/informe_labores/2010.pdf
44. Jaramillo F. 2000. **Estructura del aparato respiratorio**. En: Jairo Roa, Mar y Bermúdez. Neumología. Serie interamericana de medicina. Colombia. Ed. Mc Graw Hill.
45. John A.E., Zhu Y.M., Brightling C.E. 2009. **Human Airway Smooth Muscle Cells from Asthmatic Individuals Have CXCL8 Hypersecretion Due to Increased NF-B p65, C/EBP, and RNA Polymerase II Binding to the CXCL8 Promoter**. J Immunol. 183: 4682-4692.
46. Joubert P., Lajoie K., Welman M. et al. 2008. **Expression and regulation of CCR1 by airway smooth muscle cell in asthma**. The Journal of immunology. 180: 1268-1275.
47. Kariyawasam H., Aizen M., Barkans J., Robinson D. 2007. **Remodeling and Airway Hyperresponsiveness but Not Cellular Inflammation Persist after Allergen Challenge in Asthma**. Am J Respr Crit Care Med. 175: 896–904.

48. Kim Y. H., DeKruyff & Umetsu D. T. 2010. **The many Paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity.** *Nature immunology.* 11:577-583.
49. King C. and Moores L. 2008. [Clinical Asthma Syndromes and Important Asthma Mimics. *Respir Care.* 53 \(5\):568 –580.](#)
50. Koya, T., et al. 2006. **RANTES (CCL5) regulates airway responsiveness after repeated allergen challenge.** *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2(35):147-154.
51. Lamkhioed B., Renzi P., Abi-Younes S., Garcia-Z. et al. 1997. **Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation.** *J Immunol.* 159(9):4593-601.
52. Ley K., Laudanna C., Cybulsky MI., and Nourshargh S. 2007. **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.** *Nature;* 7: 678-689.
53. Lukacs N. 2001. **Role of chemokines in the pathogenesis of asthma.** *Nat Rev Immunol.* 1(2):108-116.
54. Lukacs N., Oliveira S. H., and Hogaboam C. M. 1999. **Chemokines and asthma: Redundancy of function or a coordinated effort?** *The Journal of Clinical Investigation.* 104: 985-993.
55. Lukacs N., Standiford TJ. et al. 1996. **C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation.** *J Leukoc Biol.* 60(5):573-8.
56. Luster A. D. 1998. **Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation.** *The New England Journal of Medicine.* 7 (388): 436- 445.
57. Miyazaki, D., Nakamura, T., Toda, M., Cheung-Chau, K.W., Richardson, R.M., Ono, S.J., 2005. **Macrophage inflammatory protein-1 α as a costimulatory signal for mast cell-mediated immediate hypersensitivity reactions.** *The Journal of Clinical Investigation.* 115: 434–442.
58. Moreno-A. P. 2010. **Aerosolized polymerized type I collagen reduces airway inflammation and remodelling in a guinea pig model of allergic asthma.** *Lung.* 188(2):97-105.
59. Mukaida N., 2000. **Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation.** *Int J Hematol.* 72(4): 391-8
60. Mukaida, N. 2003. **Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284: L566–L577.
61. Murphy P., Baggiolini M., Charo I.F. et. al. 2000. **International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors.** *Pharmacological Reviews.* 1 (52): 145-176.
62. Nagarkar D. R., Wang Q., Shim J. 2009. **CXCR2 is required for neutrophilic airways inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of human rhinovirus infection.** *J Immunol.* 183(10): 6698–6707.
63. Nibbs R. J. B., Wylie S. M., Pragnell I. B., and Graham G. J. 1997. **Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6.**

- Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5.** *J. Biol. Chem.* 272: 12495-12504.
64. O'Byrne P. and Inman M. 2003. **Airway hyperresponsiveness.** *Chest.* 123; 411-416.
 65. Ochs M. and Weibel R. 2008. **Functional design of the human lung for gas change.** En: *Fishman's Pulmonary Diseases and disorders.* 4^{ed}. Ed. Mc Graw Hill.
 66. Olson T. and Ley K. 2002. **Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking.** *Am J Physiol Regulatory integrative Comp Physiol.* 283: R7-R28.
 67. Ozier A., Allard B., Bara I. Et al. 2011. **The Pivotal Role of Airway Smooth Muscle in Asthma Pathophysiology.** *Journal of Allergy.* Article ID 742710, 20 pages.
 68. Palmqvist C, Wardlaw AJ and Bradding P. 2007. **Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma.** *British Journal of Pharmacology.* 151: 725–736.
 69. Pease J. 2011. **Targeting chemokine receptors in allergic disease.** *Biochem. J.* 434: 11- 24.
 70. Phillips R.M., Stubbs V.E., Henson MR, Williams TJ, Pease J., Sabroe I. 2003. **Variations in eosinophil chemokine responses: an investigation of CCR1 and CCR3 function, expression in atopy, and identification of a functional CCR1 promoter.** *J Immunol.* 170: 6190–6201.
 71. Pober J. S. and Sessa William C. 2007. **Evolving functions of endothelial cells in inflammation.** *Nature reviews. Immunology.* 10 (7):803-15.
 72. Robroeks C., Rijkers G., Jöbsis Q. et al. 2010. **Increased cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in exhaled breath condensate of asthmatic children.** *Clin Exp Allergy.* 40(1):77-84.
 73. Rot A. and von Andrian U. 2004. **Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokines grammar for immune cells.** *Annu. Rev. Immunol.* 22:891–928.
 74. Rothenberg M., Luster A., Lilly C., Dranzen J., and Leder P. 1995. **Constitutive and allergen-induced of eotaxin mRNA in the guinea pig lung.** *J Exp Med.* 181: 1211-1216.
 75. Salas H., Fernández V., Almeida A.V. 2009. **Clasificación del asma.** *Neumología y cirugía de tórax.* Vol. 68(S2): S143-S148.
 76. Saunders R., Sutcliffe D., Kaur S. et al. 2009. **Airway smooth muscle chemokine receptor expression and function in asthma.** *Clinical & Experimental Allergy.* 39: 1684-1692.
 77. Saunders R., Sutcliffe R., Berger P. et al. 2008. **Airway smooth muscle CCR3/CCL11 axis is inhibited by mast cell.** *Allergy.* 63: 1148.1155.
 78. Sawaguchi M., Tanaka S., Nakatani Y. et al. 2012. **Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness.** *J Immunol.* 188(4):1809-18.
 79. Schall T. J., Jongstra B., J. Dyer J., Jorgensen C., Clayberger M., Davis and A. Krensky. 1988. **A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family.** *J. Immunol.* 141: 1018–1025.

