

Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias

**“Análisis del papel funcional de las células dendríticas CCR9+ en la regulación del proceso inflamatorio alérgico pulmonar”**

TESIS

*que para obtener el grado de*

*de Licenciatura en Biología*

PRESENTA

José Antonio García Espinoza

Asesor: Dr. Jorge Alberto Lugo de la Fuente

Asesor Externo: Dr. Eduardo Alberto García Zepeda<sup>+</sup>

Toluca, México 2017

Declaro que he llevado a cabo esta tesis de licenciatura sólo con las fuentes citadas, la literatura y otras fuentes profesionales.

Yo entiendo que mi trabajo se relaciona con los derechos y obligaciones por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). La Ley de Derecho de Autor, en su versión modificada, en particular, el hecho de que la Universidad del Estado de México tiene derecho a concluir un acuerdo de licencia sobre el uso de este trabajo como un trabajo escolar.

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL.



It is the pervading law of all things ... that the life is recognizable in its expression, that form ever follows function

*En memoria del Dr. Eduardo García Zepeda*

*Análisis del papel funcional de las células dendríticas CCR9+ en la regulación del proceso inflamatorio pulmonar*

Copyright ©  
Universidad Autónoma del estado de México (UAEMex).  
José Antonio García Espinoza  
Abril del 2017.

## **Agradecimientos Académicos**

Al Dr. Eduardo Alberto García Zepeda por dirección y apoyo en la discusión y diseño de mi tesis experimental. Por su compromiso como investigador, permitió el desarrollo de este manuscrito y la organización de la Tesis.

A la Dra. Cynthia Paola López Pacheco, por ser apoyo incondicional en el diseño experimental, la realización de los experimentos, la discusión crítica y su experiencia en el campo de la Inmunología Experimental cruciales para la terminación de esta Tesis.

A la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, por su tiempo y su apoyo, además de formar parte de mi formación científica debido a la discusión de artículos, que han enriquecido día a día la generación de nuevas ideas.

A la técnico académico Q.F.B Gisela Du Pont por la ayuda, asesoría y buenos comentarios para la realización de las técnicas y el desempeño en el laboratorio.

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

A la M. C. Juana Calderón Amador por su ayuda con el método de Inmunohistoquímica, por sus aportaciones en la discusión científica y sus excelentes comentarios para la realización de la tesis.

Al Dr. Leopoldo Flores Romo por haber proporcionado el anticuerpo DEC-205 para la realización del trabajo experimental.

Al Q.F.B Carlos Castellanos Barba por la capacitación y protocolos de citometría de flujo además de la excelente organización y cuidado de la unidad de citometría.

Al M. en C. Jacobo Martínez por la discusión científica y enseñanza del análisis de datos en la citometría de flujo, ya que sus sugerencias sirvieron para el enriquecimiento de la Tesis.

Al Dr. Jorge Alberto Lugo de la Fuente por sus aportaciones críticas y sus comentarios durante esta evaluación.

Al Dr. Arturo Venebra Muñoz como miembro del jurado de Examen, pues su revisión oportuna, su disposición fueron importantes para la elaboración de la Tesis.

A la M. en C. Roxana Olgún Alor por su ayuda con los métodos y protocolos para la generación de las células dendríticas derivadas de médula ósea.

Al Biol. Oscar Ovando Márquez por su apoyo en la realización de algunos de los experimentos.

## Agradecimientos Personales

Como en todas las empresas en las que nos embarcamos los seres humanos la realización de una tesis de Licenciatura es un camino imposible de recorrer sin el apoyo de otras personas. De las muchas que me han ayudado, deseo agradecer en primer lugar a mis directores, el Dr. Eduardo García Zepeda por confiar en mí y darme la extraordinaria oportunidad de trabajar en su laboratorio, a la Dra. Cynthia López Pacheco por sus valiosas enseñanzas, por toda la atención, el apoyo y la paciencia que me brindo para realizar este trabajo. Por cada momento juntos en los experimentos largos, en los cuales su compañía me hacía seguir adelante, por ser una persona muy dulce y escucharme en momentos difíciles y no negarme un abrazo cada vez que lo necesitaba muy valioso para mí, muchas gracias por compartir tus conocimientos conmigo.

También quisiera agradecer a Oscar Ovando quien con su compañía en los experimentos largos me dio mucho apoyo ya que su buen sentido del humor hacia agradable el experimento.

El trabajo que he realizado no hubiese sido posible sin la ayuda de mis sinodales por sus sugerencias y comentarios, especialmente al Dr. Jorge Lugo de la Fuente y Dr. Arturo Venebra Muñoz. Mi agradecimiento al Dr. Jorge Lugo de la Fuente por haberme inspirado durante mi carrera como Biólogo, y M. C. Cecilia Franco por su ayuda y asesoría, a la cual aprecio por demostrar el interés en sus alumnos.

Se agradece la colaboración y asesoría para el análisis histológico presentado a la Dr. Jorge Hernández Pando. Además quisiera agradecer especialmente a la M.C Juana Calderón por haberme enseñado el trabajo duro y bien realizado en el campo de la inmunología. Además de su valiosa ayuda en el escaneo de laminillas al Dr. Carlo Cortes Gonzales.

Muy en particular agradezco su apoyo y confianza a la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo por los momentos difíciles y su gran ejemplo de lucha. Pero por supuesto sin olvidar la asesoría del Dr. Leopoldo Flores Romo por sus enseñanzas en la ciencia.

A mis amigos de laboratorio que han sido un gran apoyo en todo momento, a parte de los buenos ratos que hemos pasado juntos: Cynthia, Scarlett, Jacobo, Oscar, Luis, Laura, Josué, Ismael, Anahí, Nara, Rafa y Alicia que brindaron su apoyo y aportaron conocimientos a mi trabajo y sobre todo por su "inmunoamistad". Además de las aportaciones del laboratorio hermano, gracias a Arimelek, Roxana, Erika, Marisol y Sandra.

A mis amigos del Lab del Dr. Flores: A Juanita Calderón, Raúl Maqueda, Mariana, Edith Marcial, Juan Carlos Yam, Noni, Felipe, Isis, Erick y Marlene por su ayuda y amistad.

A mis amigos de toda la vida en la Facultad, Minerva, Tania, Magyber, Macotella, Chucho, Desiree, Jesús Oyervides, Danna, Migue, Israel pulpo, Itzel, Liliana, Paco y otros más. Deseo, así mismo manifestar mi agradecimiento a mi Familia por su apoyo y consejo, parte importante de mi formación.

## Resumen

El asma es un trastorno inflamatorio crónico que se caracteriza por la obstrucción de las vías aéreas, hipersecreción de moco e infiltración de linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, células linfoides innatas, células plasmáticas y mastocitos en el pulmón. Las células dendríticas (DCs) son las principales mediadoras de la inflamación en enfermedades crónicas como las alergias. La infiltración de leucocitos inflamatorios hacia el pulmón es crítico para la regulación y progresión del asma. Las quimiocinas son pequeñas proteínas con capacidad quimioatrayente encargadas del tráfico leucocitario en tejidos linfoides y no linfoides. La interacción de los receptores con sus ligandos modula la migración y la localización de los leucocitos a los diferentes tejidos. La expresión del receptor de quimiocinas CCR9 como de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  se requiere para el reclutamiento de linfocitos al intestino. CCR9 es expresado en la mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (67%) y (54%) en los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, así como los linfocitos B y células dendríticas plasmacitoides. También el 2-4% de los linfocitos T circulantes en individuos sanos expresan CCR9. Además el único ligando para CCR9 conocido es CCL25/TECK, que se produce en intestino delgado, donde su expresión se localiza en el epitelio y de igual manera CCL25 se expresan en la corteza tímica, donde los progenitores de los timocitos expresan CCR9 por ende es importante para el desarrollo de timocitos en el timo y el reclutamiento de linfocitos a intestino delgado. Aunque la progresión de asma está asociada a la modulación de otros receptores de quimiocinas como CCR3, CCR4, CCR7, CCR8, CCR10 etc., en el caso de CCR9 y su ligando no se conoce a detalle su papel en la regulación de un proceso inflamatorio pulmonar. Por ello nuestro objetivo fue analizar la expresión de CCR9 en células dendríticas y su papel regulador durante un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.

Se han descrito varios modelos murinos diferentes para estudiar la patofisiología de la inflamación alérgica pulmonar. La sensibilización con OVA/Alum induce una reversible forma de asma en ratón y fue el modelo que se utilizó. Este modelo es caracterizado por una inflamación aguda en el pulmón y mimetiza la patología de asma en humano. El análisis demuestra que la expresión de CCR9 se induce en el pulmón en las primeras etapas de la inflamación (2 horas), después del reto con OVA. Lo que proponemos es que CCR9 es importante para el reclutamiento de células al pulmón en las primeras etapas de la inflamación. Se encontró que las DCs CD103<sup>+</sup>, DCs DEC-205<sup>+</sup> y linfocitos T CD4<sup>+</sup> disminuyen a las dos horas después del último reto en un ratón CCR9<sup>-/-</sup> y a las 6 horas después las poblaciones celulares permanecen en el pulmón, lo que sugiere que CCR9 tiene un papel importante en el reclutamiento hacia ganglios peribronquiales durante las primeras horas de la inflamación porque hay menor infiltrado y eosinófilos (SiglecF<sup>+</sup> CCR3<sup>+</sup>) en LBA a las 24 horas quizá por una falta de activación y migración de linfocitos T en los ganglios. Se corroboró con ensayos *in vitro* que demuestran una disminución en la expresión de proteínas de maduración de las BMDCs lo que sugiere que hay una alteración en la activación de las DCs, por tanto no migran las células que se encuentran en tejido a ganglios linfáticos como tampoco las que se encuentran en periferia para llegar al pulmón. En resumen las DCs CCR9<sup>+</sup> son importantes en la modulación del proceso inflamatorio durante las primeras etapas de la inflamación ya que se ve afectada su función de maduración y pudiera afectar la activación de linfocitos T y el reclutamiento de eosinófilos además de la inducción de T reg *in situ* a las 24 horas en un ratón CCR9<sup>-/-</sup>, lo cual sugiere que CCR9 contribuye a la regulación de la inflamación disminuyendo la exacerbación y frecuencia de episodios de un cuadro asmático desde etapas muy tempranas.

## *Índice general*

<b>Índice de figuras</b> .....	9
<b>Abreviaturas</b> .....	10
<b>Introducción</b> .....	11
<b>Células dendríticas</b> .....	12
Desarrollo de las células dendríticas.....	14
Clasificación de las células dendríticas.....	15
Maduración de las células dendríticas.....	19
Migración de DCs.....	21
Células dendríticas y tolerancia inmunológica.....	23
<b>Anatomía del pulmón</b> .....	23
Tejido linfoide asociado a mucosas.....	24
Componentes de la inmunidad pulmonar.....	25
Macrófagos.....	27
Interacciones entre células dendríticas y alérgenos.....	28
Desorden tipo T <sub>H</sub> 2 “Asma Eosinofílica”.....	30
<b>Asma</b> .....	
Epidemiología del asma.....	30
Clasificación del asma.....	31
Atópica.....	31
No Atópica.....	32
Patofisiología.....	32
Inflamación en vías aéreas.....	32
Hiperreactividad bronquial.....	33
Remodelación de las vías aéreas.....	33
Sobreproducción de moco.....	33
Daño epitelial.....	34
Efecto de la IgE en los mastocitos, basófilos, y células dendríticas.....	34
<b>Quimiocinas</b> .....	34
Receptores de quimiocinas.....	36
Señalización a través de receptores de quimiocinas.....	36
CCR9/CCL25.....	38
Quimiocinas asociadas a un proceso inflamatorio.....	39
<b>Planteamiento del Problema</b> .....	42
<b>Justificación</b> .....	42
<b>Hipótesis</b> .....	42
<b>Objetivo general y particulares</b> .....	42
<b>Materiales y Métodos</b> .....	43
<b>Resultados</b> .....	49
<b>Discusión</b> .....	65
<b>Conclusiones</b> .....	75
<b>Conclusión general</b> .....	75
<b>Perspectivas</b> .....	75
<b>Bibliografía</b> .....	77

## Índice de figuras

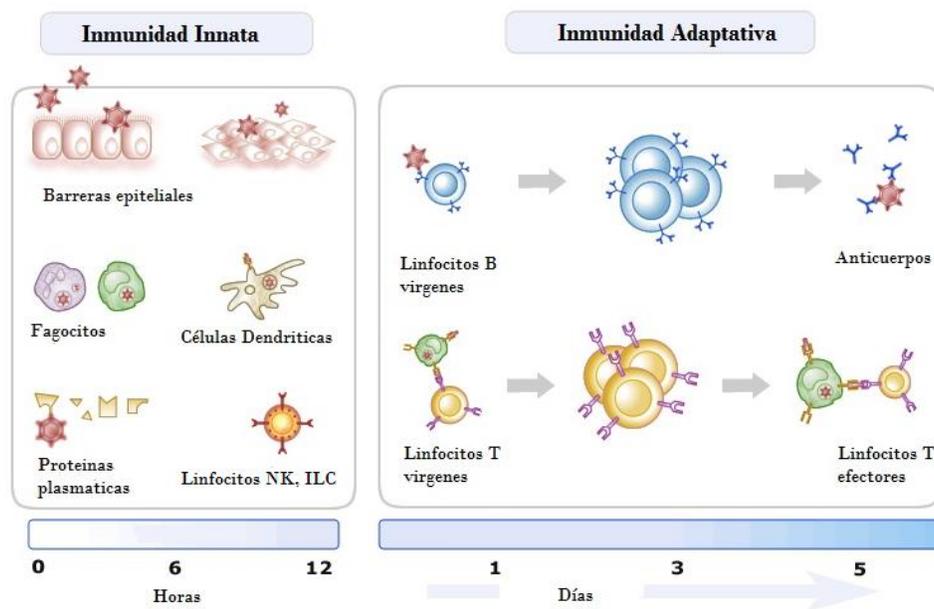
Figura	pagina
1. Inmunidad innata y adaptativa .....	11
2. Células Dendríticas .....	14
3. Regulación del desarrollo y la homeostasis de DCs en ratones .....	15
4. Clasificación de las células dendríticas (DCs) .....	17
5. Diferentes subconjuntos de células dendríticas (DCs) presentes en los pulmones de los ratones .....	19
6. Maduración de las células dendríticas (DCs) .....	20
7. Desarrollo y migración de linajes de fagocitos mononucleares en un estado basal .....	22
8. El sistema respiratorio juega el papel esencial en el suministro de oxígeno al cuerpo .....	24
9. Estructura de un ganglio linfático .....	25
10. Captura de antígenos y patrón de migración para la inducción inmunológica en los pulmones .....	27
11. Interacciones de las células dendríticas y células epiteliales durante la sensibilización y fase de reto en un modelo experimental de asma .....	29
12. Estructura de las Quimiocinas .....	35
13. Activación del Receptor de quimiocinas .....	36
14. Señalización a través de un receptor de quimiocinas .....	37
15. Programa de amplificación de ADN por PCR ... ..	43
16. Protocolo de asma alérgica .....	44
17. Resumen de la estrategia experimental del análisis <i>in vivo</i> .....	48
18. Caracterización morfológica de un Lavado BroncoAlveolar (LBA) .....	50
19. Dinámica temporal de células típicas de un Lavado BroncoAlveolar (LBA) en ratones inmunizados .....	50
20. Cinética de reclutamiento de las poblaciones celulares en LBA en Porcentaje y Números totales .....	51
21. CCR9 no es esencial para la producción de IgE .....	52
22. CCR9 es importante para el reclutamiento tardío de células inmunes .....	54
23. CCR9 no afecta la síntesis de moco .....	55
24. Localización espacial de las células dendríticas DEC-205+.....	56
25. CCR9 afecta a las células dendríticas DEC-205+ <i>in situ</i> en las primeras etapas de la inflamación .....	57
26. Reclutamiento de los principales tipos de células de un Lavado broncoalveolar (LBA) en ratones sensibilizados utilizando citometría de flujo .....	58
27. CCR9 es esencial en las primeras etapas de la inflamación para el reclutamiento de células dendríticas .....	59
28. CCR9 afecta la activación de las células dendríticas <i>in vivo</i> .....	60
29. La maduración de BMDCs con LPS induce una alteración en la activación en ausencia de CCR9 <i>in vitro</i> .....	61
30. CCR9 es importante para el reclutamiento de linfocitos T CD4+ en la fase temprana y tardía para linfocitos T reg en la inflamación alérgico pulmonar <i>in vivo</i> .....	63
31. CCR9 es importante para el reclutamiento de eosinófilos en la fase tardía de inflamación alérgica pulmonar <i>in vivo</i> .....	64

## *Abreviaturas*

<b>Ag</b>	Antígeno
<b>Alum</b>	Emulsión de hidróxido de aluminio y magnesio en proporción (1:1)
<b>APC</b>	Célula presentadoras de antígeno
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CC</b>	Quimiocina con 2 cisteínas consecutivas en su secuencia
<b>CCL</b>	Ligando para quimiocinas CC
<b>cDNA</b>	Acido desoxirribonucleico complementario
<b>CHO</b>	Células Ováricas de hámster chino
<b>CTL</b>	Linfocitos T citotóxico
<b>CXCL</b>	Ligando para quimiocinas CXC
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra acético
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
<b>FACS</b>	Clasificación de células activadas por fluorescencia
<b>Fc</b>	Fragmento cristalizante de inmunoglobulina
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de crecimiento de colonias de granulocito-macrófago
<b>HE</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>HEV</b>	Vénulas de endotelio alto
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>LBA</b>	Lavados Broncoalveolares
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MALT</b>	Tejido linfoide asociado a mucosas
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>M</b>	Medula
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>MLN</b>	Ganglio linfático mesentérico
<b>OVA</b>	Proteína ovoalbúmina
<b>PAS</b>	Ácido peryodico de Schiff
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>Pc</b>	Paracorteza
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de Patrones
<b>SAV</b>	Estreptavidina
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAE</b>	Solución de Tris-Acetato-EDTA
<b>TCR</b>	Receptor de linfocito T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión a la célula vascular

## Introducción

El sistema inmunológico de los vertebrados está compuesto por el sistema inmune innato, la primera línea de defensa del cuerpo contra patógenos, y el sistema inmune adaptativo (**Figura 1**) caracterizado por su especificidad clonal y memoria para antígenos particulares (Talbo *et al.*, 2016).



**Figura. 1. Inmunidad innata y adaptativa.** La cinética de las respuestas inmunitarias son aproximaciones y pueden variar en diferentes infecciones. ILC, Célula linfocito innata; NK, Linfocitos citotóxicos naturales (Modificado de Abbas *et al.*, 2015)

La designación de un antígeno como “peligroso” proviene de la inducción de señales complementarias, tales como daño tisular o la detección de productos microbianos por parte del sistema inmune innato, que a su vez integra la información y dirige la respuesta apropiada por los linfocitos específicos del antígeno, que pertenecen al sistema inmune adaptativo (Abbas *et al.*, 2015).

Las interacciones del sistema inmune y los antígenos se llevan a cabo principalmente en tejidos u órganos anatómicos donde se desarrollan las respuestas inmunológicas.

Los órganos linfoides están presentes en todos los vertebrados. Funcionalmente se dividen en: tejidos linfoides primarios, secundarios y terciarios. Los órganos linfoides primarios, como la médula ósea y el timo, proporcionan microambientes especializados que permiten la generación del repertorio primario de linfocitos B y T. Por el contrario, los órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, el bazo y las placas de Peyer, se encuentran estratégicamente entre la linfa y la sangre. Los órganos linfoides basales primero se encargan de filtrar antígenos y patógenos de la linfa a la sangre. Segundo se especializan en la coordinación de la respuesta inmune adaptativa

mediante la organización espacio-temporal de las células efectoras inmunes, tales como los linfocitos y las células presentadoras de antígeno (Boehm y Swann, 2014).

En contraste con los órganos linfoides primarios y secundarios, los cuales se desarrollan antes del nacimiento, los sitios para el desarrollo de los órganos linfoides terciarios no están codificados en el genoma y son inducidos durante la inflamación, generalmente crónica (Boehm y Swann, 2014).

Las células dendríticas (DCs) son las células inmunes innatas responsables de la integración de la señal. Luego de la presentación antigénica los linfocitos T vírgenes, las células proliferan y dependiendo del microambiente de citocinas los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se diferencian en linfocitos T colaboradores con distintos fenotipos efectoras: En general las respuestas contra patógenos intracelulares, incluyendo bacterias y virus que inducen la diferenciación de los linfocitos (T<sub>H1</sub>), productores de IFN $\alpha$  y IFN $\gamma$ ; las respuestas provocadas por parásitos y alérgenos los linfocitos T tipo (T<sub>H2</sub>), productores de IL-4 e IL-13 y los linfocitos tipo 17 (T<sub>H17</sub>) en respuesta a patógenos extracelulares; tales como hongos, que se caracterizan por la participación de IL-17 (Talbo *et al.*, 2016).

Recientemente se han descrito otros linfocitos T<sub>H</sub>, como los T<sub>H9</sub>, así como los T<sub>H</sub> foliculares que se encuentran en los centros germinales cooperando con la activación y maduración de linfocitos B. además las DCs pueden inducir la generación de linfocitos T reguladores inducidas o periféricas en presencia de citocinas inmunosupresoras como el TGF- $\beta$ .

Existen zonas de la superficie del cuerpo no recubiertas por piel como los ojos, el intestino, el tracto respiratorio y el tracto genitourinario que se exponen continuamente a millones de microorganismos, que si evocarían una respuesta inmunitaria eficiente, condenarían al huésped a muerte prematura por inflamación crónica. Es por ello que la superficie de las mucosas posee un sistema inmune único que controla de forma rigurosa el balance entre la respuesta y la no respuesta. Dicho sistema depende de interacciones complejas entre moléculas, células, tejidos y los órganos que lo componen (Pulendran, 2005), tales como anticuerpos, quimiocinas y citocinas que participan en la protección del organismo.

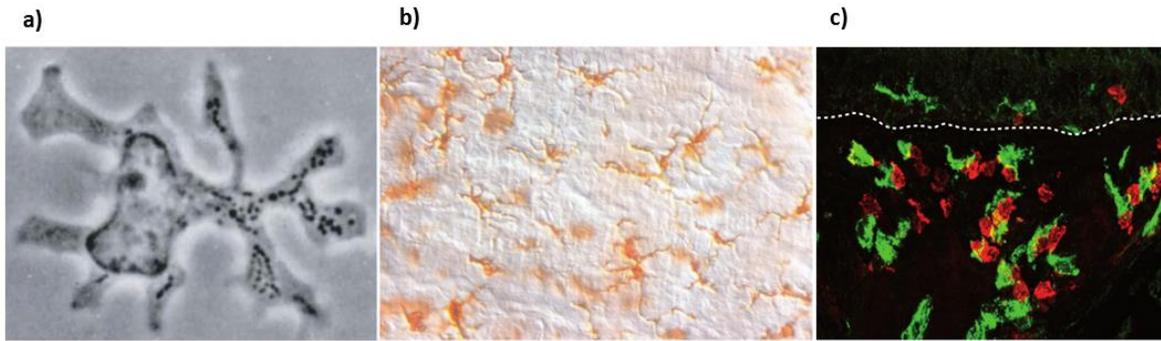
Este sistema está sometido a una regulación muy estricta, y cuando se produce una falla en el control se torna insuficiente y se producen múltiples enfermedades, tales como alergias, artritis, neoplasias y cáncer entre otras.

## Células dendríticas

La presión evolutiva ha llevado a que se desarrolle la inmunidad adaptativa, las características principales de la cual son: (a) la capacidad de reorganizar los genes de la familia de las inmunoglobulinas y del receptor para el antígeno de linfocitos T (TCR), lo que permite la creación de una gran diversidad de clonas antígeno- específicas y (b) la memoria inmunológica (Banchereau *et al.*, 2000).