80. Schuh, J., Kate B., Steven L. and Cory M. Hogaboam. 2002. **Eotaxin/CCL11 is involved in acute, but not chronic, allergic airway responses to *Aspergillus fumigatus*.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283: L198–L204.
81. Sherry B and Franchin G. 2000. **Mip-1 α , Mip-1 β .** *Structure*, 78: 1171-1213.
82. Shin S., Takeda K., Gelfand E., et al. 2009. **Understanding asthma using animal models.** *Allergy Asthma Immunol Res.* 1(1):10-18.
83. Shute J., 1994. **Interleukin-8 is a potent eosinophil chemoattractant.** *Clin. Exp. Allergy.* 24:203–206.
84. Sommer B., Vargas M.H, Chavez J., Carbajal V., Segura P., Montaña L. 2001. **Differences between inhaled and intravenous bronchial challenge to detect O3- induced hyperresponsiveness.** *J Appl. Physiol.* 91: 2595-2601.
85. Strieter R. M., Belperio J. A. and Keane M. P. 2002. **CXC Chemokines in Angiogenesis Related to Pulmonary Fibrosis.** *Chest.* 122: 298S-301S.
86. Taube C., et al. 2003. **Allergen-Specific Early Neutrophil Infiltration After Allergen Challenge in a Murine Model.** *Chest.* 123: 410S–411S.
87. The Global Burden of Asthma Report. GINA 2009. Página electrónica: www.ginasthma.org
88. Tomkinson A., Cieslewicz G., Duez C., et al. 2001. **Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice.** *Am J Respir Crit Care Med.* 163: 721–730.
89. Vargas M. H. **Epidemiología del asma.** 2009 a. *Neumología y Cirugía de Tórax*; 68(S2):S91-S97.
90. Vargas M. H. **Patogenia del asma.** 2005. En: *Asma. Enfoque integral para Latinoamérica.* México: Mac Graw-Hill Interamericana.
91. Vignola A., Constanzo G., Di Giorgi R. et al. 2003. **Airway remodeling in asthma.** *Ches.* 123: 417S- 422S.
92. West J., 2005. **Fisiología Respiratoria.** 7^{ed}. Argentina. Ed. Médica Panamericana.
93. White M. V., Yoshimura T., Hook W., Kaliner M. 1989. **Neutrophil attractant/activation protein (NAP-1) causes human basophil histamine release.** *Immunol Lett.* 22: 151.
94. Williams T J. **The eosinophil enigma.** *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 507–509.
95. Wolpe, S.D., and Cerami, A. 1989. **Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines.** *Faseb J.* 3: 2565-2573.
96. Ying S., Zhang G. et al. 2006. **How Much Do We Know about Atopic Asthma: Where Are We Now?** *Cellular & Molecular Immunology.* 3 (5):321-332.
97. Yoshimura T., Matsushima K., et al. 1987. **Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1).** *J Immunol.* 139(3):788-93.
98. Zietkowski Z., Tomasiak M., Sliepko R. et al. 2010. **Eotaxin-1 in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients.** *Respiratory*

Research. 11: 110.

99. Zietkowski Z., Skiepmo R., Tomasiak-L. M. et al. 2011. **RANTES in exhaled breath condensate of patients with severe persistent allergic asthma during omalizumab therapy.** *Int Arch Allergy Immunol.* 154(1): 25-32.
100. Zimmermann N., Hershey G.K., Foster P.S., Rothenberg M.E. 2003. **Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13.** *J Allergy Clin Immunol.* 227-242.
101. Zlotnik A. and Yoshie O. 2000. **Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity.** *Immunity.* 12: 121–127.