En el caso de linfocitos T, el reconocimiento antigénico requiere de la intervención de las células presentadoras de Antígeno (APC) “Antigen Presenting Cells” (Banchereau *et al.*, 2000). Las células dendríticas (DCs) están especializadas en la captura y procesamiento de antígenos *in vivo*, convirtiendo las proteínas en péptidos que son presentados en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) “Major Histocompatibility Complex” (Steinman y Banchereau, 2007), lo que permite la activación de linfocitos T vírgenes, la diferenciación funcional y el establecimiento de memoria o bien la inducción de tolerancia inmunológica (Esterházy *et al.*, 2016).

Las células dendríticas, nombradas así por su forma de tipo arbórea o forma de dendritas “del griego dendron, que significa árbol” (Steinman y Banchereau, 2007). Fueron descritas por primera vez en 1868 por Paul Langerhans en la región suprabasal de la epidermis. Langerhans quien las consideró como parte del sistema nervioso (Stingl *et al.*, 1980), por lo que no se les adjudicó ningún papel en la respuesta inmune. Posteriormente en 1973, Ralph Steinman describió una subpoblación celular en órganos linfoides murinos; empleando suspensiones celulares de bazo, observó células no adherentes que se caracterizaban por contar con prolongaciones citoplasmáticas a manera de pseudópodos las cuales se retraían y extendían constantemente en condiciones de cultivo, por lo que las denominaron “Células Dendríticas” (Steinman y Cohn, 1973). Estas células poseen un núcleo de morfología irregular, baja actividad endocítica, abundante citoplasma, en un estado de madurez. Sus dendritas miden aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , son delgadas y finas, además de ser identificadas por su morfología irregular cómo se ilustra en la **Figura 2**, además presentan altos niveles de expresión de MHC de clase II y MHC clase I (Bell *et al.*, 1999), y de CD1a en piel y cérvix humano.

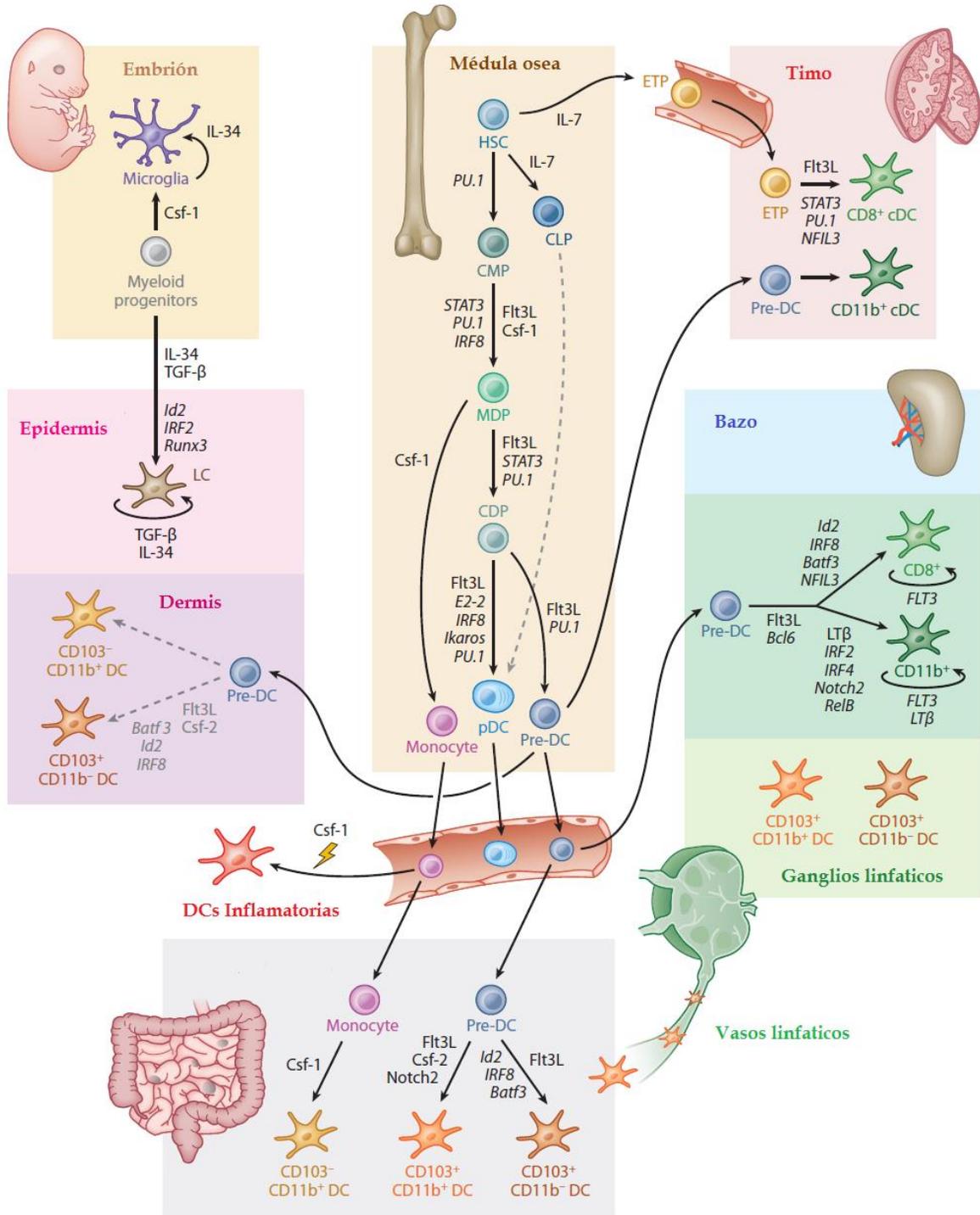


**Fig. 2 Células Dendríticas.** a) Una de las primeras imágenes de DCs en bazo de ratón (reproducción del Journal of Experimental Medicine; 1973 Rockefeller University Press). b) Red de células dendríticas visualizados por una tinción de MHC clase II, proveniente de tráquea de un murino. La tráquea fue tomada de un ratón no inmunizado (Van Rijt y Lambrecht, 2005). c) Crio-sección de una tráquea de rata (sección óptica de 1  $\mu$ m) que muestra tinción por Inmunofluorescencia de células dendríticas (DCs, MHC clase II teñidas en verde) y linfocitos T (CD2 teñidas en rojo). La mayoría de los linfocitos T están en estrecho contacto con las DCs. La línea punteada representa la membrana basal del epitelio superficial. Ampliación  $\times$  600 (Holt *et al.*, 2008).

Las DCs son un sistema de células presentadoras de antígenos que destacan por sus capacidades de presentación principalmente por tres vías moleculares (MHC clase I, II y CD1), además de moléculas de coestimulación como (CD40, CD80, CD86), producción de citocinas y quimiocinas (Bancherau y Steinmann 1998; Flores-Romo, 2001).

### ***Desarrollo de células dendríticas***

Citocinas, factores de crecimiento y factores de transcripción mantienen el desarrollo de las DCs (Hammer y Ma, 2013), desde los precursores celulares hasta la especialización tejido-específica. Los precursores de DCs se generan en la médula ósea para salir al sistema circulatorio y distribuirse en los tejidos linfoides y no linfoides de los organismos. Además se ha demostrado que las pre-DCs son progenitores con alta plasticidad, ya que en ensayos de transferencia adoptiva, las pre-DCs aisladas de médula ósea, sangre o bazo se diferencian en las subpoblaciones residentes de bazo, epidermis, timo, intestino, pulmón y ganglios linfáticos como se ilustra en la **Figura 3** (Milner y Jung, 2014).



**Fig. 3 Regulación del desarrollo y la homeostasis de DCs en ratones.** Esta ilustración resume el modelo actual de las vías de desarrollo de las células dendríticas tejido-residentes de origen linfóide y no linfóide. Las líneas discontinuas indican las vías que son probables, pero que aún no se han demostrado y que funcionan en el desarrollo de las DCs. Las citocinas y factores de transcripción son importantes en cada transición como se indica. Abreviaturas: (HSC, de células madre hematopoyéticas; CMP, progenitor mieloide común; CLP, progenitor linfóide común; MDP progenitor de células dendríticas/macrófagos derivado de monocitos; CDP, progenitor de células dendríticas común; ETP, progenitor temprano tímico; mono; monocitos; LC, de células de Langerhans) (Modificado de Merad et al., 2013).

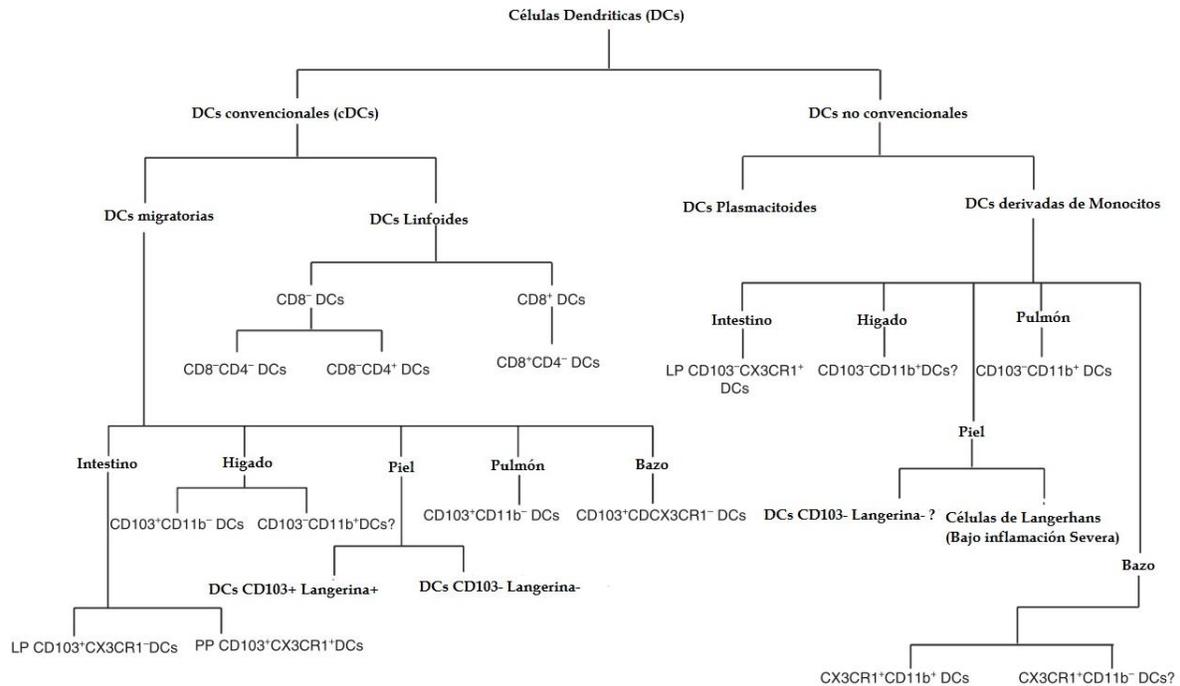
Las células madres hematopoyéticas (HSC) se diferencian en células progenitoras linfoides comunes (CLP) y progenitores mieloides comunes (CMP); las células CMP posteriormente se diferencian en monocitos y pre-DCs en la médula ósea. Posteriormente, los monocitos y las pre-DCs entran en la sangre y migran a los órganos linfoides y tejidos periféricos, donde dan lugar a los DC linfoides y DCs de los tejido-residentes. Además de CMP, CLPs también tienen el potencial de dar lugar a los DC, pero su contribución no se conoce a detalle (Modificado de Kushwanh y Hu, 2011).

### *Clasificación de las células dendríticas*

Las células dendríticas son un grupo de células muy heterogéneo y pueden clasificarse basándose en la localización anatómica, origen y función (Boltjes y Van Wijk, 2014). Como las DCs tienen múltiples vías de desarrollo, las que surgen de un desarrollo pre-DCs (células dendríticas que provienen de médula ósea) tienen una función clásica y puede ser considerado como DCs convencionales, mientras que las DC no convencionales pueden incluir DCs derivadas de monocitos, junto con las DCs plasmacitoides que, aunque se derivan de CDP y no monocitos. Las células dendríticas de tejidos no linfoides puede ser clasificados entre DCs presentes en diferentes tejidos estériles, como el páncreas y el corazón, DCs presentes en sitios de filtración, como el hígado y el riñón, y DCs presentes en mucosas que interactúan con el ambiente directamente así como el pulmón, intestino y piel (Merad y Manz, 2009).

La **Figura 4** proporciona una clasificación de los diversos subtipos de células dendríticas convencionales o no convencionales. Dentro de las DCs convencionales, se encuentran las células DCs migratorias, las cuales se encuentran en órganos de la periferia como la piel, el pulmón, el tracto intestinal, hígado y riñones. Por otro lado también se encuentran las DCs linfoides, las cuales se encuentran en órganos linfoides como los ganglios linfáticos, bazo o el timo. Este subgrupo ha sido dividido dependiendo de la expresión de CD4 y CD8 en las DCs (Kushwah y Hu, 2011).

Las DCs no convencionales incluyen a las DCs plasmacitoides, las cuales tienen la habilidad de secretar grandes cantidades de interferón (IFN tipo I) lo que las distingue de las células no convencionales. También se incluyen a las DCs derivadas de monocitos, las cuales se diferencian bajo condiciones inflamatorias. Las DCs derivadas de monocitos comparten la habilidad de capturar antígeno y migrar a ganglios linfáticos drenantes, se encuentran en órganos periféricos como intestino, pulmón, piel y riñones (Boltjes y Van Wijk, 2014).



**Fig. 4 Clasificación de las células dendríticas (DCs).** Los monocitos y las pre-DCs entran en la sangre y migran a los órganos linfoides y tejidos periféricos, donde dan lugar a los DC linfoides y DCs de los tejido-residentes (Modificado de Kushwanh y Hu, 2011).

Las DCs en pulmón se pueden encontrar en un estado basal, así como en condiciones inflamatorias como se ilustra en la **Figura 5**, y se debe tener en cuenta los diferentes compartimentos, vías aéreas respiratorias y el parénquima pulmonar (Lambrecht y Hammad, 2012). Estas células están distribuidas como una red estrecha con el epitelio, con una densidad de 600-700 DCs por mm<sup>2</sup> en el tracto respiratorio, equivalente a las células de Langerhans en la epidermis (Holt *et al.*, 1989).

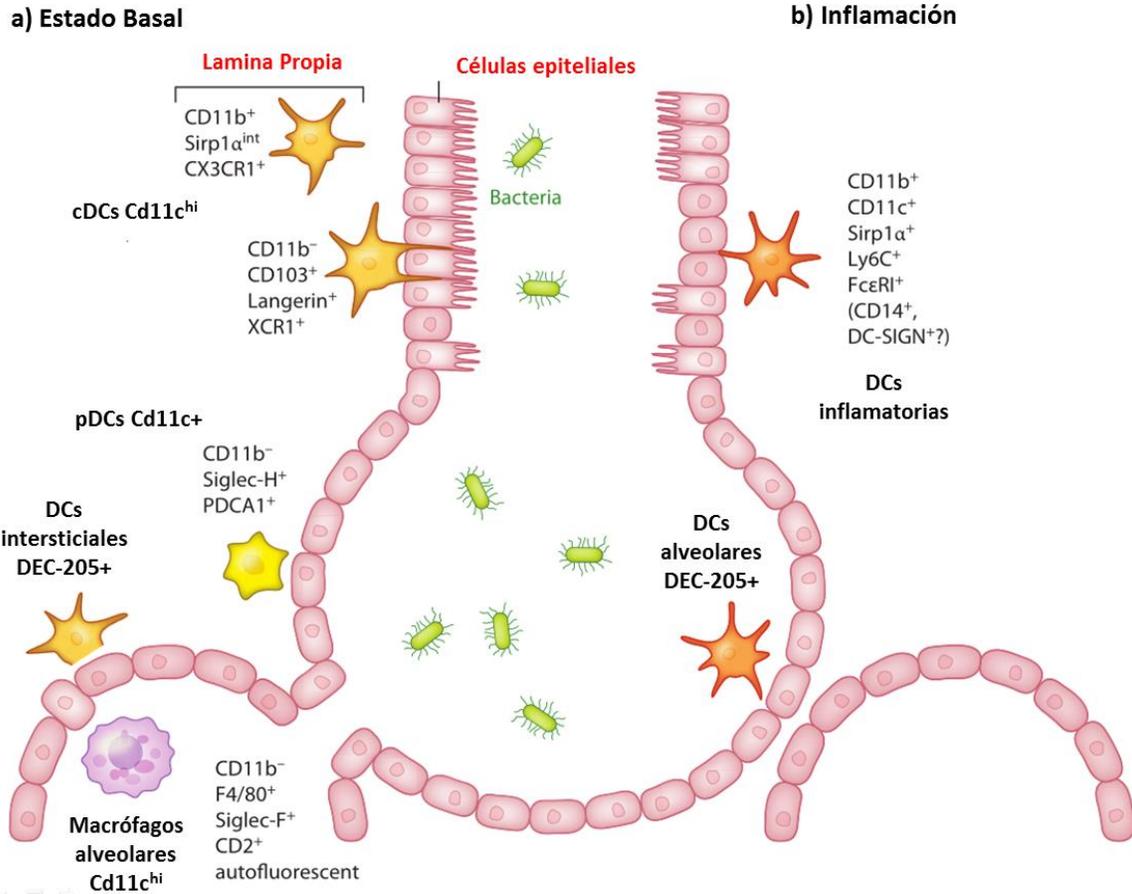
Las células dendríticas convencionales que se encuentran en tejidos no linfoides representa el 1-5% del total de células. Se reconocen principalmente 2 grupos: CD103+ CD11b+ y CD103- CD11b+. Las células CD103+ se encuentran en la mayoría del tejido conectivo. La proporción de cDCs CD103+ raramente excede el 20-30%. En intestino, las cDCs CD103+ se encuentran enriquecidas en las placas de Peyer, y coexpresan el marcador CD8 en la superficie celular (Merad *et al.*, 2013). Las células dendríticas CD103+ CD11b-, son importantes en el muestreo y presentación de antígenos a linfocitos CD8+, además de expresar altos niveles de PD-L1. La proteína PD-L1 se expresa sobre todo en células presentadoras de antígeno (APC) en un estado basal y puede ser regulado positivamente tras la exposición de señales inflamatorias (Keir *et al.*, 2008) en APC y células tumorales. Tras la activación del receptor de células T (TCR) con antígenos afines, PD-L1 se une a PD-1 en linfocitos T y modula la activación de linfocitos T induciendo señales inhibitorias hacia el TCR (Fife *et al.*, 2009; Yokosuka *et al.*, 2012).

Además esta población CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> en la lámina propia, se encuentran localizadas estratégicamente para la captura y muestreo directo de antígenos o patógenos a través de extensiones citoplasmáticas que se encuentran dentro del lumen de las vías aéreas, similar a lo que se ha reportado para DCs en intestino (Holt *et al.*, 2008), esta función de “periscopio” principalmente es activa en las vías aéreas. Al menos en pulmones de ratón, las DCs intraepiteliales CD103<sup>+</sup> expresan proteínas de unión estrecha como claudina-1, claudina 7 y zonula-2, que forman parte de las uniones estrechas entre las células epiteliales de las vías aéreas (GeurtsvanKessel y Lambrecht, 2008).

Las DCs intestinales son tolerogénicas comparadas con las DCs que se encuentran en la periferia ya que presentan un fenotipo que contribuye a la generación de tolerancia a antígenos orales y bacterias comensales (Hill y Artis, 2010). Sin embargo vale la pena señalar que las DCs CD8<sup>+</sup> y CD103<sup>+</sup> son críticas para la inducción de tolerancia, así como respuestas autoinmunes es decir crítico para el mantenimiento de la tolerancia a lo propio en el pulmón (Merad *et al.*, 2008).

Las cDCs CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> consisten de una mezcla de cDCs y macrófagos en el tejido, lo cual contribuye a la confusión que hasta ahora existe sobre su exacta contribución a la inmunidad. Recientemente algunos estudios han establecido que los monocitos contribuyen a la renovación intestinal de cDCs CD11b<sup>+</sup> en condiciones basales. Además las cDCs CD11b<sup>+</sup> son potentes activadores de linfocitos CD4<sup>+</sup> (Merad *et al.*, 2013), por la producción de quimiocinas durante la inflamación alérgico pulmonar (Boltjes y Van Wijk, 2014).

Las DCs residentes en pulmón comparten rasgos con las DCs de otros tejidos no linfoides, y el perfil típico incluye alta expresión de MHC clase II y DEC-205, junto con una baja expresión de CD8, CD40, CD80 y CD86 (Holt *et al.*, 2008), en un estado basal. Sin embargo en condiciones inflamatorias se reclutan principalmente células CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> hacia el parénquima pulmonar, además de células dendríticas alveolares inflamatorias DEC-205<sup>+</sup>. DEC-205 es un receptor de manosa que comparte características con receptores de lectina tipo C (CLRs). Los CLRs son una diversa familia de proteínas transmembranales que contienen dominios de lectina tipo C que permiten la unión a iones Ca<sup>2+</sup> y/o ligandos como carbohidratos propios así como virales, bacterianos y de origen fúngico. Los CLRs están involucrados en la endocitosis, fagocitosis, y procesamiento de péptidos mediante MHC clase II o presentación cruzada por MHC clase I (Hammer y Ma, 2013), se sabe que DEC-205 mejora la eficiencia en la presentación de antígenos mediante el sistema endocítico (Steinman, 2012).



**Fig. 5** Diferentes subconjuntos de células dendríticas (DCs) presentes en los pulmones de los ratones. En ausencia de inflamación (a), el pulmón contiene dos subconjuntos de CD11c<sup>hi</sup> convencional (c) DCs (CD11b<sup>+</sup> en la lámina propia y CD11b<sup>-</sup> en la capa epitelial). Una población de CD11c<sup>+</sup> plasmacitoides (p) DCs también se puede encontrar en las vías aéreas respiratorias. Durante la inflamación (b), las DC derivadas de monocitos CD11b<sup>+</sup>, expresan Ly6C y FcεRI que son reclutadas a los pulmones (Modificado de Lambrecht y Hammad, 2012).

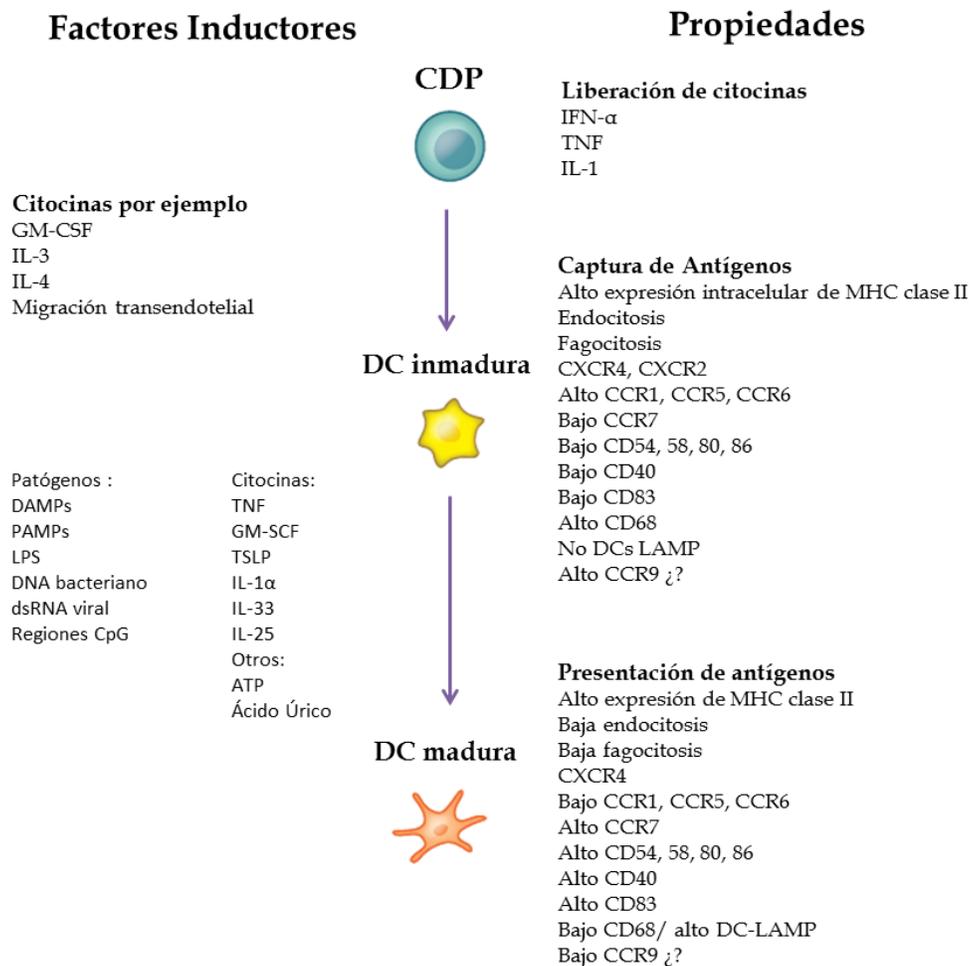
### Maduración de las células dendríticas

Una de las características más importantes de la biología de las DCs es su maduración funcional, este es un proceso complejo caracterizado por la adquisición de un número de propiedades fundamentales: procesamiento y presentación de antígenos, migración y coestimulación de linfocitos T (Dalod *et al.*, 2014).

La maduración de las DCs es un proceso continuo iniciado principalmente en tejidos periféricos después de un encuentro con los antígenos y/o encuentros con citocinas pro-inflamatorias, necesarios para completar la maduración (Banchereau *et al.*, 2000).

Numerosos factores regulan o inducen la maduración de las células dendríticas (**Figura 6**), incluyendo a) moléculas relacionadas a LPS, DNA bacteriano, y RNA de doble cadena; b) el balance entre señales pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en un microambiente local, incluyendo TNF-α,

IL-1, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  y prostaglandinas y c) señales derivadas de los linfocitos T. Además la maduración es un proceso asociado y coordinado con varios eventos como a) baja expresión de receptores endocíticos y fagocíticos; b) sobre expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD58, CD80 y CD86; c) cambios en su morfología, d) variación en los compartimentos lisosomales asociados a baja expresión de CD68, expresión de MHC clase II e incremento de la capacidad quimiotáctica a CCL19 y CCL21. Entre los cambios morfológicos que acompañan la maduración incluyen pérdida de estructuras de adhesión y reorganización del citoesqueleto (Banchereau *et al.*, 2000).



**Fig. 6 Maduración de las células dendríticas (DCs).** Del lado izquierdo del esquema vemos los factores inductores de la progresión de un estado a otro. Abreviaturas: CPD; progenitor de células dendríticas, GM-CSF; Factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, LPS; Lipopolisacárido, IL; interleucinas, dsRNA, RNA de doble cadena viral; del lado derecho se muestra las principales propiedades de cada estado de diferenciación/maduración: LAMP; proteína de membrana asociada a lisosoma (Modificado de Banchereau *et al.*, 2000).

Antes de la activación, las DCs convencionales mieloides que se encuentran en los órganos periféricos pueden expresar CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 y CXCR4 (receptores de unos mediadores quimiotácticos llamados quimiocinas los cuales se describirán más adelante) con patrones de expresión diferentes entre subgrupos de DCs. Tras la estimulación por antígenos de patógenos derivados y/o moléculas de señalización asociados a lesión celular de forma endógena, las células dendríticas activadas adquieren un fenotipo migratorio asociado con el incremento en la expresión de CCR7 y receptores vinculados con la maduración DC, incluyendo CD40, CD80, CD86 y MHC de clase II. Los receptores acoplados a proteínas G son mediadores dominantes en la movilización y se requieren receptores adicionales de quimiocinas y citocinas para regular positivamente la función de las moléculas de migración (Randolph *et al.*, 2008).

### ***Migración de las células dendríticas***

Una importante característica de las DCs en los varios estados de maduración es su movilidad. Esta propiedad capacita a las DCs para moverse del sistema circulatorio a los tejidos periféricos y estos a su vez a los ganglios linfáticos. Su capacidad migratoria los distingue de los macrófagos. Por ejemplo, los macrófagos alveolares superan en número a los DCs en al menos 100 veces en las vías respiratorias, sin embargo las DCs que migran de las vías respiratorias a los ganglios linfáticos pulmonares superan enormemente a los macrófagos que migran a través de la linfa (Randolph *et al.*, 2008).

Las células migratorias utilizan mecanismos altamente conservados para detectar y responder a pequeños cambios en la concentración de factores quimiotácticos en el medio externo.

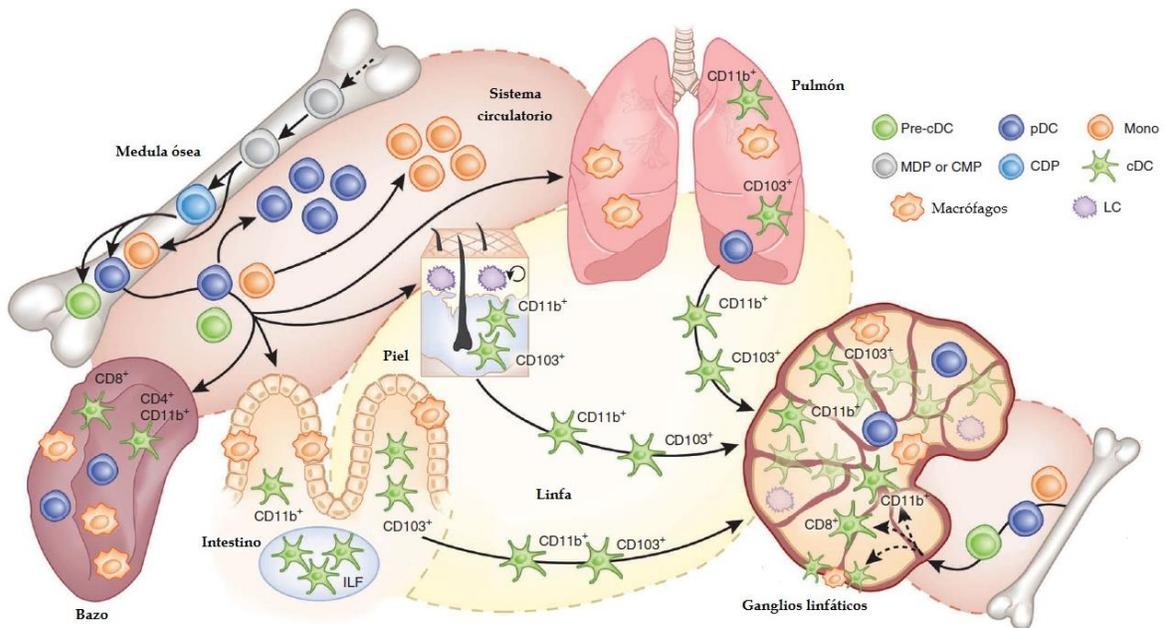
Bajo condiciones de estrés celular, inflamación, o daño tisular, metabolitos ordinarios que se encargan de mantener la homeostasis intracelular como NAD, ATP, ADP, ADPR y AMP etc., pueden ser liberados hacia el espacio extracelular. Cada molécula puede entonces unirse a receptores presentes en la superficie celular de las DCs y modular su maduración y/o migración (Randolph *et al.*, 2008).

En particular, estas células encuentran y capturan antígenos en los tejidos periféricos y migran a través de los vasos linfáticos aferentes a las zonas de los linfocitos T de los órganos linfoides secundarios para iniciar la respuesta inmune adaptativa como se observa en la **Figura 7** (Satpathy *et al.*, 2008). Incluso en casos en los que los macrófagos y las DCs llevan antígenos virales para la presentación productiva a linfocitos T CD8+ se limita solo a las DCs, aparentemente, debido a que los macrófagos topológicamente no están apropiadamente localizados en comparación con las DCs en el tracto respiratorio (Randolph *et al.*, 2008).

Las células dendríticas provienen de precursores en la circulación periférica, y el reclutamiento hacia los tejidos es principalmente para reemplazar a las DCs residentes, que migran principalmente hacia los órganos linfoides y completar su ciclo de vida como células interdigitantes, así que la dinámica de poblaciones es tejido-específica (Mc William *et al.*, 1999).

Las poblaciones de DCs se mantienen quiescentes en tejidos periféricos como la piel y el músculo su vida media es entre 21 y 30 días respectivamente. Mientras que en tejidos como el pulmón son más cortos 2-3 días para DCs intraepiteliales de las vías aéreas y 7-10 días para DCs del parénquima pulmonar. Esta rápida cinética en pulmón solo puede compararse con poblaciones en el intestino, pues la vida media ha sido estimada en 3 días (Mc William *et al.*, 1999).

Es claro que la homeostasis de DCs en tejido requiere reemplazar constantemente con nuevas células. En estudios con ratones quiméricos se encontró que las DCs en el riñón y corazón se reponen en 2 a 4 semanas después de una irradiación letal y posterior trasplante de medula ósea, mientras que la repoblación de DCs en la vagina, pulmón, e intestino es más rápido y ocurre entre el día 7 y 13 (Merad y Manz, 2009).



**Fig. 7 Desarrollo y migración de linajes de fagocitos mononucleares en homeostasis.** Los cDCs, pDCs y derivadas de monocitos (mono) se originan a partir de progenitores de médula ósea. Progenitores de células dendríticas/macrófagos derivados de monocitos (MDPs) dan lugar a los progenitores de células dendríticas (CDPs) y monocitos. Los CDPs se diferencian en pDCs o precursores comprometidos a cDCs (pre-cDCs). Pre-cDCs, pDCs y monocitos transitan a través de la sangre y órganos linfoides periféricos, donde las pre-cDCs completan su diferenciación en cDCs CD8+ (o CD103+) o CD4+ (o CD11b+). Los monocitos pueden migrar a los tejidos y diferenciarse en macrófagos. En el intestino, las cDCs y los macrófagos se establecen en las vellosidades; las cDCs también están presentes en los folículos linfoides intestinales (ILF). En la piel, las DCs dérmicas consisten en dos subconjuntos de cDCs CD11b+ y CD103+. Las células de Langerhans (LC) pueblan la epidermis y se auto-renuevan de forma local. Los macrófagos, pDCs y ambos subconjuntos de cDCs residen en el pulmón mientras que los macrófagos se mantienen en general, en el sitio de diferenciación "tejido-residentes" (Modificado de Satpathy *et al.*, 2008).

## ***Células dendríticas y tolerancia inmunológica***

La interacción con microorganismos plantea varios retos para la toma de decisiones en el sistema inmunológico. ¿Responder o no responder? Sí hay una respuesta, entonces, ¿qué tipo debería ser? (Pulendran *et al.*, 2010).

Al igual que las DCs intestinales, las DCs de pulmón, que capturan antígenos de las vías respiratorias, se encargan de regular las respuestas inmunitarias a patógenos con las de la flora microbiana normal y los antígenos inofensivos que son inhalados. Las DCs pulmonares circulan continuamente desde los pulmones hasta el drenaje mediastinal y ganglios peribronquiales, pero para ello se cree que requieren sutiles señales de maduración presumiblemente de la flora local. Por lo tanto, las DCs que vigilan las vías respiratorias adquieren un fenotipo semi-maduro por el que regulan positivamente el CCR7, lo que permite su migración a los ganglios linfáticos regionales (Maldonado y Andrian, 2010).

Durante mucho tiempo, la atención se ha centrado en la capacidad de las DCs para provocar diferentes respuestas de linfocitos T; sin embargo, estas células también pueden inducir tolerancia periférica mediante la promoción de la diferenciación de células T reguladoras (Tregs) (Ilarregui *et al.*, 2009; Esterházy *et al.*, 2016). Las DCs CD103+, productoras de ácido retinoico (RA) y TGF- $\beta$  son potentes inductores de la expresión de Foxp3 en linfocitos T activados (Maldonado y Andrian, 2010).

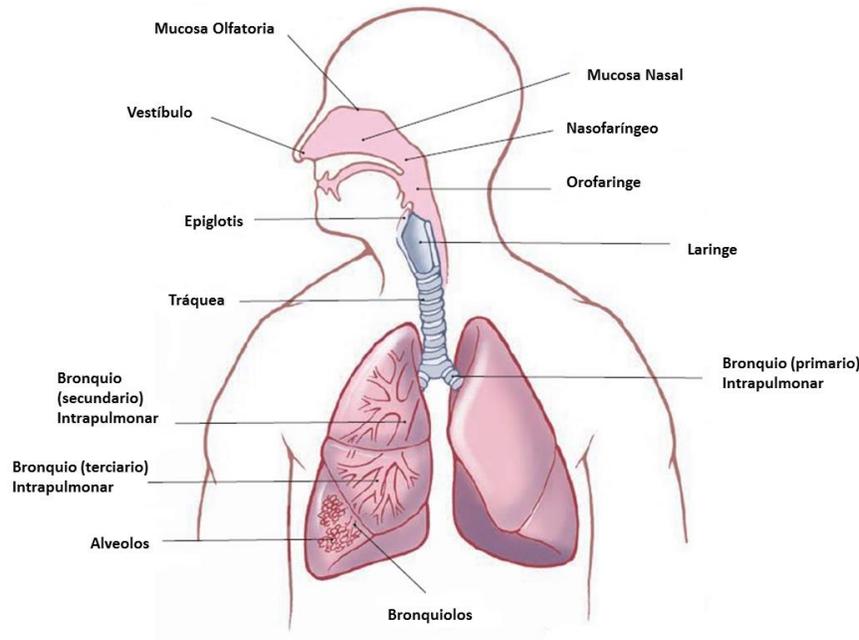
En ratón, las DCs de timo son capaces de mediar la selección negativa de los linfocitos T *in vitro* y contra superantígenos *in vivo*. Por ejemplo, las DCs pueden inducir tolerancia inmunológica a la proteína básica de mielina y reducir experimentalmente el desarrollo de encefalitis autoinmune (Banchereau *et al.*, 2000).

## **Anatomía del pulmón**

El tracto respiratorio tiene aproximadamente un área de superficie de 70 m<sup>2</sup> en humanos adultos, que virtualmente tiene contacto directo con el ambiente exterior (Holt *et al.*, 2008).

Los pulmones son divididos dentro de dos compartimentos distintos funcionalmente: las vías aéreas, y el parénquima pulmonar; compuesto de alveolos con una pared delgada especializada en el intercambio gaseoso (Holt *et al.*, 2008). La circulación de las vías respiratorias en los pulmones, va desde la tráquea a los bronquiolos terminales como se ve en la **Figura 8**, y están formados por el revestimiento y ramificación de túbulos derivados del tubo digestivo por el proceso de morfogénesis. En los pulmones humanos, las vías respiratorias cartilaginosas se extienden

profundamente en el parénquima pulmonar y están rodeados de una gran cantidad de glándulas submucosas que segregan fluidos, mucinas y otras proteínas de defensa del huésped en las vías respiratorias. La tráquea humana, bronquios y bronquiolos se alinean principalmente por un epitelio pseudoestratificado cuya superficie está dominada por las células ciliadas (Whitsett y Alenghat, 2015).



**Fig. 8** El sistema respiratorio juega el papel esencial en el suministro de oxígeno al cuerpo. Se puede dividir en las vías respiratorias del tracto respiratorio superior e inferior de la vía aérea respiratoria; funcionalmente, el sistema respiratorio también se puede dividir en una parte conductora y la parte respiratoria (Modificado de Cui *et al.*, 2011).

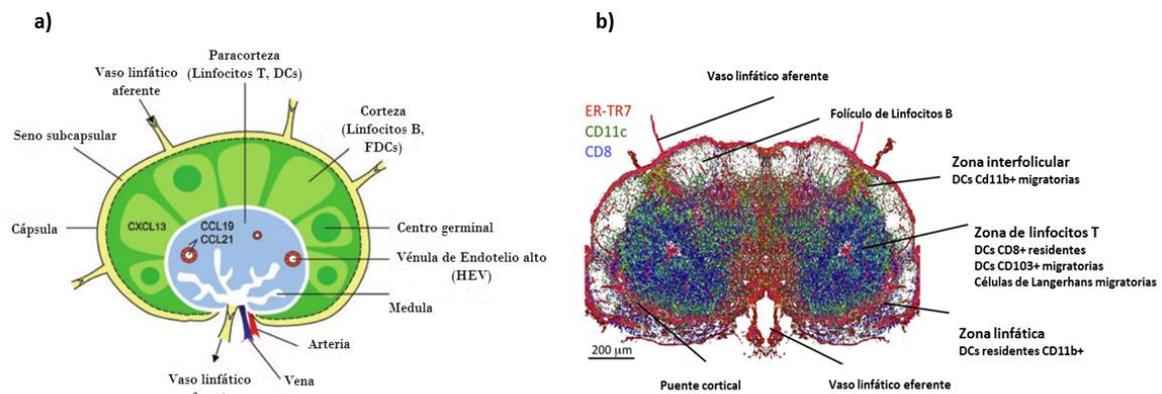
### ***Tejido linfoide asociado a mucosas***

Además, el sistema de las mucosas puede dividirse morfológica y funcionalmente en dos partes principales: 1) En tejidos linfoides organizados que conforman los folículos de la mucosa (MALT, del inglés Mucosa Associated Lymphoid Tissues), dentro de los cuales podemos encontrar tejidos linfoides asociados al intestino (GALT, del inglés Gut Associated Lymphoid Tissues) y a los bronquios (BALT, del inglés Bronchus Associated Lymphoid Tissues), y 2) el tejido linfoide difuso, que consiste de células con una amplia distribución localizadas en la lámina propia de la mucosa (Holt *et al.*, 2008).

Todo el MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosas) se parece a los ganglios linfáticos (**Figura 9**) con zonas de linfocitos T interactuando con folículos de linfocitos B y contienen una variedad de células presentadoras de antígenos, incluyendo células dendríticas y macrófagos (Brandtzaeg *et al.*, 2008). A diferencia de los tejidos linfoides mencionados anteriormente, todos los cuales se

desarrollan independiente de antígenos o la colonización microbiana, los folículos linfoides ectópicos, como el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) o el tejido linfoide asociado a intestino (GALT), se forman después del nacimiento en respuesta a la inflamación o infección (Randall y Mebius, 2014).

Sin embargo, el MALT carece de vasos linfáticos aferentes porque todas estas estructuras linfoides muestran antígenos exógenos directamente de las superficies de las mucosas a través de un epitelio asociado a folículos con “micropliegues” o células (M) “de membrana”. Estas células epiteliales delgadas están especializadas en transferir eficazmente antígenos solubles y, especialmente, partículas, tales como microorganismos (Brandtzaeg *et al.*, 2008).



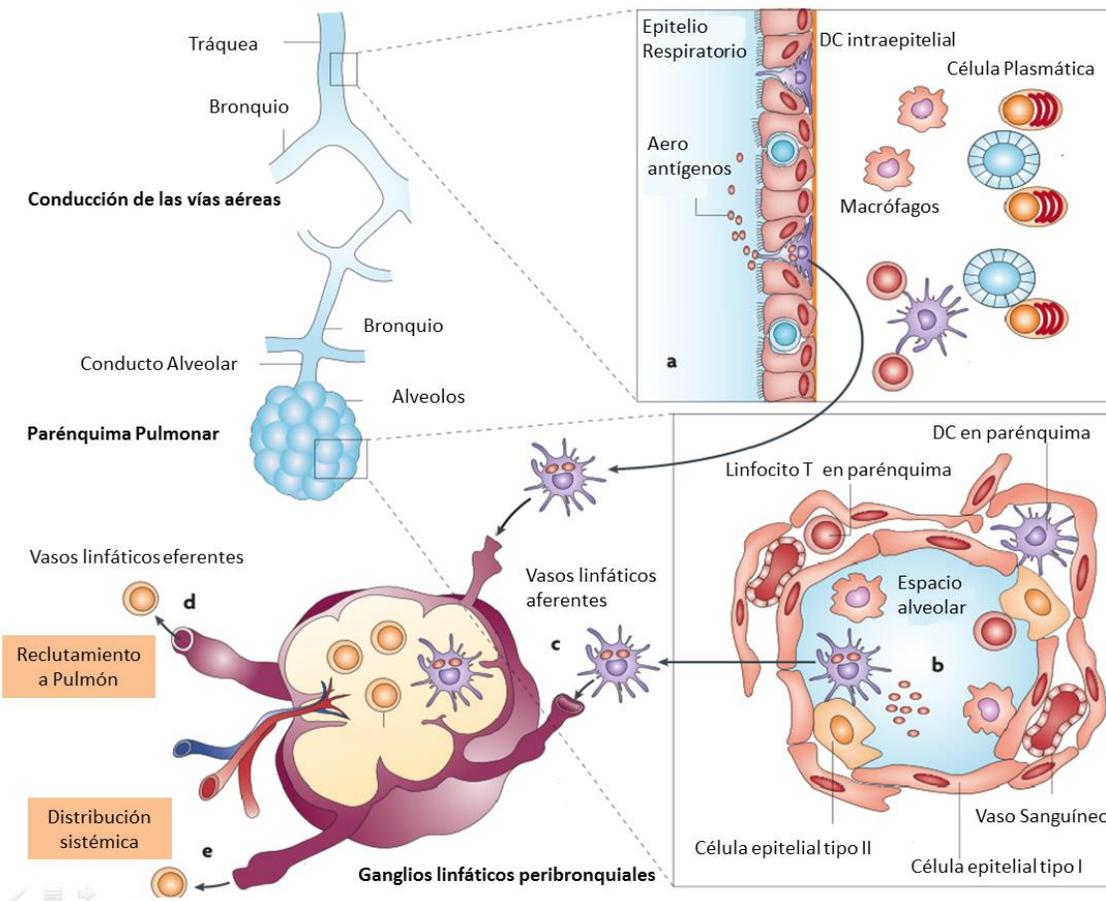
**Fig. 9 Estructura de un ganglio linfático. a)** Una cápsula fibrosa y un seno subcapsular subyacente que mantienen el contenido celular de los ganglios linfáticos. Se puede separar en tres regiones distintas: corteza, paracorteza y médula. Las células dendríticas, que captan antígenos, entran a través de los vasos linfáticos aferentes y migran a las zonas ricas en linfocitos T, después de una estimulación antigénica, los linfocitos B también se someten a una proliferación celular. La localización celular está orquestada por quimiocinas linfoides. CXCL13 es expresada en los folículos de los linfocitos B, que guía a los linfocitos B; CCL19 y CCL21 es expresado en la zona de los linfocitos T y Células Dendríticas (DCs) en la Paracorteza. Además las quimiocinas linfoides expresadas en HEV facilitan el reclutamiento de los linfocitos a los ganglios linfáticos (Modificado de Drayton *et al.*, 2006). **b)** microscopia basada en Inmunofluorescencia donde se muestra la distribución de diferentes subpoblaciones de DCs tanto residentes como migratorias en los micro- compartimentos de un ganglio linfático (modificado de Gerner *et al.*, 2012)

## Componentes de la inmunidad pulmonar

Los microorganismos son la forma de vida más abundante en la tierra. Aunque muchos son de vida libre, algunos han evolucionado para participar en interacciones estrechas y a menudo duraderas con organismos multicelulares. Algunas de estas relaciones son patógenas, mientras que otras son beneficiosas para el huésped. Este tipo de relaciones beneficiosas han evolucionado para representar una característica conservada en la vida multicelular, importante para el desarrollo normal y fisiología de las plantas, los insectos, nemátodos, peces, aves y mamíferos. Después del nacimiento, las superficies epiteliales de mamíferos son colonizadas con virus, hongos, bacterias, protozoarios y helmintos, creándose complejas comunidades microbianas en múltiples nichos ambientales (Hill y Artis, 2010).

Particularmente en el pulmón a lo largo de la vida, el proceso dinámico de ventilación mueve millones de litros de aire a través de las muy ramificadas vías respiratorias, en donde la estructura de los alvéolos trae las células epiteliales en estrecha oposición a los capilares pulmonares para el intercambio de gases, proporcionando así oxígeno vital que se requiere en la circulación sistémica. De este modo partículas, microbios y sustancias tóxicas se adhieren al tracto respiratorio, donde encuentran un sistema de defensa innato del huésped tanto físico como químico para impedir su entrada en el tejido pulmonar y la circulación. Además de las múltiples barreras creadas por las capas de moco, una gran cantidad de líquido y moléculas antimicrobianas permiten la depuración mucociliar (Whitsett y Alenghat, 2015).

Sin embargo ante la constante presión antigénica de microorganismos, el sistema inmune del pulmón posee mecanismos eficientes de respuesta, estos mecanismos controlan la homeostasis inmunológica en el pulmón como se puede ver en la **Figura 10**. Por ejemplo se sabe que la mucosa contiene extensas redes de células dendríticas y macrófagos que se desarrollan desde la etapa embrionaria.



**Fig. 10 Captura de antígenos y patrón de migración para la inducción inmunológica en los pulmones.** Las células locales del sistema inmune en el pulmón capturan antígenos en el espacio alveolar y a su vez es presentado a los linfocitos T en los ganglios linfáticos drenantes. Los antígenos lumbinales son muestreados por las células dendríticas (DCs) que están localizadas en la superficie epitelial de la mucosa bronquial **a**) o el espacio alveolar **b**). Las DCs activadas migran a través de los vasos linfáticos aferentes y dentro de la sangre por el conducto torácico **c**). Dependiendo de la respuesta los linfocitos T efectores salen hacia la mucosa bronquial y llegan a través de los capilares pulmonares al parénquima pulmonar **d**), o se diseminan por el torrente sanguíneo (Modificado de Holt *et al.*, 2008).

En la lámina propia también están presentes mastocitos y células plasmáticas (productoras de IgA polimérica), sin embargo otras poblaciones efectoras, en la mucosa de las vías aéreas también tienen el potencial de inducir sitios microanatómicos como el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) (Holt *et al.*, 2008).

## Macrófagos

En condiciones basales, la población de leucocitos en el espacio alveolar consta principalmente de macrófagos alveolares (más del 90% de la población total), siendo el resto DCs y pocos linfocitos T (Holt *et al.*, 2008).

La mayoría de los tejidos en el cuerpo contienen poblaciones de macrófagos con funciones nicho-específicas. Estas son funciones dedicadas a la homeostasis; eliminación de desechos celulares,

procesamiento de hierro, hasta un papel central en la vigilancia inmunológica de los tejidos, la respuesta a la infección y la resolución de la inflamación (Davies *et al.*, 2013). A diferencia de las DCs, los macrófagos normalmente son células no migratorias “tejido residentes” que generalmente son menos eficientes en la presentación de antígenos a los linfocitos T. En cambio, tienen alta actividad proteolítica y catabólica, lo que contribuye a su capacidad para eliminar e ingerir patógenos, desechos celulares y células muertas (Salpathy *et al.*, 2012).

Sin embargo los macrófagos tejido-residentes son más conocidos por su papel de células centinelas programados para el encuentro con patógenos o desafíos ambientales, además de suprimir la función de las DCs. Las funciones inmunosupresoras por parte de los macrófagos alveolares son la primera línea de regulación contra la inflamación mediada por linfocitos T en las superficies epiteliales encargadas del intercambio gaseoso (Holt *et al.*, 2008).

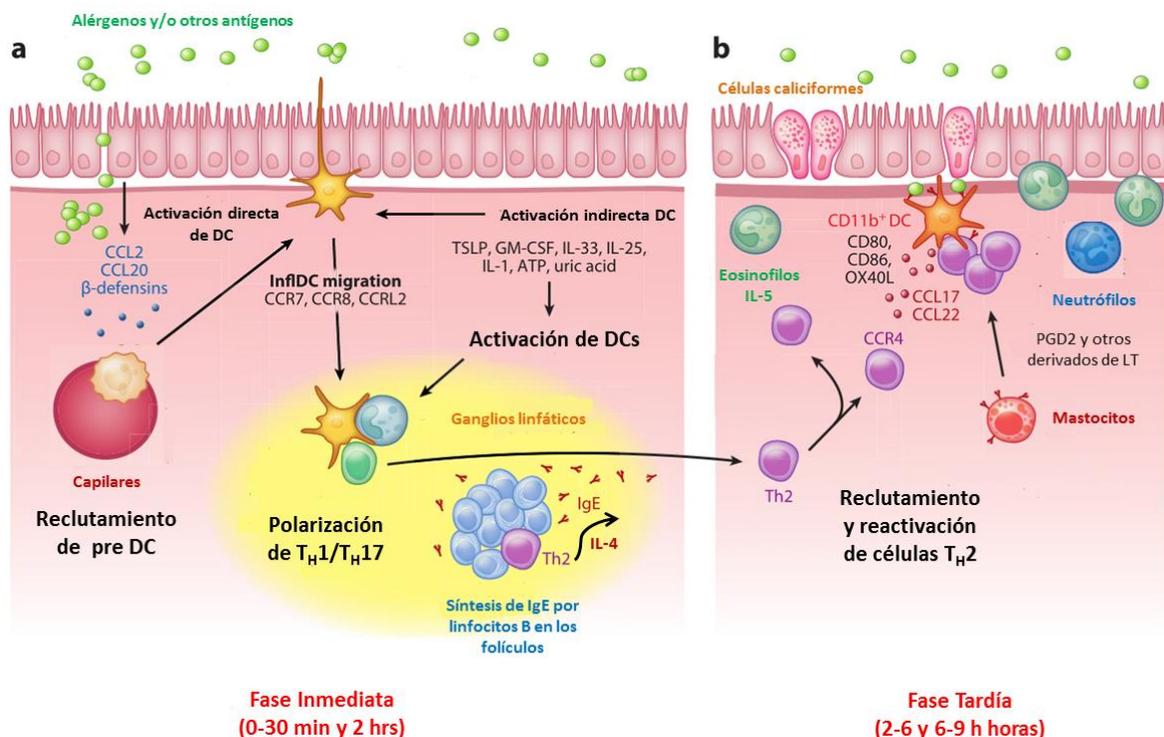
En un estado basal, los macrófagos se consideran anti-inflamatorios, ya que mantienen la homeostasis de los órganos, en parte, mediante la producción de citocinas reguladoras tales como la interleucina 10 (IL-10) (Salpathy *et al.*, 2012), prostaglandinas y factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) (Holt *et al.*, 2008).

Por lo menos tres tipos de macrófagos residen en los pulmones: macrófagos bronquiales (BMs), macrófagos intersticiales (IMs) y macrófagos alveolares (AMs). Además, los macrófagos intravasculares situadas en el lado interior de los capilares se han descrito en los seres humanos, monos, gatos y perros, pero no en los roedores (Kopf *et al.*, 2015).

En el pulmón la homeostasis y la función del tejido se debe a la regulación de proteínas surfactantes principalmente por macrófagos alveolares (Davies *et al.*, 2013).

### **Interacciones entre células dendríticas y alérgenos.**

Para todo tipo de respuestas por los linfocitos T, está involucrada la activación de las células dendríticas presentadoras de antígeno, que reconocen y capturan al alérgeno y presentan a los linfocitos T en los ganglios linfáticos que irrigan el pulmón (**Figura 11**). Varios estudios han demostrado que las DCs son necesarias y suficientes para inducir la inmunidad adaptativa tipo T<sub>H</sub>2 y T<sub>H</sub>17 a alérgenos inhalados en ratones que no han tenido encuentro con el alérgeno previamente. (Lambrecht y Hammad, 2015).



**Fig. 11 Interacciones de las células dendríticas y células epiteliales durante la sensibilización y fase de reto en un modelo experimental de asma. a)** En el pulmón las células dendríticas convencionales (cDCs) y las células epiteliales expresan receptores de reconocimiento patrón y pueden ser activadas directamente por alérgenos. En respuesta a alérgenos, las células epiteliales del pulmón producen quimiocinas (CCL2 y CCL20) que reclutan pre-células dendríticas inmaduras. Una vez activadas las células epiteliales producen citocinas “instructivas” (por ejemplo, IL-1 $\alpha$ , GM-SCF, IL-25, IL-22 y TSLP) y señales de lesión (ATP y ácido úrico) que favorecen la maduración de Cd11b+ cDCs (que dependen de IRF4 para la maduración y migración). Las cDCs activadas en pulmón luego migran a los ganglios linfáticos paratraqueales donde inducen las respuestas tipo Th<sub>2</sub> o Th<sub>17</sub>. Algunos linfocitos T adoptan un destino folicular para inducir un cambio de clase en el IgE en los linfocitos B. **b)** Cuando los pulmones están expuestos repetidamente a los alérgenos (derecha) las DCs derivadas de monocitos Cd11b+, pobremente migratorias y macrófagos re-estimulan localmente la función efectora de los linfocitos T residentes o reclutan linfocitos Th<sub>2</sub> a través de la producción de CCL17 y CCL22 (Modificado de Lambrecht y Hammad, 2015; Pundir, 2013).

Muchos alérgenos, tales como las de esporas de *A. fumigatus*, cucarachas o ácaros del polvo tienen actividad proteolítica. Proteasas (tales como la papaína o Derp1) actúan sobre las células epiteliales para disminuir la función de barrera mediante la escisión de las proteínas de unión estrecha y así incrementar la permeabilidad epitelial, además de inducir una respuesta de citocinas a través de la estimulación de los receptores activados por proteasas. Esta actividad de *A. fumigatus* conduce a la formación de productos de escisión de fibrinógeno en el fluido que recubre los pulmones activando receptores tipo Toll tipo 4 (TLR4) y de esta manera estimular a las células epiteliales respiratorias para producir IL-33 y TSLP, que su vez activa las células dendríticas, células linfoides innatas (ILC2) y basófilos (Lambrecht y Hammad, 2015).

Las citocinas epiteliales inducidas por alérgenos o proteasas inducen inmunidad tipo Th<sub>2</sub> mediante la activación directa de cDCs CD11c+ (causando su migración y la regulación positiva de moléculas coestimuladoras tales como OX40L, CD80 CD86), además de la activación de ILC2 y basófilos que

son una fuente importante de IL-4 y/o IL -13 y exacerbaban la inmunidad tipo  $T_H2$  (Lambrecht y Hammad, 2015).

En el pulmón la pérdida de la homeostasis involucra algún componente de la inmunidad pulmonar y cuando se produce una falla en el control se torna insuficiente y se producen múltiples enfermedades, tales como alergias.

Cada vez es más claro que las células epiteliales y las células dendríticas tienen un papel importante no sólo en la sensibilización a los alérgenos, sino que también en el desarrollo del asma. Hay un aumento en el número de DCs activadas en las vías respiratorias de las personas con asma y en ratones con inflamación, estos grupos correlacionan con linfocitos T activados que residen en las vías respiratorias.

### **Desorden tipo $T_H2$ “Asma eosinofílica”**

Se ha encontrado un elevado número de linfocitos T  $CD4^+$  que producen IL-4 y IL-5 en el lavado broncoalveolar (LBA) y en biopsias de mucosa pulmonar, y se ha correlacionado con el grado de eosinofilia. La presencia de IgE en suero (atopia) es un biomarcador de la inmunidad adaptativa tipo  $T_H2$ , impulsado por la IL-4 que activa a los linfocitos B, para que sufran un cambio de clase en la cadena pesada de la IgE y se una a los receptores específicos de alta afinidad  $Fc\epsilon RI$  en los mastocitos. Aunque es muy fácil medir la cantidad de inmunoglobulina, la presencia de altos títulos de IgE es un mal marcador para la expresión génica de citocinas tipo  $T_H2$  y si el paciente va a desarrollar asma. Existen otras patologías del pulmón con incremento de IgE en suero (Lambrecht y Hammad, 2015).

### **Epidemiología del Asma**

La raza humana ha llegado a tener gran dominio sobre su entorno, de manera que cualquier análisis del aumento o aparición de una enfermedad tiene que llevarnos a cambios en nuestro estilo de vida. En el caso de enfermedades alérgicas, los cambios en nuestro medio ambiente, la dieta, la calidad del agua, los alimentos y el comportamiento durante los últimos 150 años, han desempeñado un papel dominante en la especificidad de estas enfermedades, así como en la prevalencia y la gravedad. Antes de la primera descripción de la fiebre del heno en 1870, había muy poco conocimiento de las enfermedades alérgicas (Platts-Mills, 2015).

La iniciativa Global para el manejo del Asma (GINA), es un programa creado desde 1993 mediante una colaboración del Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre, Institutos Nacionales de la Salud y la Organización Mundial de la Salud en EUA, como un esfuerzo para alertar a las

autoridades médicas, trabajadoras para el cuidado de la salud y público en general, que existía una tendencia al incremento del asma (Shakib *et al.*, 2008) y en la necesidad de tener un consenso en las definiciones y diagnóstico a nivel mundial.

La GINA define al asma como una enfermedad respiratoria crónica común que afecta del 1-18 % de la población en diferentes países (GINA, 2015). La OMS calcula que en la actualidad hay 300 millones de pacientes con asma (OMS, s.f). En México, de acuerdo a las estadísticas de Mortalidad del INEGI actualizadas el 18 de Septiembre de 2015, la Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma tienen 0.877 % de mortalidad. La enfermedad es muy común en las sociedades de bajos ingresos económicos, en las que casi 1 de cada 10 niños y 1 de cada 12 adultos es afectado, lo cual se traduce en una elevada morbilidad y altos gastos anuales de atención sanitaria (Lambrecht y Hammad, 2015). Además durante la etapa adulta es más frecuente en mujeres, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo.

Se estima que para el 2025 la cifra de afectados ascenderá a 400 millones (OMS, 2014), y los costos médicos aumentarían directamente, ya que más del 50% de los pacientes tienen poco control de su asma. En México hay fluctuaciones en la prevalencia de asma y las áreas tropicales son las de mayor prevalencia. Estudios han demostrado que Tulancingo, Hidalgo es la ciudad de mayor prevalencia de asma, seguido de Cancún, Quintana Roo y Puebla, y la de menor prevalencia es Tlaxcala (Mancilla-Hernández *et al.*, 2015). En la mayoría de los pacientes, la enfermedad es controlada por una combinación de corticosteroides inhalados (que actúan suprimiendo la inflamación en vías aéreas) y agonistas de corto o largo plazo que actúan sobre receptores  $\beta_2$  adrenérgicos. (Lambrecht y Hammad, 2015).

### **Clasificación clásica del asma**

El asma requiere de características sólidas para un mejor pronóstico y diagnóstico, es por ello que a continuación se muestran las actuales clasificaciones.

#### ***Asma atópica o alérgica***

Los principales factores etiológicos del asma son la predisposición genética a la hipersensibilidad de tipo I («atopia»). Se considera que aproximadamente el 70% de los casos son “extrínsecos” o “atópicos” y se deben a respuestas inmunitarias (contra antígenos ambientales) mediadas por IgE y linfocitos  $T_H2$ , este tipo más frecuente de asma habitualmente comienza en la infancia. Es frecuente un antecedente familiar de atopia, y las crisis asmáticas con frecuencia están precedidas por rinitis alérgica, urticaria o eccema. La enfermedad es desencadenada por antígenos ambientales como polvo, polen, caspa de animales y alimentos, aunque puede estar implicado cualquier antígeno.

Una prueba cutánea con el antígeno responsable produce una reacción inmediata de habón y enrojecimiento, un ejemplo clásico de la reacción de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE (Kumar *et al.*, 2008).

### ***Asma no atópica***

En el 30% restante de los pacientes con asma se considera que es “intrínseca” o “no atópica” y esta desencadenada por estímulos no inmunitarios, como ácido acetilsalicílico, infecciones pulmonares (especialmente producidas por virus), frío, tensión psicológica, ejercicio e irritantes inhalados (Kumar *et al.*, 2008).

### **Patofisiología**

En el asma de tipo alérgico existen varios componentes que se describirán a continuación como parte de la patofisiología.

#### ***Inflamación en vías aéreas***

La inflamación de las vías aéreas es una característica importante del asma. La inflamación se debe a un desequilibrio en la modulación de la respuesta y no respuesta ante antígenos que se encuentran en las vías aéreas. Participan muchos tipos celulares y numerosos mediadores inflamatorios, sin embargo la participación de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (T<sub>H</sub>2) y eosinófilos es crítica en la patogenia del asma (Kumar *et al.*, 2008). Principalmente están asociados a la sensibilización hacia alérgenos ambientales como ácaros del hogar, hongos, pelo de mascotas y algunas clases de polen (Holgate *et al.*, 2015).

#### ***Hiperreactividad bronquial***

Las células del sistema inmune innato y adaptativo actúan en conjunto con las células epiteliales para causar la hiperreactividad bronquial (BHR). La BHR se define como la tendencia del músculo liso en personas con asma, para reaccionar a estímulos no específicos como el aire, el frío o el ejercicio (Lambrecht y Hammad, 2015). Es una respuesta obstructiva exagerada del árbol traqueobronquial ante estímulos endógenos que en sujetos sanos (o al menos en no asmáticos) causaría muy poca o nula obstrucción (Bateman *et al.*, 2009). La hiperreactividad puede valorarse mediante una prueba reto, en la cual la función pulmonar se mide antes y después de que el paciente haga inhalaciones de un agente broncoconstrictor (Salas, 2010). La hiperreactividad que se cuantifica es aquella concentración mínima de agonista para lograr una reducción de 20% en el volumen espiratorio forzado (FEV) (Bateman *et al.*, 2009).

### ***Remodelación de las vías aéreas***

En el asma, por ser una enfermedad crónica de los seres humanos, la pared de la vía aérea se engruesa en proporción a la gravedad de la enfermedad y la duración por efecto de la inflamación constante. Esta remodelación implica un aumento en el músculo liso bronquial, el engrosamiento de la lámina reticular subepitelial, deposición de matriz extracelular a lo largo de la pared de las vías respiratorias, angiogénesis, proliferación neuronal y metaplasia de la mucosa epitelial; un proceso que implica la aparición de glándulas submucosas en nuevas áreas de las vías respiratorias y el aumento de producción de moco (Holgate *et al.*, 2015). El grosor de la membrana está determinado por la proporción de la acumulación y la degradación de las proteínas, incluyendo el colágeno I, colágeno-III, colágeno V, fibronectina, tenascina, lumicanos, y biglicanos. Estos componentes son secretados por los fibroblastos y miofibroblastos activados, principalmente a causa de la señalización de TGF- $\beta$  (Michalik *et al.*, 2009; Redington *et al.*, 1997).

### ***Sobreproducción de moco***

Las superficies lumbinales de las vías aéreas, así como las de los órganos gastrointestinales y reproductivos, están en contacto directo con los microbios y partículas que deben ser removidos o acomodados, para evitar su acceso a las células epiteliales subyacentes (Whitsett y Alenghat, 2015).

Asociadas a las células, las mucinas y los surfactantes secretados sirven para crear una barrera, y “balsas biofísicas” de glicoconjugados poliméricos que se unen a patógenos que son transportados por las vías respiratorias. Las mucinas son glicoproteínas grandes que comparten una gran cantidad de dominios repetidos ricos en treonina, asociados por una variedad de polisacáridos complejos (Whitsett y Alenghat, 2015). Los surfactantes son una mezcla de fosfolípidos y proteínas producidas por neumocitos alveolares tipo II que reducen la tensión superficial en los alvéolos (Chen y Kolls, 2010).

El moco de la vía aérea es secretado por glándulas submucosas y células caliciformes. Las primeras están reguladas por el sistema nervioso y producen mucinas del tipo MUC5B, mientras que las segundas son reguladas de manera local por diversas citocinas (especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13 e IL-17) y producen mucinas MUC5AC. En este sentido, la hipersecreción de moco que experimentan los pacientes con asma podría ser debida tanto al incremento del tono vagal como a la liberación de citocinas, lo cual se ve favorecido debido a que en el asma suele haber un incremento en la producción de citocinas que favorecen la hiperplasia de células caliciformes (Salas, 2010).

## ***Daño epitelial***

En el asma existen defectos de las uniones intercelulares estrechas (occludinas y claudinas), por lo que zonas extensas de la mucosa bronquial pueden quedar desprovistas de células epiteliales, además de la pérdida en la resistencia eléctrica trans-epitelial. Lo anterior hace que en el epitelio se incremente la permeabilidad al paso de sustancias exógenas inhaladas, lo cual facilita su reconocimiento por el sistema inmunológico, principalmente células dendríticas intraepiteliales ocasionando el desarrollo de alergia (Hammad y Lambrecht, 2008).

## ***Efectos de la IgE en los mastocitos, basófilos y células dendríticas***

La inmunoglobulina IgE tiene la concentración más baja de todos los anticuerpos en circulación, y es conocida principalmente por su papel en la enfermedad alérgica, en la que tiene el potencial para activar las células cebadas y basófilos cuando se une a los receptores de alta afinidad de IgE (FcεRI). Se han descrito al menos 2 tipos de receptores para esta inmunoglobulina, el receptor de alta afinidad (FcεRI) y el de baja afinidad (FcεRII o CD23). CD23 es una lectina tipo C dependiente de Ca<sup>2+</sup> que se expresa constitutivamente en linfocitos B y se asocia a la endocitosis de partículas cubiertas con IgE (Gould y Sutton, 2008). La expresión del receptor FcεRI está fuertemente influenciado por las concentraciones séricas de IgE y también por la citocina IL-4 en la respuesta tipo T<sub>H2</sub>.

La presencia de IgE específica de antígeno en el suero de pacientes con asma indica que los mastocitos y basófilos, presentan receptores para IgE de alta afinidad, importante en la enfermedad. En los mastocitos y basófilos, el receptor se compone de FcεRIα y FcεRIβ y un dímero de cadenas FcεRIγ (FcεRI αβγ<sub>2</sub>) (Gould y Sutton, 2008).

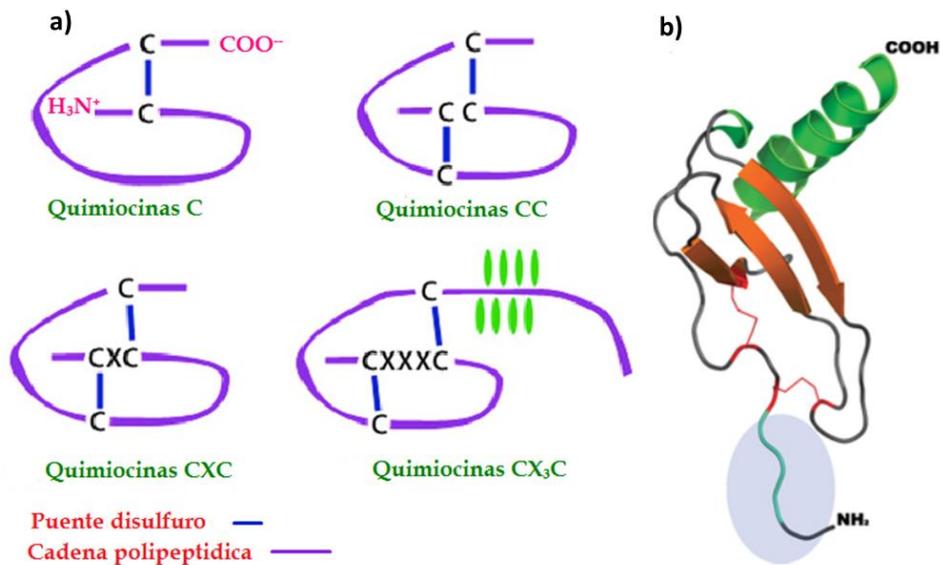
Existen diversos estudios en los que se demuestra la presencia de receptores para IgE de alta afinidad "FcεRI" en DCs pulmonares de humano y ratón, de este modo favorecen la respuesta T<sub>H2</sub> por la producción de mediadores inflamatorios inmediatos ante los alérgenos inhalados (Lambrecht y Hammad, 2012).

## **Quimiocinas**

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas con un peso molecular de 7-12 kDa (Schulz *et al.*, 2016), que controlan los patrones de migración y ubicación de las células del sistema inmunológico. Constituyen un gran familia de citocinas, de aproximadamente 50 ligandos en humano y en ratón (Griffith *et al.*, 2014). Han sido implicados en diferentes actividades, incluyendo la regulación de la

inflamación, capacidad antimicrobiana, supervivencia, angiogénesis, linfopoyesis, morfogénesis, proliferación celular y metástasis.

De acuerdo a la posición de los primeros 1 a 2 residuos de cisteína conservados en la región amino terminal, las quimiocinas han sido clasificadas en cuatro diferentes familias; CC, CXC, CX<sub>3</sub>C y XC. La estructura general de una quimiocina, consiste en un segmento alargado en la región amino terminal, tres hojas β-plegadas antiparalelas, y una hélice-α en la región carboxilo terminal. Las quimiocinas tienen una conformación que es estabilizada por dos puentes disulfuro, como se ilustra en la **Figura 12**. El plegamiento correcto es esencial para las interacciones específicas con sus receptores (Valdivia *et al.*, 2015; O'Hayre *et al.*, 2008).

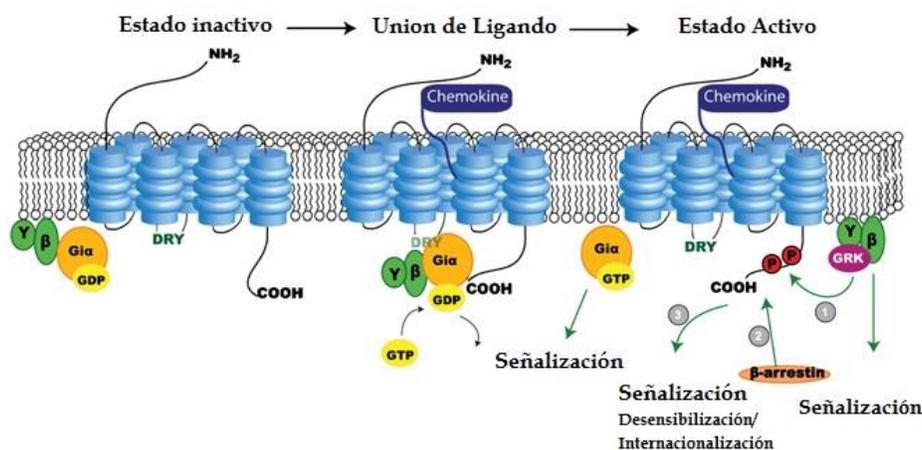


**Fig. 12. Estructura de las Quimiocinas.** a) Clases de quimiocinas. b) Estructura de IL-8. PDB ID 1IL8 o CXCL8 (O'Hayre *et al.*, 2008)

Todas las quimiocinas son solubles, con excepción de CXCL16 y CX<sub>3</sub>CL1 que son proteínas integrales de membrana, con ciertas características estructurales que apoyan la importancia funcional como quimioatrayentes leucocitarios. Estas características incluyen, estabilidad, bajo peso molecular (que facilita la difusión), y una carga neta positiva a un pH neutral; lo cual facilita la unión a heparina cargada negativamente o glucosaminoglucanos sulfatados (GAGs) (Zabel *et al.*, 2015). Los GAGs están generalmente sujetos a proteínas en la superficie celular o en la matriz extracelular formando estructuras llamadas proteoglucanos. De esta manera, cuando las células endoteliales y otras células parenquimales liberan quimiocinas, estas quedan concentradas e inmovilizadas en el tejido del sitio.

## Receptores de quimiocinas

Los receptores de quimiocinas están presentes en todas las células inmunes pero también frecuentemente en células no inmunes, incluyendo las células tumorales. Constituyen un grupo más grande de la subfamilia de receptores de siete dominios transmembranales similares a la rodopsina. Los receptores de quimiocinas se expresan diferencialmente en todos los leucocitos y se pueden dividir en dos grupos: los receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G, como se ilustra en la **Figura 13**, son sensibles a la inhibición con toxina pertussis (PTX) como señal de activación. Además hay receptores de quimiocinas atípicos los cuales no tienen activación intracelular. Hay aproximadamente 20 receptores de quimiocinas y 5 de ellos no señalizan (Schulz *et al.*, 2016).

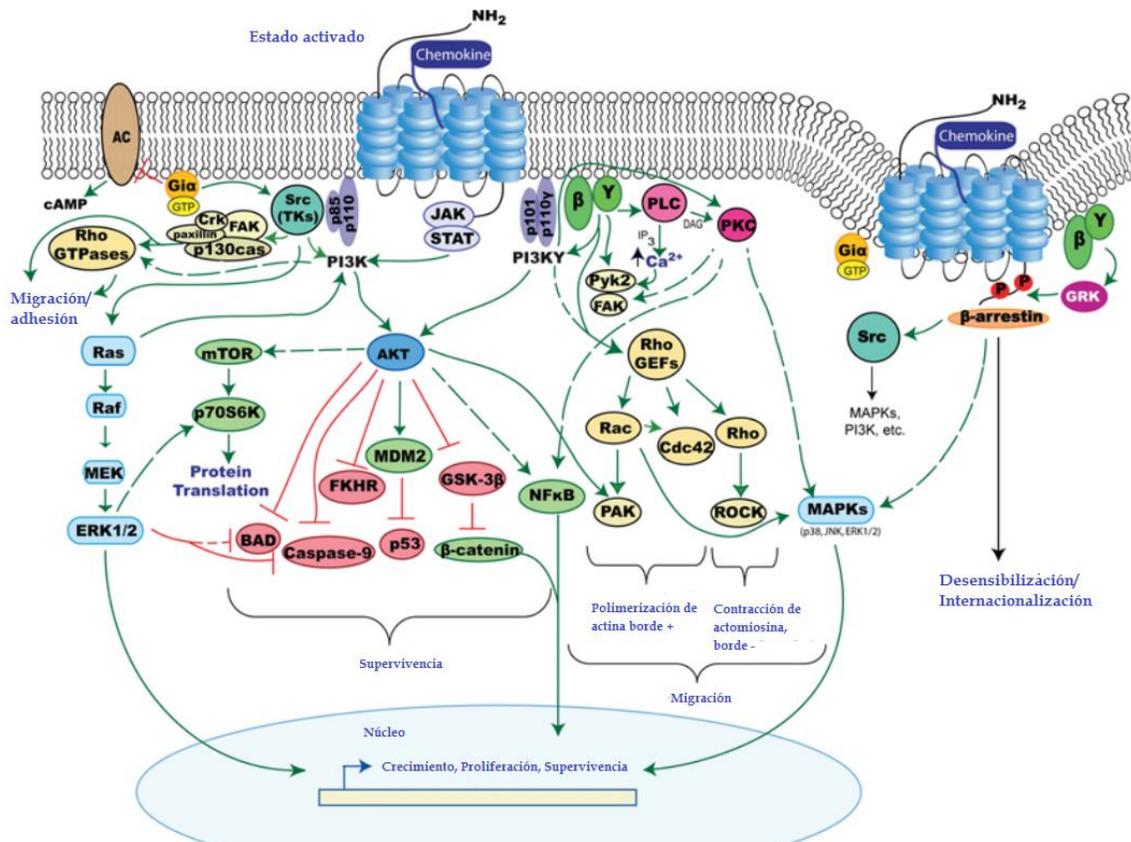


**Fig. 13 Activación del Receptor de quimiocinas.** Cuando un agonista tipo quimiocina se une a la región extracelular del receptor, este se estabiliza termodinámicamente en una conformación que activa a las proteínas G heterotrimericas dentro de la célula que a causa del cambio estructural en los aminoácidos exponen importantes regiones como la caja seca "DRY BOX", importante para la activación y señalización intracelular. Las proteínas G se componen de tres subunidades: α, β y γ. La subunidad Gα interactúa directamente con el dominio terminal de las proteínas acopladas a proteínas G (GPCR), en los bucles intracelulares dos y tres, y con la subunidad β de la proteína G, que forma un ajustado complejo con la subunidad γ. La interacción del receptor activado con la proteína G respectiva hace que ésta pase a la forma activada y a su vez modifique activando o inhibiendo a la enzima ciclasa adecuada (Modificado de O'Hayre *et al.*, 2008).

## Señalización a través de receptores de quimiocinas

La activación de proteínas G provoca la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC). PLC disocia a la molecula fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP2) en dos segundos mensajeros: Inositol trifosfato (IP3) y Diacilglicerol (DAG), los cuales disparan diversos eventos de señalización; DAG activa otra enzima llamada proteína cinasa C (PKC), e IP3 provoca la liberación de calcio. Otra cinasa unida a la membrana plasmática es fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) que no fosforila proteínas sino principalmente fosfolípidos de inositol y tanto los receptores tirosina quinasa (RTK) como los GPCR y JAK/STAT la pueden activar induciendo varias vías de señalización intracelulares, que

conducen a la activación de AKT, Rac, Rho GTPasas y Cdc42, que a su vez promueven la polimerización y contracción de actomiosinas los cuales son importantes para establecer adhesiones focales y la activación de otras moléculas implicadas en la migración de las células tal como se puede ver en la **Figura 14**.



**Fig. 14 Señalización a través de un receptor de quimiocinas.** Uno de los primeros acontecimientos de la migración de células implica la polarización celular en respuesta a un quimioatrayente mediante una compleja regulación celular vía intracelular.

En resumen, las quimiocinas son proteínas con capacidad quimioatrayente encargadas del tráfico leucocitario en tejidos linfoides y no linfoides. Se han descrito como duales, por la expresión celular en situaciones basales e inflamatorias. Por ejemplo las quimiocinas son esenciales para el reclutamiento de progenitores hematopoyéticos dentro del timo, y la retención de linfocitos T dentro de este órgano.

El timo es el principal lugar de maduración de los linfocitos T. Si se extirpa el timo en un ratón recién nacido, este animal no producirá linfocitos T maduros. Los linfocitos T en desarrollo en el timo se llaman timocitos. Los timocitos más inmaduros se encuentran en el seno subcapsular y la región cortical externa del timo. Desde aquí, los timocitos migran a través de la corteza, donde tienen lugar la mayoría de los acontecimientos de maduración, que están relacionados con el

microambiente tímico y la disposición anatómica que proporciona los estímulos necesarios para la proliferación y maduración de los timocitos. Dentro de la corteza, las células epiteliales corticales tímicas forman una red de extensiones citoplasmáticas, alrededor de los cuales deben pasar los timocitos hasta alcanzar la médula (Abbas *et al.*, 2015).

Los progenitores de los timocitos expresan el receptor de quimiocinas CCR9, que se une a la quimiocina CCL25, que se produce en la corteza tímica (Youn *et al.*, 1999). Por tanto, la entrada de precursores en el timo depende de CCL25 y CCR9. Además las quimiocinas como CCL21 y CCL19, que son reconocidas por el receptor de quimiocinas CCR7 presente en los timocitos median el movimiento guiado de los linfocitos T desde la corteza a la médula.

En ratones deficientes en ambos genes *CCR7* y *CCR9* fueron caracterizados con una reducción masiva en el número de timocitos, indicando que ambos receptores cooperan en la colonización del timo. Sin embargo en ratones *CCR9* *-/-*, los timocitos fallan, para acumularse en la zona subcapsular (SCZ) pero dispersos en toda la corteza. Así pues en ratones deficientes de *CCR9* *-/-* se muestra un desarrollo normal de los timocitos, estos hallazgos sugieren que *CCR9* guía los linfocitos DN3 hacia la SCZ (Reinhardt *et al.*, 2014).

Incluso en linfocitos T  $\gamma\delta$  vistos por fluorescencia, han revelado que la salida tímica de linfocitos  $\gamma\delta$  se reduce en ratones *CCR7* *-/-*, resultando conteos celulares reducidos en órganos linfoides secundarios. Al contrario de ratones deficientes de *CCR9* *-/-*, se encuentra un mayor número de linfocitos  $\gamma\delta$  en el bazo y en ganglios linfáticos (Reinhardt *et al.*, 2014). Lo que sugiere que *CCR7* y *CCR9* son necesarios para la correcta posición de los linfocitos  $\gamma\delta$  en la médula y corteza respectivamente, además de que podría afectarse la migración intratímica y la motilidad de estas células.

Además se ha descrito que la quimiocina CCL25 es un regulador homeostático muy importante para el reclutamiento de linfocitos T intraepiteliales hacia intestino delgado pero no en colon, y que participa en padecimientos inflamatorios intestinales como la enfermedad de Crohn (Papadakis *et al.*, 2000).

## **CCR9/CCL25**

La quimiocina CCL25 (TECK por Thymus Expressed Chemokine), se caracterizó originalmente como un quimioatrayente de células dendríticas, timocitos y macrófagos. Además la expresión de GPR-9-6 actualmente “CCR9” es muy alta en timo y baja en los ganglios linfáticos y el bazo tanto en humano como en ratón (Zaballos *et al.*, 1999). Incluso en la transición de los timocitos de DN a DP

se incrementa la expresión de CCR9 y esta expresión está involucrada en el desarrollo de estas células en el timo (Svensson y Agace, 2006).

CCR9 se encuentra codificado por un gen único en el cromosoma 3 en humanos y 9 en ratón. Se reconocen 2 isoformas en humanos, CCR9A y CCR9B, productos de un procesamiento alternativo del mRNA y una traducción alternativa en los puntos de inicio (Metionina 1 en el exón 2 para CCR9A y Metionina 13 en el exón 3 para CCR9B). Los respectivos productos difieren por 12 aminoácidos en la región amino terminal, lo que da origen a proteínas de 369 aa y 357 aa respectivamente. Además se sabe que CCR9A presenta mayor sensibilidad hacia CCL25 y que expresado en un orden de 10:1 en comparación con CCR9B en todos los órganos examinados (Svensson y Agace, 2006).

Wurbel y colaboradores (Wurbel *et al.*, 2001), en un ratón KO (knockout) para CCR9, encontraron que en periferia en ausencia de CCR9<sup>-/-</sup> incrementaba el número de células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> presentes en ganglios y bazo. Además, identificaron a este receptor en los linfocitos T de la lámina propia en intestino delgado y que el receptor de quimiocinas dirige a estas células para migrar hacia el intestino porque su ligando TECK/CCL25 se expresa principalmente en células epiteliales de intestino delgado y lámina intraepitelial (IEL) de humanos (Wurbel *et al.*, 2001).

### **Quimiocinas asociadas a un proceso inflamatorio**

Bajo condiciones inflamatorias, varias poblaciones celulares tienen acceso a los ganglios y placas de Peyer a través del endotelio vascular. El reclutamiento de monocitos proporciona un ejemplo de cómo los tejidos no linfoides pueden modular el reclutamiento a control remoto a través de CCL2 y CXCL9 para la entrada de monocitos a ganglios inflamados. Se ha propuesto que bajo condiciones inflamatorias la interacción de CXCL2-CXCR2 guía a los neutrófilos por las HEVs. pDCs expresan CD62L, CXCR3, y poco CCR7 para migrar a los ganglios linfáticos en condiciones inflamatorias. Otro ejemplo son las células de Langerhans que migran de la piel hacia los ganglios por la sobreexpresión de CCL22. Además no solo las células inmunes alteran su sensibilidad hacia diferentes señales quimiotácticas durante una respuesta inflamatoria en curso, sino que las células del estroma también muestran plasticidad con respecto a la expresión de quimiocinas. CCL21 y CXCL13 son reguladas transitoriamente por células reticulares fibroblásticas (FRCs) y células dendríticas foliculares (FDCs) en el bazo después de la infección con el virus de corimeningitis linfocítica y otros patógenos (Schulz *et al.*, 2016).

Los análisis inmunohistoquímicos en biopsias pulmonares de pacientes asmáticos alérgicos y en pulmones extraídos de ratones durante modelos inflamación alérgico de las vías respiratorias han determinado una serie de quimiocinas que se expresan *in situ* ver **Tabla 1**.

**Tabla 1. Fuentes celulares de quimiocinas y sus receptores implicados en el asma (Lloyd, 2002).**

Quimiocina	Fuente celular en el pulmón	Receptor afin	La expresión del receptor en el asma
Eotaxina (CCL11)	Células epiteliales, macrófagos alveolares, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, eosinófilos, linfocito	CCR3	Eosinófilos, basófilos, mastocitos
Eotaxina-2 (CCL24)	Desconocido	CCR3	Eosinófilos, basófilos, mastocitos
RANTES (CCL5)	Células epiteliales, músculo liso, eosinófilos	CCR1, CCR3, CCR5	Eosinófilos, monocitos, linfocitos T activados
MCP-1 (CCL2)	Células epiteliales, fibroblastos, macrófagos alveolares	CCR2	Los monocitos, macrófagos, basófilos, linfocitos T activados
MCP-3 (CCL7)	Células epiteliales	CCR1, CCR2, CCR3	Eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, células T activadas
MCP-4 (CCL13)	Células epiteliales	CCR2, CCR3	Eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T activados
MDC (CCL22)	Músculo liso, macrófagos alveolares, epitelio bronquial	CCR4	Monocitos, células Th2
TARC (CCL17)	Células epiteliales bronquiales	CCR4	Monocitos, células Th2
MIP-1 $\alpha$ (CCL3)	Células epiteliales	CCR1, CCR5	Eosinófilos, monocitos, linfocitos T activados
IL-8 (CXCL8)	Macrófagos alveolares	CXCR1, CXCR2	Los neutrófilos
*IL-8, interleucina-8; MCP, proteína quimiotáctica de monocitos; MDC, quimiocina derivada de macrófagos; MIP, proteína inflamatoria de macrófagos; RANTES, reguladas tras la activación, normal, de células T expresa y secreta; TARC, timo y regulada por activación de quimiocinas.			

La participación de las quimiocinas en diversos procesos inflamatorios; incluyendo la maduración y la migración de las células inmunes, ha generado intentos de explorar las interacciones de los receptores de quimiocinas con fines terapéuticos.

En resumen se ha mencionado que en procesos inflamatorios, la importancia de los receptores de quimiocinas y sus ligandos se debe al retorno de la homeostasis, sin embargo por ejemplo no se conoce a detalle el papel de CCR9 en procesos inflamatorios.

Aunque recientemente se ha descrito un incremento en los niveles de CCL25 *in situ* durante un proceso inflamatorio pulmonar (López-Pacheco *et al.*, 2016), lo que sugiere un papel importante para el receptor de quimiocinas CCR9 en el reclutamiento de células durante la inflamación, aunque no está claro su papel a detalle durante el desarrollo de la alergia pulmonar y que poblaciones celulares se ven afectadas.

## Planteamiento del problema

¿El receptor CCR9 se expresa en células dendríticas de mucosa pulmonar durante un proceso inflamatorio alérgico pulmonar?

## Justificación

CCR9 es expresado por las DCs que se reclutan a mucosa intestinal, sin embargo aún no está clara la participación de este receptor en el reclutamiento de DCs durante la inflamación alérgica pulmonar por lo tanto es de interés analizar la expresión de este receptor en la células dendríticas y asociarlo a su función durante la inflamación alérgica pulmonar.

## Hipótesis

CCR9 participa en el proceso de reclutamiento de las células dendríticas durante el proceso inflamatorio alérgico pulmonar.

## Objetivo general

Caracterizar las células dendríticas CCR9+ y su función en la regulación del proceso inflamatorio en un modelo de alergia pulmonar.

## Objetivos particulares

1. **Establecer un modelo de alergia pulmonar en ratones C57BL/6 silvestres (CCR9+/+) y en ausencia de CCR9 (CCR9-/-).**
  - a) Analizar las poblaciones de células en lavado broncoalveolar.
  - b) Cuantificar inmunoglobulinas específicas para ovoalbúmina (OVA) específicas en suero de ratones sensibilizados.
  - c) Analizar el infiltrado celular intersticial y la producción de moco en ratones inmunizados (CCR9 +/+ y CCR9 -/-).
2. **Establecer el efecto de la ausencia de CCR9 en el reclutamiento de células dendríticas.**
  - a) Analizar la localización espacio-temporal de células dendríticas DEC-205 en ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- de lavado broncoalveolar (LBA).
  - b) Caracterizar las células dendríticas (DCs) en ratones sensibilizados después de 2,6 y 24 horas en CCR9 +/+ y CCR9 -/-, y la expresión de CCR9 *in vivo*.
  - c) Analizar la expresión de marcadores de activación en DCs (CD80+, CD86+, y MHC II de ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- *ex vivo*.
3. **Analizar poblaciones de linfocitos y eosinófilos en LBA asociados a la inflamación alérgica.**

## Materiales y Métodos

### Cepa de ratón

Se utilizaron ratones transgénicos C57BL/6 “knock-out” (CCR9  $-/-$ , KO) para el receptor de quimiocinas CCR9, que se mantienen en un ambiente libre de patógenos específicos (SPF) en el Bioterio en la sede del tercer circuito exterior del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Donados por el Dr. M.A Wurbel (Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina de Harvard, Boston, Massachusetts, EUA).

### Obtención de DNA

Se cortaron aproximadamente 0.5 cm de las colas de los ratones C57BL6 CCR9 y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se les añadieron 200  $\mu$ L de una solución de NaOH 50 mM y se incubaron a 80-90 °C durante 1-2 horas, hasta que la cola se disgregó completamente. Posteriormente los tubos se incubaron a 4 °C durante 10 minutos y se les agregaron 150  $\mu$ L de Tris 40 mM pH 5. Enseguida, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Se recuperaron 2  $\mu$ L del sobrenadante para la amplificación de ADN por PCR (Polymerase Chain Reaction).

### Genotipificación de ratones CCR9 $-/-$

Se utilizaron 2  $\mu$ L de lisado obtenido a partir de la cola de ratón. Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo: 2  $\mu$ L de Buffer de reacción para la Taq Polimerasa sin  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 1  $\mu$ L de cebador específico 10 mM para amplificar sentido +, 1  $\mu$ L de cebador específico central 10 mM, 1  $\mu$ L de cebador específico antisentido 10 mM, mix de dNTPs 10 mM cada uno, 0.1  $\mu$ L de Taq Polimerasa (Invitrogen) y agua tratada con DEPC para un volumen final de 25  $\mu$ L. Las muestras se amplificaron en un termociclador (**Figura 15**); (MyCycler Bio Rad) a las condiciones especificadas para los oligonucleótidos ver anexo 1. Se corrieron 10  $\mu$ L de las muestras con 3  $\mu$ L de amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X para comparar el tamaño del producto con el marcador de peso molecular de 1 kB.

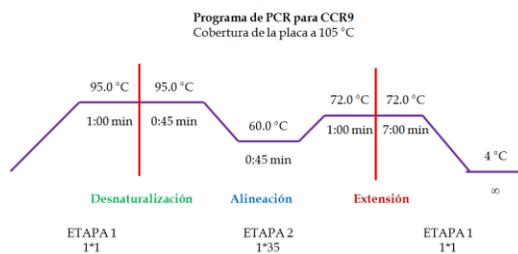
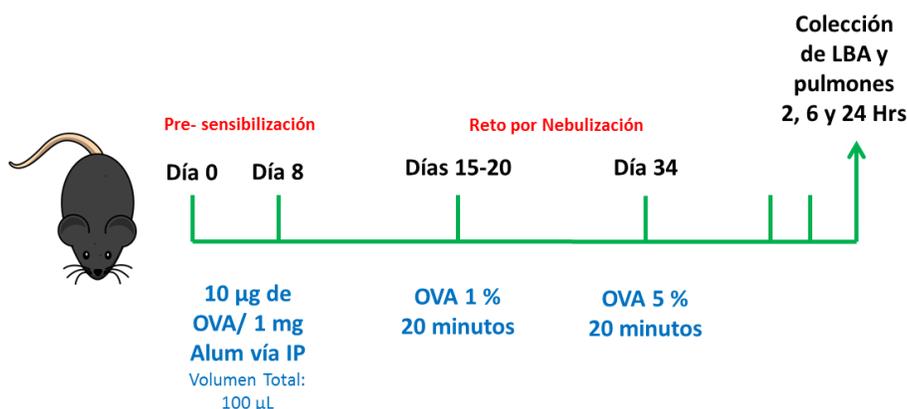


Fig. 15. Programa de amplificación de ADN por PCR.

## Inmunización

Para inducir inflamación alérgica pulmonar, ratones hembras C57BL/6 fueron sensibilizados por primera vez con 10 µg/µL de OVA/ en 1 mg de hidróxido de aluminio (Alum) en 80 µL de solución salina inyectable (SSI) vía intraperitoneal (IP) y repetido al día 8, seguido de retos por nebulización en los días 15-20 con OVA al 1%, y un último reto en el día 34 con OVA al 5 %, durante 20 minutos cada reto. El análisis se efectuó a las 2, 6 y 24 después de este último reto. Se usaron 3-4 ratones por grupo como se ve puede observar en la **Figura 16**.



**Fig. 16. Protocolo de asma alérgica.** Los ratones hembras de la cepa C57BL/6 fueron sensibilizados en los días 0 y 8 por una inyección intraperitoneal (IP) con una mezcla de ovoalbúmina y 1 mg de  $AlOH_3$  en PBS. Los ratones fueron retados por exposición al aerosol de OVA por 20 minutos los días 15-20 y el día 34. Se colectaron lavados broncoalveolares (LBA) después del último reto en una cinética de 2, 6 y 24 horas.

## Aislamiento de células de pulmón

Al día 34 del protocolo de experimentación, los ratones C57BL/6 WT y CCR9 KO fueron anestesiados con 40-80 µL de ketamina/xilazina/PBS 1X (1:2:1), realizando una punción cardíaca para coleccionar el concentrado eritrocitario y posteriormente separar por centrifugación para coleccionar el suero. El análisis se realizó en los siguientes tiempos: 2, 6 y 24 horas después de último reto. Los lavados broncoalveolares (LBA) fueron coleccionados mediante un lavado con 5 mL de PBS 1X a través de la tráquea. Las células se contaron en un citómetro Attune (Acoustic Focusing Cytometer por Life Technologies).

## Conteo diferencial por cito centrifugación

El número total de células fue determinado con la cámara de Neubauer.  $2 \times 10^4$  células se colocaron en la cito-centrifuga y se fijaron con Diff-Quick Fixative set (Dade Behring, Newark, DE), y teñidas con colorante de Romanosky. Los números de células del LBA se determinaron contando 300 células por duplicado. El porcentaje de eosinófilos, neutrófilos, células mononucleares, y linfocitos

se determinaron de un conteo de 2 laminillas a 40x por cada ratón. Estos porcentajes fueron multiplicados por el número total de células para obtener las proporciones de las diferentes poblaciones celulares.

### **Cuantificación de IgE mediante ELISA**

Se colectó el suero de ratones inmunizados con OVA, se determinó la cantidad relativa de IgE específica de OVA. Las mediciones se realizaron con la técnica de ELISA. Se utilizaron placas de 96 pozos (Santa Cruz) sensibilizando durante toda la noche a 4 °C con 20 µg de OVA (Sigma grado V) disuelta en 100 µL de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 8.3. Al día siguiente se lavaron con 200 µL de PBS 1x pH 7.4/Tween 20, 0.05%. Posteriormente las placas se bloquearon con 200 µL de PBS 1x pH 7.4/BSA 1 % durante 1 hora a TA y se lavaron con PBS 1x pH 7.4/Tween 20 0.05%, después se agregó el suero diluido 1:10 en PBS 1x pH 7.4/BSA 1 % incubándose 1 hora a TA. Después se incubó con 0.5 µg de anticuerpo anti-IgE de ratón elaborado en rata (Biolegend) durante una hora a TA en agitación. Posteriormente se incubó con anticuerpo acoplado a biotina anti-rata elaborado en cabra 1:2000 (Zymed) durante 1 hora a TA. Se lavó y agregó Avidina-HRP (Horseradish peroxidase) 1:250 durante 30 minutos. Finalmente se reveló con 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) "Microwell, peroxidasa substrate KPL" incubándose durante 5 minutos en obscuridad a TA. Para detener la reacción se agregó 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y finalmente se midió la densidad óptica en el lector de ELISA a la longitud de onda de 450 nm. Los datos se reportan como D.O como medida indirecta de la concentración de IgE.

### **Tinción de antígenos superficiales e intracelulares mediante Citometría de Flujo**

Las células aisladas de lavado broncoalveolar (BAL) de ratones WT/OVA, KO CCR9/OVA, y WT/SS se utilizaron para identificar por FACS. La tinción se realizó en placas de 96 pozos en donde se colocó 1x10<sup>6</sup> células por condición. Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 segundos, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 µL de las diluciones de los anticuerpos marcados con fluorescencia contra CD3, CD4, CD25, CD8, CCR9, SiglecF, CCR3, Gr-1, CD11c, CD103, CD86, F4/80, y el complejo mayor de Histocompatibilidad II (MHC II) ver anexo para la concentración. La tinción se realizó a 4 ° C; después de la incubación se puso en contacto con el reactivo bloqueador universal (Universal Blocking Reagent 10X) durante 30 minutos. Las poblaciones específicas de células se identificaron mediante el uso de los fenotipos indicados para cada población celular de acuerdo al marcador de superficie celular: Linfocitos T, CD3+, CD4+, CD25+, CD8+, Foxp3+, CCR9+; Eosinófilos, SiglecF+, CCR3+, Gr-1low/+, CD11c- y CCR9+; Células dendríticas (DCs), CD11c+, CD103+, CD80+, CD86+, F4/80<sup>low</sup>, MHC II<sup>hi</sup>, CCR9+ utilizando el citómetro Attune (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific).

## **Diferenciación de células dendríticas a partir de progenitores de médula ósea *in vitro***

Dos ratones hembras C57BL/6 de 6-8 semanas de edad se sacrificaron por dislocación cervical CCR9 +/+ y CCR9 -/- sanos. En un ambiente limpio se rociaron con alcohol al 70% y se realizó una incisión a nivel de tórax para retirar la piel de la parte inferior del animal, posteriormente se sostuvo firmemente la extremidad inferior a nivel de tobillo, y se realizó una incisión en la articulación coxo-femoral para separar la extremidad inferior, posteriormente se separaron los músculos que recubren al hueso dejando intacta la articulación femorotibial desde el tobillo.

Se obtuvo médula ósea de fémures y tibias de ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- y se colocaron en cajas Petri con medio RPMI (GIBCO by Life Technologies) adicionado con 10% de Suero fetal Bovino (SFB) (GIBCO by Life Technologies). Posteriormente se pasaron 3 mL de RPMI/ SFB 10 % a través de los huesos, mediante el uso de jeringa y aguja de 27 G, para drenar la médula ósea la cual fue recolectada en una caja de Petri. La médula ósea se disgregó mediante el uso de la jeringa sin aguja, se filtró con una malla de nylon Mesh Roll (150 microns square) y se colectó en un tubo estéril de 15 mL, el cual se centrifugó a 1500 rpm durante 1 minuto para finalmente ser resuspendidas en 3 mL de RPMI/ SFB 10 %. Se obtuvo una alícuota de 200  $\mu$ L, a la cual se lisaron los eritrocitos con ACT (Tris buffer Amonium Chloride), para el recuento de las células. Finalmente se sembraron  $5 \times 10^6$  células en 10 ml de RPMI/ SFB 10 % y se agregó sobrenadante de células CHO productoras del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) en cajas Petri. Al tercer día se adicionaron 8 mL de RPMI/ SFB 10 % y 5% y 10 % de sobrenadante de células CHO productoras de GM-CSF. Al quinto día, se adicionó 1  $\mu$ g/mL de LPS de *E. coli* a un grupo experimental para inducir la maduración de las células dendríticas y 24 horas después se recolectaron las células no adherentes y se descartaron las células adherentes (macrófagos).

## **Caracterización de DCs obtenidas de cultivo de médula ósea por FACS**

Se confirmó la presencia de DCs mediante la identificación de moléculas de superficie. La tinción se realizó en placas de 96 pozos en donde se colocó  $1 \times 10^6$  células por condición. Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 segundos, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20  $\mu$ L de las diluciones de los anticuerpos que se utilizaron tales como anti-CD11c-APC Cy7 (BD Biosciences, San José, California, USA), anti-MHC II (IA/IE)-PercP, anti-CD80-biotina, anti-CD86-Pe, preparados en buffer de FACS (PBS 1x pH 7.4/SFB 2%/Azida de Sodio 0.01%), y estreptavidina PeCy7. Las placas se incubaron 20 minutos a 4 °C en oscuridad y se lavaron con 200  $\mu$ L de Buffer de FACS. Posteriormente se fijaron las células con 200  $\mu$ L de paraformaldehído al 1% en PBS 1x pH

7.4. Finalmente se adquirieron en el citómetro Attune y el programa Flow Jo para analizar las muestras CCR9 +/+ y CCR9 -/-.

## **Histología**

Los pulmones fueron insuflados con un compuesto crioprotector (OCT), manteniéndose a -70°C. Se realizaron criocortes de 5 µm, en un micrótomo (Leica CM1900) y los cortes se colocaron en portaobjetos tratados previamente con Poly-L-Lisina (Sigma). Los cortes se fijaron en acetona/cloroformo 1:1 fríos durante 30 minutos, a 4°C. Posteriormente fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) para el análisis morfológico del infiltrado inflamatorio y la técnica de Schiff (PAS) para la evaluar la producción de mucinas.

## **Inmunohistoquímica**

En los cortes de pulmón se bloqueó la actividad de peroxidasas endógenas del tejido saturando la enzima con peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 6% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después se realizaron 2 lavados con PBS 1x pH 7.4/BSA 0.1 %; cada lavado fue de al menos 3 minutos. En lo sucesivo los lavados se realizaron de manera idéntica. Además se bloqueó la biotina endógena del pulmón con clara de huevo al 3%. Para evitar la unión inespecífica de anticuerpos se bloquearon los receptores Fc incubando con suero humano al 2% durante 1 hora a TA. Para la identificación de células positivas DEC-205 los cortes se incubaron durante 12 horas a 4°C con anticuerpo primario de rata anti-ratón DEC-205, posteriormente se realizaron 2 lavados de 3 minutos cada uno con PBX 1x pH 7.4/BSA 0.1%. El anticuerpo secundario anti-rata acoplado a biotina se incubó por una hora también a TA. El tejido se incubó además con estreptavidina POX-HRP por 15 minutos a (TA). La reacción se reveló con el cromógeno diaminobencidina (DAB). Una vez identificada la marca positiva y marca negativa en el control de isotipo, las muestras se lavaron con PBX 1x pH 7.4/BSA 0.1% para detener la reacción. Las muestras posteriormente se tiñeron 30 segundos con Hematoxilina de Gill y después con carbonato de Litio 30 segundos para finalmente someterse a una desecación rápida. Se montaron como muestras permanentes con resina Polymount (Polysciences). La cuantificación de las células dendríticas se evaluó empleando un microscopio de campo claro con aumentos de 10, 20 y 40x y las fotografías se tomaron con un microscopio Axioscan de Zeiss.

## **Evaluación de la frecuencia celular por área de tejido pulmonar**

Se contabilizó el número de células con marca positiva para DEC-205 por campo a un aumento de 40x, analizándose un total de 20 campos de muestras representativas para las células dendríticas intersticiales, alveolares y para dendríticas perivenulares fueron 6 campos (bronquios). Se

analizaron todos los grupos en la cinética de 2, 6 y 24 horas después de la última inmunización además de los controles, utilizándose 2-3 ratones por grupo. La frecuencia celular se calculó contando células positivas por campo (con morfología dendrítica), para cada una, posteriormente se realizó el cálculo de células positivas por mm<sup>2</sup>, considerando el aumento al cual fueron contadas y utilizando las siguientes formulas:

Diámetro de campo: Cifra de campo visual/aumento del objetivo

Diámetro de campo: 20 mm /40x

Diámetro de campo: 0.5 mm

Una vez obtenido el diámetro de campo, se obtuvo el área de acuerdo con la siguiente formula.

Área de campo:  $(\pi) (r)^2$

Área de campo:  $(3.1416) (0.25)^2 = 0.196349 \text{ mm}^2$

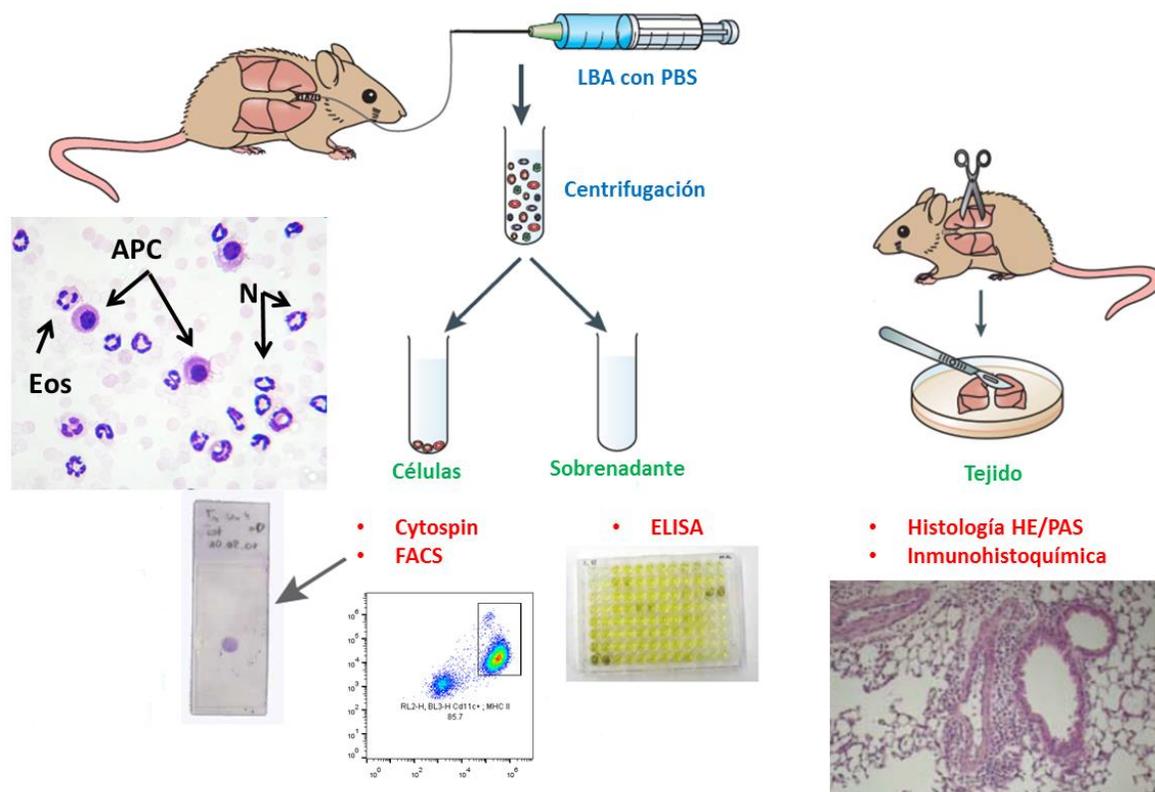


Fig. 17. Resumen de la estrategia experimental del análisis *in vivo*.

## Análisis Estadístico

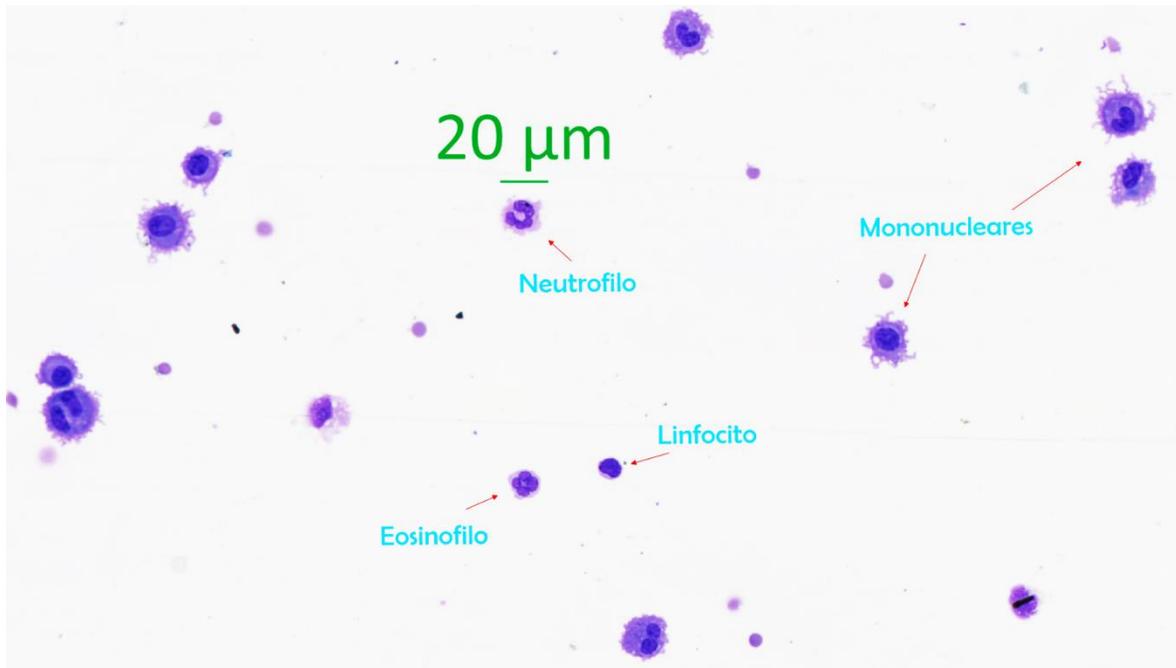
El análisis estadístico se llevó a cabo para poder determinar las diferencias entre el control y muestras tratadas CCR9<sup>+/+</sup> y CCR9<sup>-/-</sup>. Utilizando la prueba de T de Student, no pareada, utilizando GraphPad Prism 6. Las diferencias de  $P < 0.05$  fueron consideradas como significativas.

## Resultados

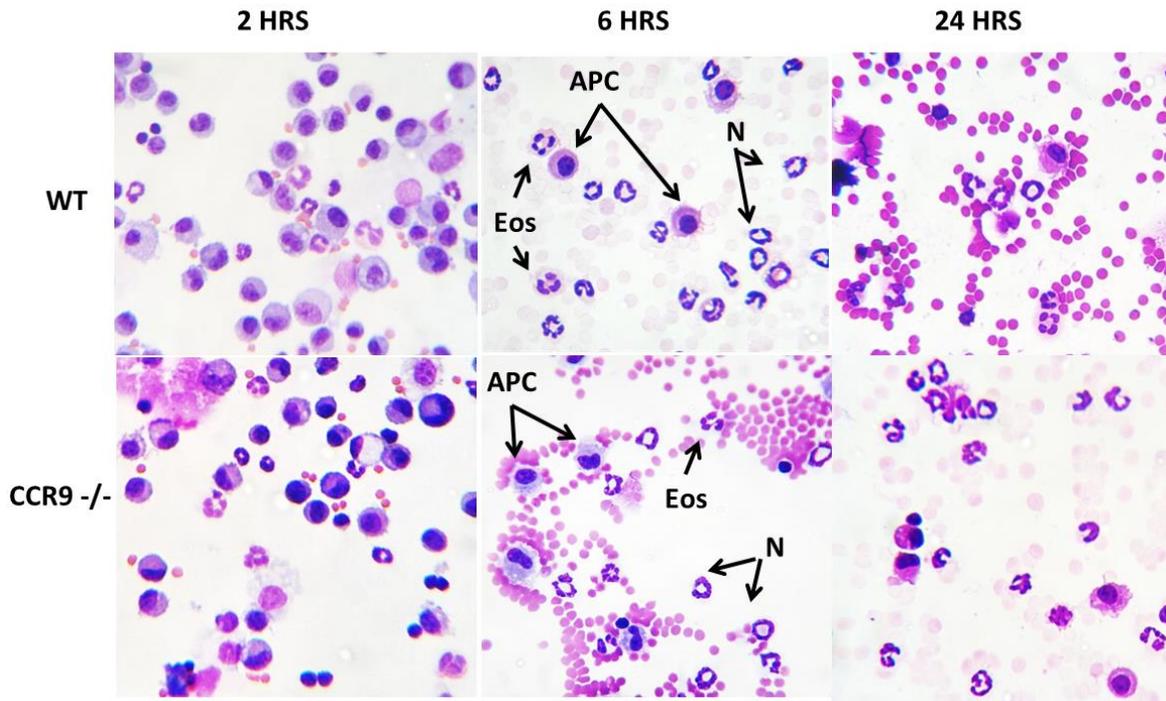
Durante la sensibilización a ciertos alérgenos que se encuentran en el medio ambiente y que son inocuos para la mayoría de las personas, en ciertos individuos causan alteraciones en las mucosas. De manera que los modelos de alergia en ratón nos permiten extrapolar mecanismos inmunológicos que ocurren en el padecimiento en humanos. Para ello proponemos un modelo de sensibilización con OVA, el cual ya ha sido validado por otros grupos de investigación, y que se validó como nuestro modelo con las características típicas de la inflamación alérgica en pulmón que son: infiltrado celular de basófilos, eosinófilos y neutrófilos tanto en lavado broncoalveolar como en tejido, además del incremento de IgE en suero e hiperproducción de moco.

### *Caracterización morfológica de Lavado BroncoAlveolar (LBA)*

La migración es una parte esencial para iniciar la respuesta inmunológica en el pulmón después de un estímulo inflamatorio. Entre las primeras 2 y 24 horas después del estímulo con OVA, al analizar un LBA por cito-centrifugación se observan poblaciones típicas de un LBA (**Figura 18**). En los lavados broncoalveolares se observó una dinámica celular en la que diferentes poblaciones celulares eran reclutadas al pulmón y que esta es dependiente del tiempo. El reclutamiento de células a pulmón en ratones inmunizados principalmente están presentes células mononucleares y linfocitos a las 2 horas pero existen un recambio entre las 2 y 6 horas ya que se puede observar una disminución en los mononucleares pero un incremento en células con morfología granulocítica que se mantienen hasta las 24 horas (**Figura 19**). Por otro lado se comparó el mismo fenómeno con el ratón deficiente de CCR9 <sup>-/-</sup> y se observó la misma dinámica, sin embargo en los conteos diferenciales se encontraron diferencias significativas en los números totales, lo que correlacionaba con lo reportado previamente (López-Pacheco et al., 2016).

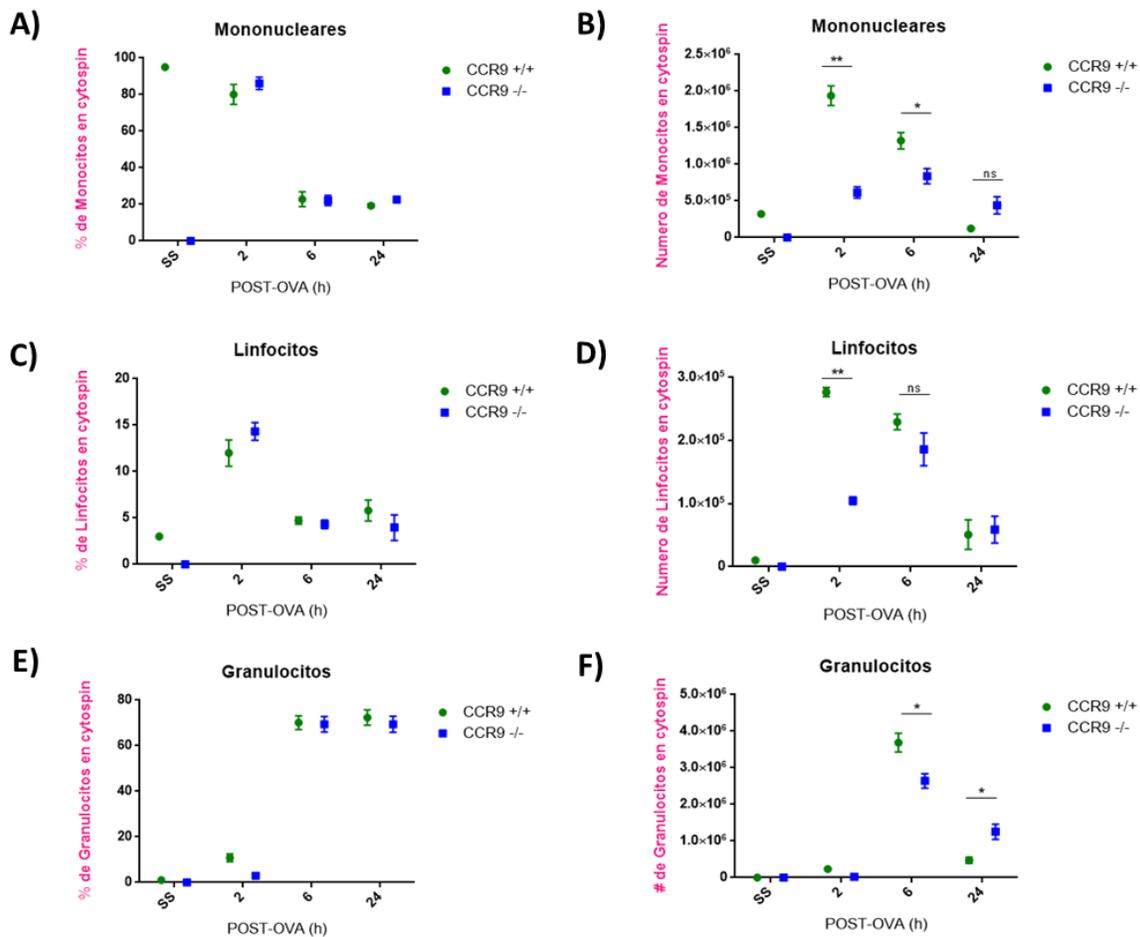


**Fig. 18. Caracterización morfológica de un Lavado BroncoAlveolar (LBA).** Las células aisladas fueron teñidas con tinción de Romanowsky y analizadas mediante el programa de AxioScan ZEN. Los principales tipos de células; Mononucleares, Linfocitos, Eosinófilos y Neutrófilos de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad, después de la estimulación con OVA.



**Fig. 19 Dinámica temporal de células típicas de un Lavado BroncoAlveolar (LBA) en ratones inmunizados.** Imágenes representativas de la cinética post-inmunización para ver efecto de la inmunización tanto en ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/-. Las células aisladas fueron teñidas con tinción de Romanowsky y analizadas mediante microscopía de campo claro.

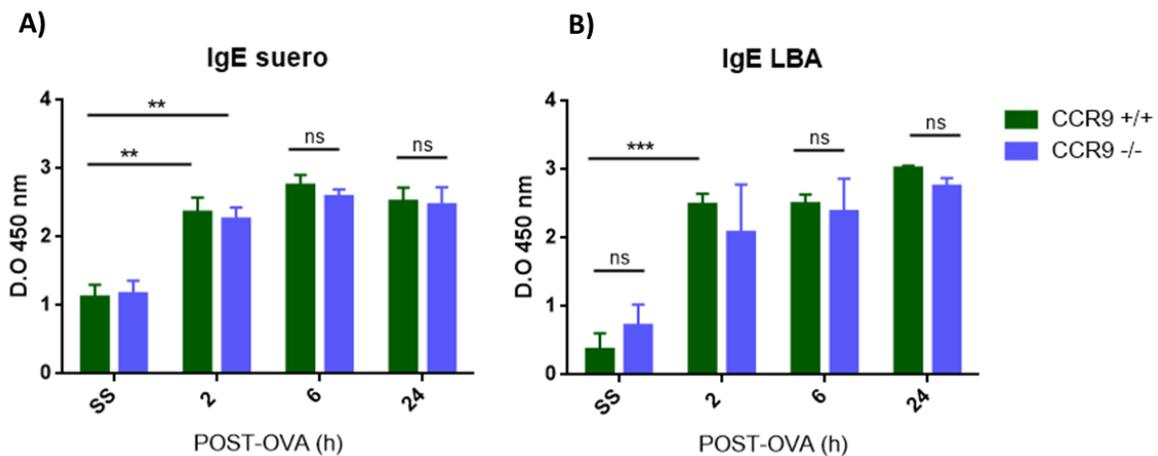
En cuanto a porcentaje, no se encontraron diferencias entre los ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- para los linfocitos, células mononucleares y granulocitos (**Figura 20 a, c y e**), sin embargo si encontramos diferencias en los números totales. Se observó que había una disminución en el reclutamiento de las células mononucleares a las 2 y 6 horas, pero sin diferencias a las 24 horas (**Figura 20 b**). En cuanto a los linfocitos se encontró una correlación con las células mononucleares ya que también se mostraban reducidos a las 2 horas, lo cual indica una relación entre estas poblaciones (**Figura 20 d**). Por otro lado, también los granulocitos se encontraron disminuidos a las 6 horas e incrementados a las 24 horas (**Figura 20 f**), lo cual sugiere que esta disminución podría deberse a la falta de células mononucleares a las 2 horas ya que por sus características morfológicas se sabe que las células dendríticas y los macrófagos pertenecen a esta población. En conclusión la caracterización morfológica limitaba un análisis de células dendríticas lo que nos llevó a realizar una fenotipificación más fina por citometría de flujo.



**Fig. 20** Cinética de reclutamiento de las poblaciones celulares en LBA en Porcentaje y Números totales. (A) Mononucleares, (B) Linfocitos, (C) Granulocitos. Del lado izquierdo se muestra el porcentaje y del lado derecho el número total de acuerdo al LBA. El número total es de 300 células para obtener el porcentaje. Un experimento representativo de 4. Los datos representan la media + s.e.m., n= 4 WT y 3 KO. La significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.

### *IgE-OVA específica durante la inflamación pulmonar*

La IgE tiene un papel importante en procesos alérgicos inflamatorios como rinitis, alergia, asma y dermatitis atópica. Después de realizar la caracterización de un LBA se evaluaron los niveles séricos de IgE específica contra OVA medida por ELISA. Las células plasmáticas incrementan la secreción de IgE específica de OVA tanto en suero como en lavado broncoalveolar (BAL), en ratones sensibilizados CCR9 +/+, pero en ausencia de CCR9 no se ve afectada la producción de IgE-OVA específica. Los resultados demuestran un aumento significativo en los niveles de IgE-OVA específica contra OVA en los grupos de ratones que fueron sensibilizados con OVA, característico del asma alérgica comparado con los grupos control (Solución salina) y que el incremento es homogéneo durante las 2, 6 y 24 horas después de la sensibilización, encontrándose tendencias en los ratones deficientes de CCR9 pero nunca significativa. Estos datos sugieren que CCR9 no es determinante para la secreción de IgE, como se puede observar en la (Figura 21 a y b).

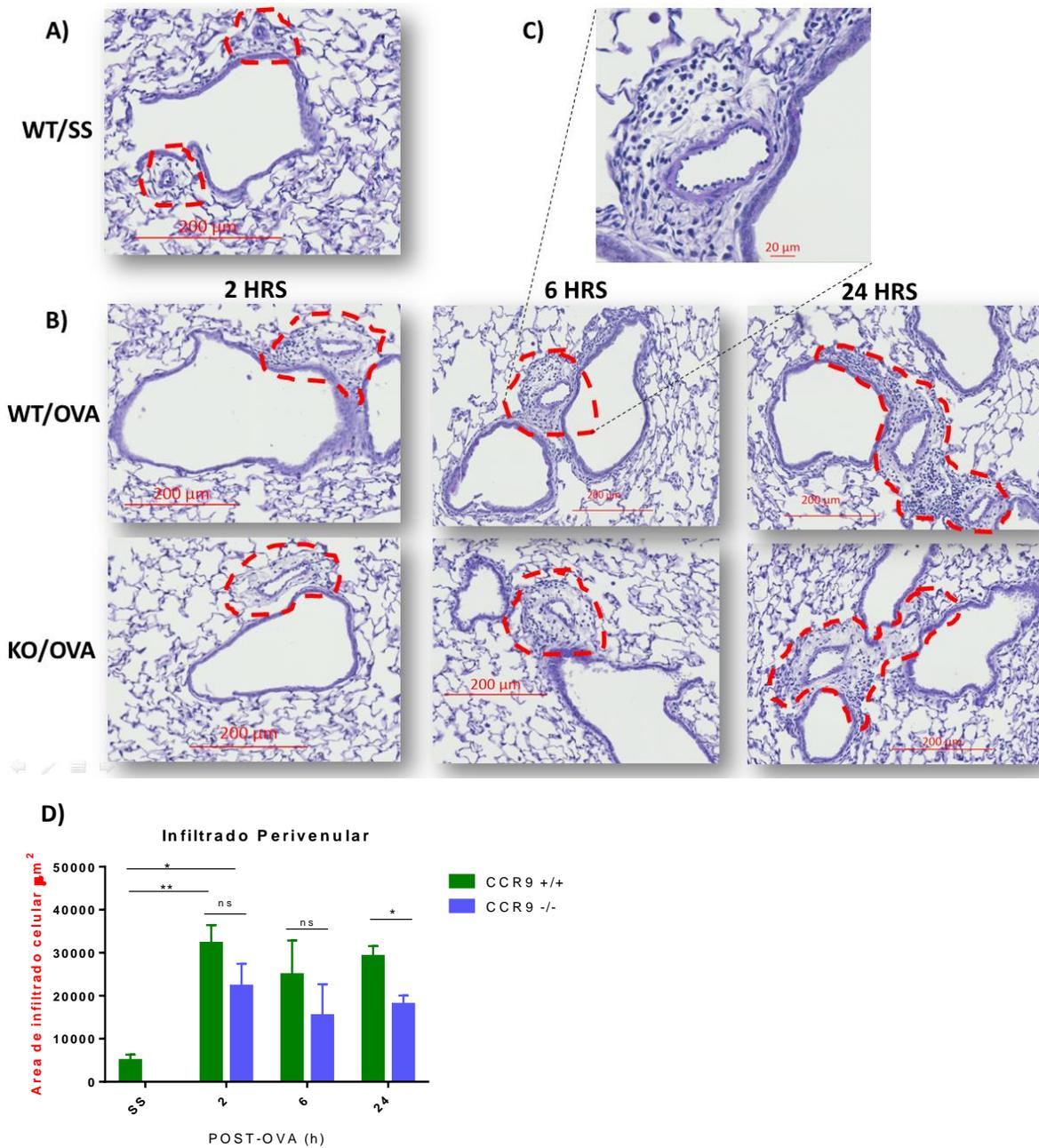


**Fig. 21 CCR9 no es esencial para la producción de IgE.** Se analizó la producción de IgE en ratones sensibilizados CCR9 +/+ y CCR9 -/-, en suero como en LBA por ELISA. Un experimento representativo de 3. Los datos representan la media + s.e.m., n=4. El nivel de significancia es representado por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.

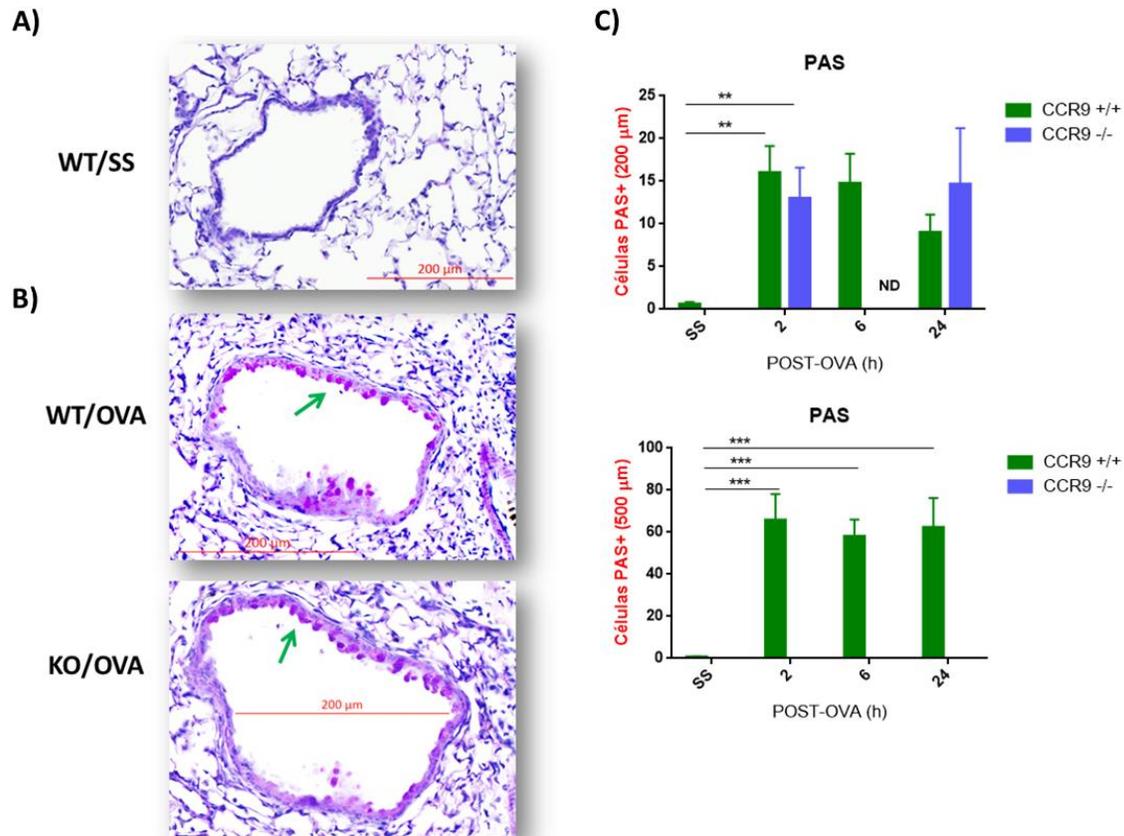
### *Evaluación histológica del infiltrado de eosinofilos y linfocitos T dentro de la submucosa de las vías aéreas en el modelo experimental de inflamación pulmonar*

Para demostrar que el modelo de inflamación pulmonar presentaba características típicas, también se cuantificó el infiltrado celular *in situ* que rodea a los bronquios secundarios y terciarios. Generalmente se analizan entre valores de 150 y 200  $\mu\text{m}$ . En los ratones no sensibilizados WT/SS se encuentra muy poco infiltrado celular en zona peribronquial (Figura 22a), sin embargo una vez sensibilizados con OVA tanto ratones WT/OVA como KO/OVA hay un incremento en el área de infiltrado. Conforme pasa el tiempo después de la inmunización hay un incremento en el infiltrado celular perivenular, en ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- respectivamente en comparación con los

animales sin estímulo de OVA, aunque se encontró que a las 24 horas en ausencia de CCR9 había menor infiltrado celular; ya que se observó menor engrosamiento de los bronquios (**Figura 22 b y d**). También se cuantificó la producción de moco por las células caliciformes mediante la técnica de Schiff (PAS) en el pulmón. Se encontró que en ratones no sensibilizados con OVA no hay células PAS+ (**Figura 23a**). Sin embargo se puede observar la producción de mucinas (como se indica en flechas) en ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- (**Figura 23b**). La sobreproducción de moco comparado con el SS (no inmunizado con OVA correlaciono con el infiltrado inflamatorio y fue de 15-20 +/- células PAS positivas para bronquios de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ . Lo que sugiere es que el porcentaje de células caliciformes que producen mucinas se incrementan por la administración de OVA en aerosol. Por otro lado se observó que en los ratones CCR9 +/+ presentaban células PAS positivas en bronquios con un diámetro de 500  $\mu\text{m}$  y estas no se encontraban en los ratones CCR9 -/-, lo cual sugiere un papel importante en la activación de otros mediadores inflamatorios que pudieran afectar la producción de moco en ausencia de CCR9 o la disminución directa de células del sistema inmune que regulen la homeostasis de las mucinas en los bronquios superiores o primarios, sin embargo solo es representativo de un experimento. (**Figura 23c**). En conclusión la ausencia de CCR9 no afecta la producción de moco en bronquios de 200  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 22 CCR9 es importante para el reclutamiento tardío de células inmunes.** Imágenes representativas del infiltrado celular en vías aéreas de pulmón, los hallazgos histológicos de criocortes de tejido pulmonar fueron teñidas con HE de ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/-. **A)** Se observa que en ratón no sensibilizado con OVA. **B)** La distribución en ambas condiciones (CCR9 +/+ y CCR9 -/-) donde exhiben un incremento en las áreas perivenulares (zona punteada). **C)** Acercamiento del infiltrado celular, principalmente es de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos alveolares, linfocitos y monocitos. **D)** El infiltrado celular perivenular fue medido por conteo de 5 bronquios de aproximadamente 200 µm por área de infiltrado µm<sup>2</sup> y analizas mediante el programa de AxioScan ZEN. Un experimento representativo. Los datos representan la media + s.e.m., n= 2 WT y 2 KO, el nivel de significancia es representado por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.

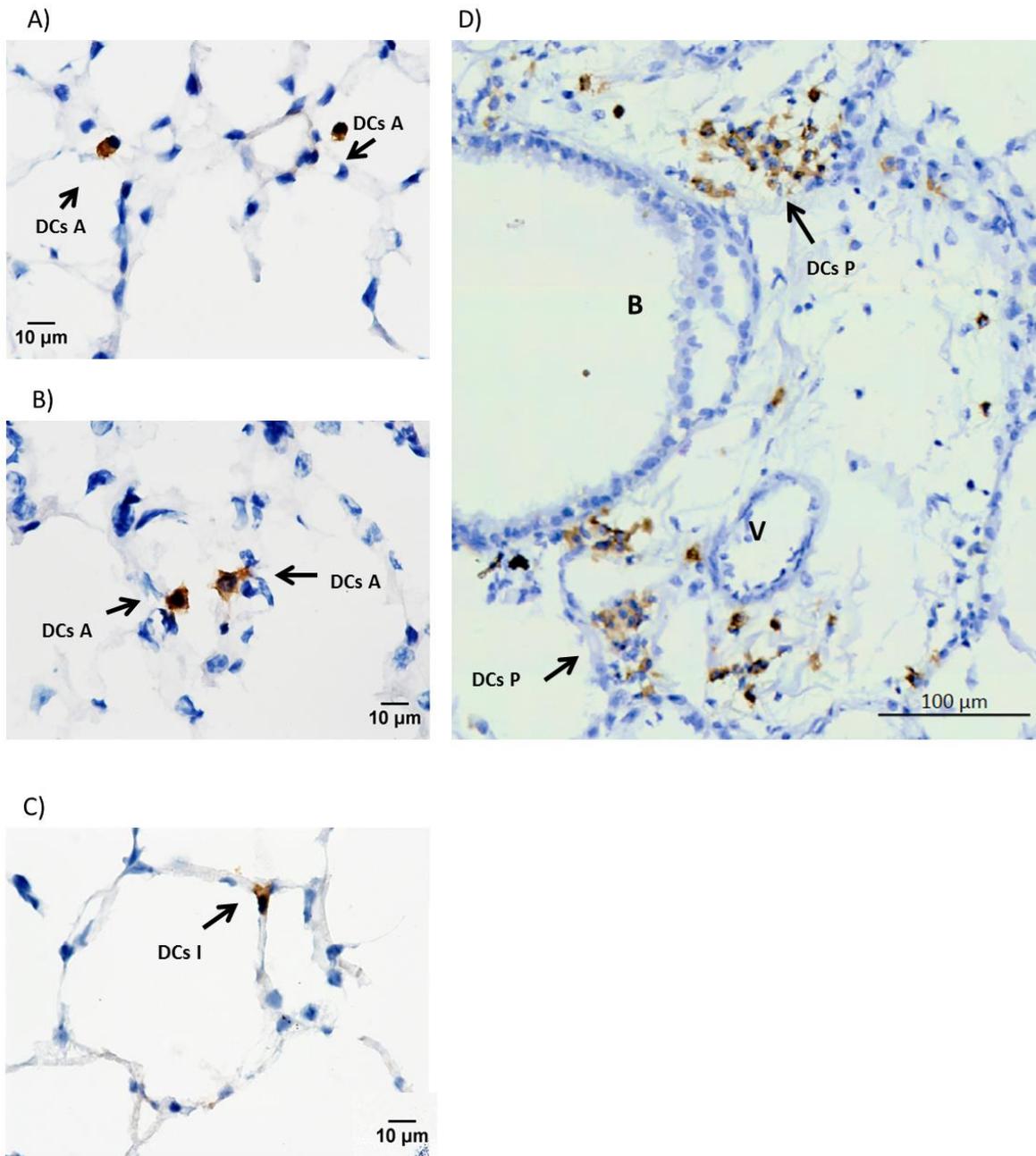


**Fig. 23 CCR9 no afecta la síntesis de moco.** Para la identificación de la producción de mucinas por células caliciformes en el epitelio pulmonar, secciones pulmonares fueron teñidas con PAS, en donde el área que ocupa el material PAS-positivo fue medida en cada grupo midiendo 5 bronquios por cada sección de tejido de aproximadamente 200 μm por área, y analizas mediante el programa de AxioScan ZEN. **A)** Ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- no sensibilizados con OVA. **B)** Ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/- sensibilizados con OVA. **C)** Analisis de las células PAS+ en ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/-. Los resultados representan el promedio de los bronquios PAS-positivo. Un experimento representativo. Los datos representan la media + s.e.m., n= 2 WT y 2 KO la significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 ANOVA y ND= no hay datos.

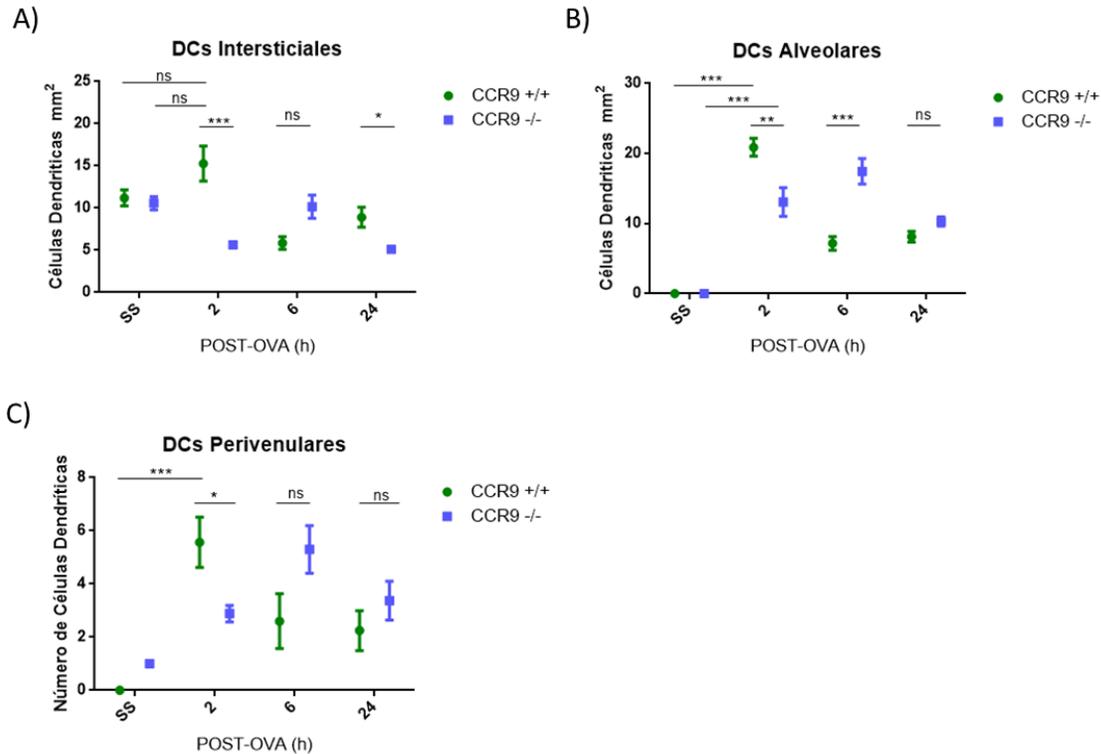
### Localización espacio-temporal de las células dendríticas DEC-205+ en pulmones de ratones CCR9+/+ y CCR9 -/-

Para analizar el comportamiento de las células dendríticas se utilizó la inmunohistoquímica la cual permite el análisis espacial y temporal de células en el tejido pulmonar (**Figura 24**). Las células dendríticas por su capacidad migratoria son esenciales para la activación de los linfocitos T, la detección en el contexto de la activación versus la función efectora de acuerdo al compartimento en el pulmón. Durante el periodo de estudio 2, 6 y 24 horas se encontró, que la pequeña cantidad de células dendríticas DEC-205+ aumentan drásticamente durante las primeras horas después del reto con OVA. Los resultados sugieren que en todos los compartimentos en el pulmón hay un incremento de células dendríticas DEC-205 alveolares y perivenulares durante las primeras etapas de la inflamación (2 y 6 horas), que van disminuyendo paulatinamente como va transcurriendo el tiempo en ratones CCR9 +/+, sin embargo en ausencia de CCR9 se encontró una disminución a las

2 horas pero con una tendencia a incrementar a las 6 horas en comparación con el CCR9 +/+, como se puede ver en la **Figura 25**.



**Fig. 24 Localización de las células dendríticas DEC-205+.** Imágenes representativas de los hallazgos histológicos de criocortes de tejido pulmonar con células dendríticas DEC-205+ después de la sensibilización con OVA. **A) y B)** Células dendríticas alveolares que se reclutan desde las 2 horas después de la inmunización, magnificación de 60x. **C)** Células dendríticas intersticiales, magnificación de 60x. **D)** Células dendríticas perivenules magnificación de 40x. Las células fueron teñidas con Hematoxilina de Gill y analizadas mediante microscopia de campo claro. Abreviaturas: DCs A; dendríticas alveolares. DCs I; dendríticas intersticiales. DCs P; dendríticas perivenules. B; bronquio secundario. V; vaso sanguíneo.



**Fig. 25 CCR9 afecta a las células dendríticas DEC-205+ *in situ* en las primeras etapas de la inflamación.** Análisis de células dendríticas DEC-205 en tejido pulmonar de ratones CCR9+/+ y CCR9 -/- que fueron inmunizados con OVA. **A)** Células dendríticas intersticiales **B)** Células dendríticas alveolares **C)** Células dendríticas perivenules. El número es de 20 campos diferentes para cada compartimento, para obtener el número de células en mm<sup>2</sup>, excepto para dendríticas perivenules que fueron 6 campos. Un experimento representativo de 2. Los datos representan la media + s.e.m., n= 2 SS, 3 WT y 3 KO. La significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.

### Análisis fenotípico de las DCs pulmonares de ratones sensibilizados CCR9 +/+ y CCR9 -/-

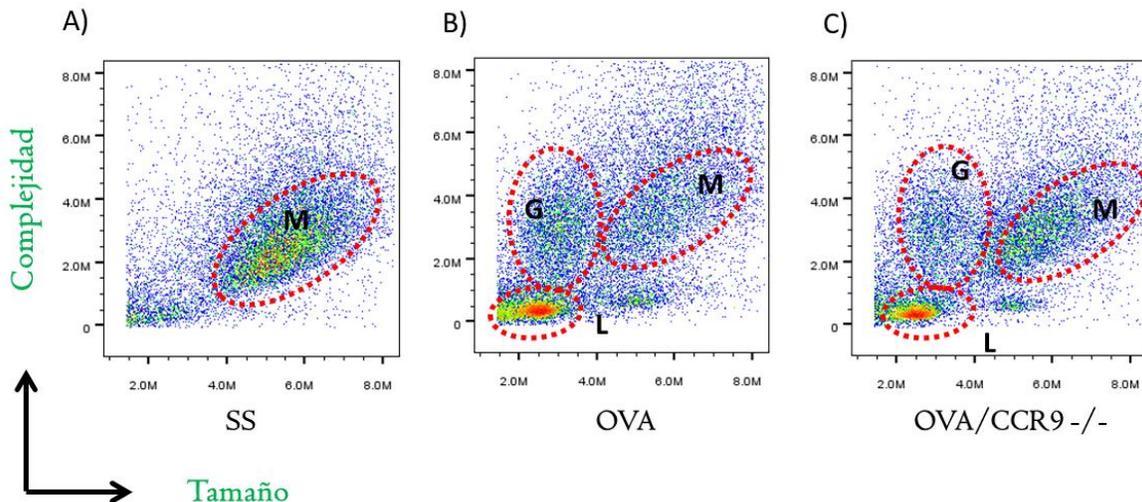
Después de validar nuestro modelo de inflamación alérgico pulmonar, y analizar *in situ* la migración dependiente del tiempo, lo siguiente fue analizar algunas poblaciones celulares de células dendríticas en el LBA de acuerdo a su fenotipo. Los antecedentes en el grupo de investigación indicaban que una población de células CD11c+ MHC clase II+ se encontraban disminuidas en LBA en un proceso inflamatorio pulmonar en ratones CCR9 -/- (López-Pacheco *et al.*, 2016), y que potencialmente podrían ser células presentadoras de antígeno, sin embargo este análisis no revelaba si existía una o varias poblaciones de células dendríticas o macrófagos que fueran afectados en ausencia de CCR9. Por lo anterior se determinó la expresión de proteínas en superficie celular que pudieran discriminar las células dendríticas de LBA en pulmón.

Mediante citometría de flujo (FACS), un método utilizado para el análisis de expresión de proteínas en la superficie celular y moléculas intracelulares. Permite caracterizar y definir diferentes tipos de células en poblaciones de células heterogéneas, consiste en incubar células con anticuerpos

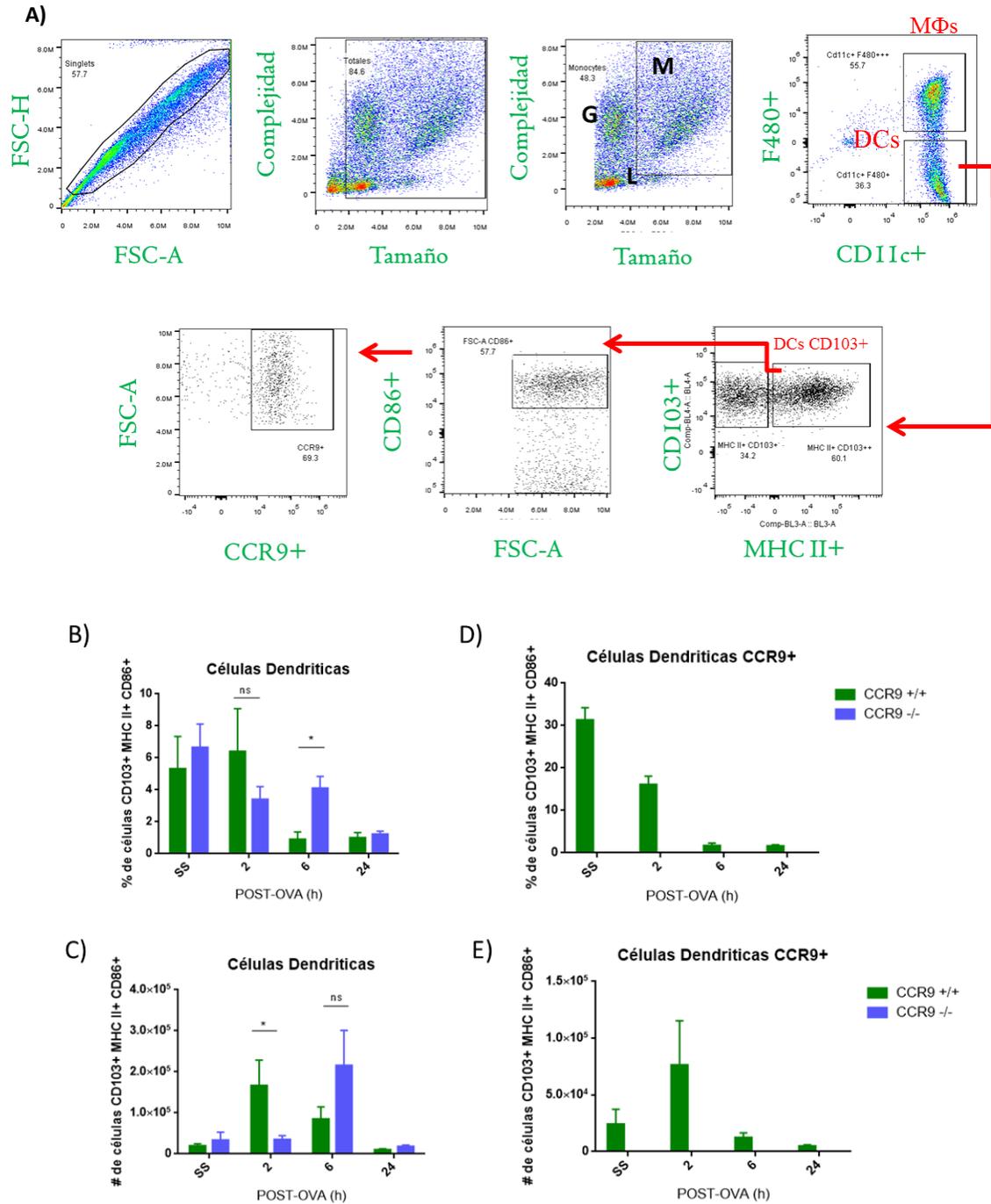
específicos marcados con fluorescencia que al ser excitados con un láser se detecta la fluorescencia emitida desde células teñidas positivamente. Las poblaciones celulares de un LBA se pueden observar en una gráfica de puntos “dot plot” donde cada punto representa una célula (**Figura 26**).

En ratones CCR9  $+/+$  y CCR9  $-/-$  se utilizaron los marcadores F4/80 low/neg, CD11c+, MHC II+++ , CD103+, CD86+ (Bedoret *et al.*, 2009; Plantinga *et al.*, 2013; Schlitzer *et al.*, 2011; Holt *et al.*, 2008) y CCR9 (Lopez-Pacheco *et al.*, 2016; Wendland *et al.*, 2007), para diferenciar células dendríticas de macrófagos alveolares (**Figura 27a**). Después de la última inmunización con OVA, en ausencia de CCR9 se encontró una disminución a las 2 horas de células dendríticas CD11c+, F4/80 low y CD103+ (**Figura 27c**), lo que sugiere una alteración en las células migratorias CD103+ que detectan partículas/alérgenos en las vías áreas. Esta subpoblación de célula dendrítica principalmente muestrea y migra a ganglios peribronquiales. A diferencia de las pre-DCs provenientes de médula ósea, bazo y vía sanguínea en condiciones inflamatorias se dirigen al pulmón para mantener a los precursores de macrófagos y células dendríticas para poder diferenciarse fácilmente *in situ*.

El reclutamiento de células dendríticas F4/80 low/neg, CD11c+, MHC II+++ , CD103+, CD86+ depende de CCR9 al menos en las primeras etapas de la inflamación ya que a las 6 y 24 horas ya no hay diferencias (**Figura 27 c, d y e**). El resultado de que las células dendríticas se encontraban afectadas en ausencia de CCR9 en LBA podría tener efecto sobre otras poblaciones celulares como linfocitos, neutrófilos, basófilos o eosinófilos.

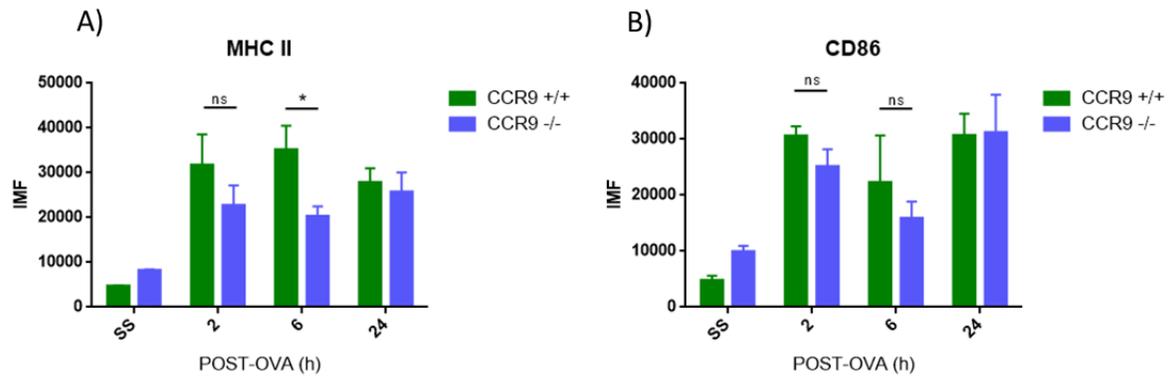


**Fig. 26** Reclutamiento de los principales tipos de células de un Lavado broncoalveolar (LBA) en ratones sensibilizados utilizando citometría de flujo. **A)** ratones no sensibilizados con OVA donde se observa una población de células mononucleares. **B)** ratones CCR9  $+/+$  sensibilizados con OVA **C)** ratones CCR9  $-/-$  sensibilizados con OVA, imagen representativa de un análisis a las 2 horas después de la inmunización. Principales tipos de células de LBA, Granulocitos (G), linfocitos (L) y células mononucleares (M) que se tiñeron con anticuerpos específicos marcados con fluorescencia.



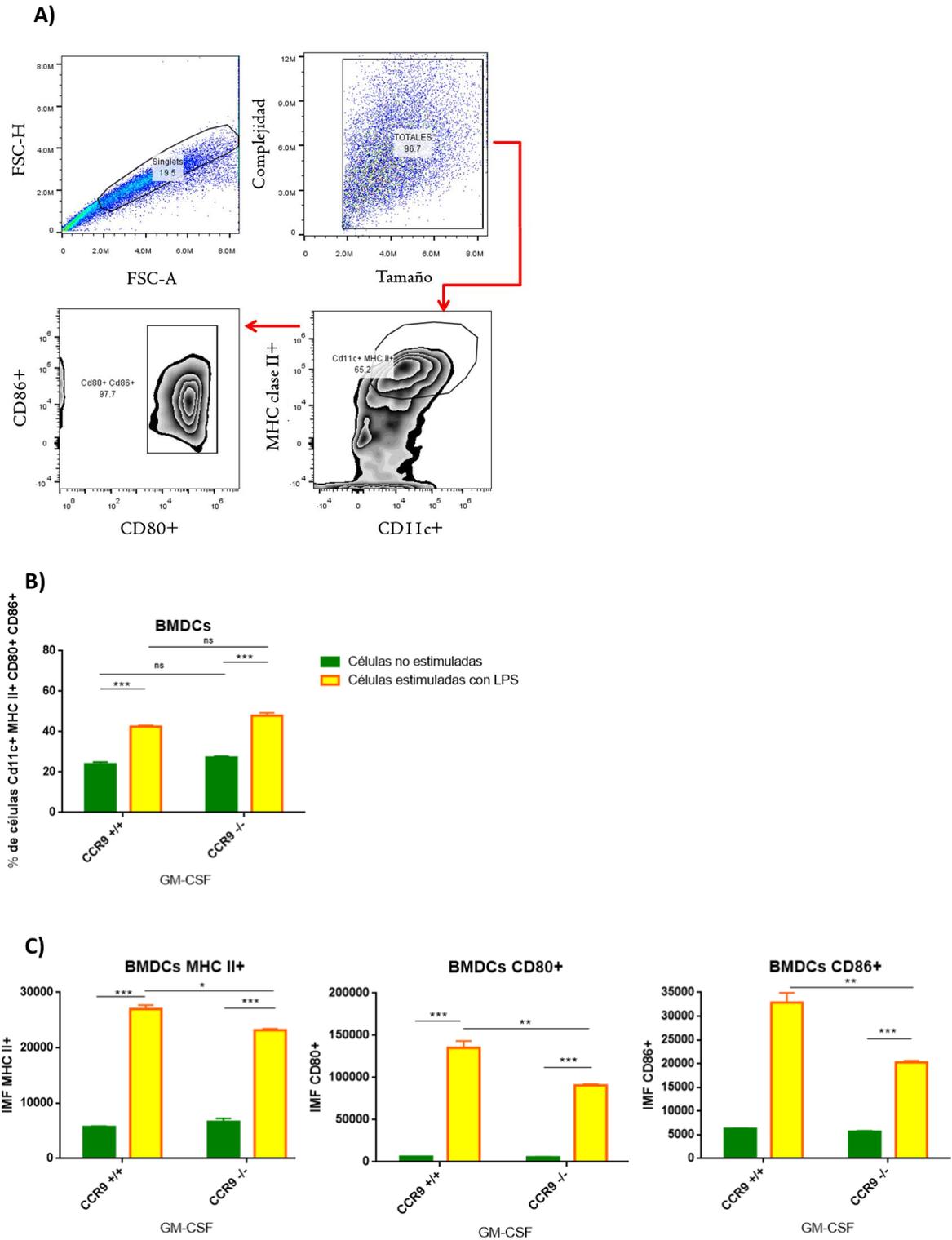
**Fig. 27 CCR9 es esencial en las primeras etapas de la inflamación para el reclutamiento de células dendríticas.** A) Estrategia de análisis de las células dendríticas por FACS en Lavado Broncoalveolar en ratones sensibilizados con OVA. Las células del LBA fueron analizadas mediante citometría de flujo tomando en cuenta solo los eventos sencillos y de acuerdo a sus propiedades de tamaño y granularidad, para la discriminación de células dendríticas se usaron los marcadores F4/80 low/neg, CD11c+, MHC II+<sup>+++</sup>, CD103+, CD86+ y CCR9+. B) Se muestra el número de células en porcentaje; las células dendríticas de ratones inmunizados están incrementadas en ausencia de CCR9 a las 6 horas. C) Se muestra el número de células totales; las células dendríticas de ratones inmunizados están disminuidas en ausencia de CCR9 a las 2 horas. D) porcentaje y E) números totales donde se muestra un incremento en la expresión de CCR9 a las 2 horas en células dendríticas. Abreviaturas: L; Linfocitos, M; Monocleares y G; Granulocitos. Un experimento representativo de 3. Los datos representan la media + s.e.m., n= 4 WT y 3 KO. La significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.

Además se determinó la expresión de proteínas de superficie típicas para la activación de las células dendríticas *in vivo* (Flores-Romo *et al.*, 2003), a través de la Intensidad Media de fluorescencia (IMF) como se muestra en la (Figura 28), en donde se observa que en ausencia de CCR9 se afectaba la cantidad de proteínas de activación en la superficie celular, lo que sugiere una alteración en la capacidad funcional de las DCs después de la inmunización, aunque no se tiene claro el mecanismo molecular.



**Fig. 28 CCR9 afecta la activación de las células dendríticas *in vivo*.** Se evaluaron marcadores clásicos de activación mediante la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en células dendríticas en LBA de ratones inmunizados con OVA. **A)** Durante las 6 horas siguientes a la inmunización hay una disminución en la IMF del marcador MHC clase II en ausencia de CCR9. **B)** Se observa una tendencia a disminuir la IMF de CD86 en las 2 y 6 horas después de la inmunización. Un experimento representativo de 3. Los datos representan la media + s.e.m., n = 4 WT y 3 KO. La significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.

Una forma de averiguar cuál era el mecanismo o la capacidad funcional alterada en las células dendríticas y cual podría verse afectada, se utilizó una estrategia experimental validada por otros grupos de investigación la cual consistió en diferenciar células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) (Olguin-Alor, 2014; Reyes-Martínez, 2010), proveniente de ratones deficientes de CCR9 para evaluar la cantidad de proteínas de activación (CD80, CD86, MHC clase II) en las células dendríticas. La diferenciación CCR9 +/+ y CCR9 -/-, se realizó *in vitro*, mediante el cultivo de precursores de médula ósea y diferenciados con sobrenadante de células CHO que secretan GM-CSF (factor de crecimiento para la diferenciación de macrófagos y células dendríticas). Se aislaron las células no adherentes evaluando la expresión de moléculas clásicas de una célula presentadora de antígeno como células dendríticas CD11c, MHC clase II, y la expresión de marcadores de activación como CD80 y CD86, posteriormente se estimularon con LPS para madurar las DCs y se analizaron mediante citometría de flujo (Figura 29a).



**Fig. 29** La maduración de BMDcs con LPS induce una alteración en la activación en ausencia de CCR9 *in vitro*. Las BMDcs fueron enriquecidas con GM-CSF los días 1 y 3, el 5 día se agregó 1µg/mL de LPS y 24 horas después se analizaron. **A)** Diagramas representativos de células BMDcs, analizadas mediante citometría de flujo tomando en cuenta solo los eventos sencillos y de acuerdo a sus propiedades de tamaño y granularidad, se usaron los marcadores CD11c+, MHC II+, CD80+ y CD86+. **B)** Porcentaje de BMDcs CCR9 +/+ y CCR9 -/- con LPS y sin LPS. **C)** IMF de marcadores de activación de BMDcs. Un experimento representativo de 2. Los datos representan la media + s.e.m., n = 2 WT y 2 KO. La significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo..

Los análisis nos indicaron que no hay diferencias entre los porcentajes de las DCs deficientes CCR9 -/- comparados con las CCR9 +/+ (**Figura 29b**). Además no se encontraron diferencias en la IMF de MHC clase II, CD80 y CD86 en células no estimuladas con LPS en ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/-, sin embargo una vez estimuladas con LPS se encontraron diferencias significativas entre CCR9 +/+ y CCR9 -/-. (**Figura 29c**). Los datos correlacionan con lo analizado previamente *in vivo* donde las células dendríticas ante un estímulo inflamatorio con OVA se observaba una tendencia a disminuir la expresión de marcadores de activación lo que sugiere que hay una alteración en la capacidad de activación y posiblemente maduración de las DCs en ausencia de CCR9.

### *Análisis fenotípico de linfocitos y eosinófilos en un proceso inflamatorio alérgico pulmonar*

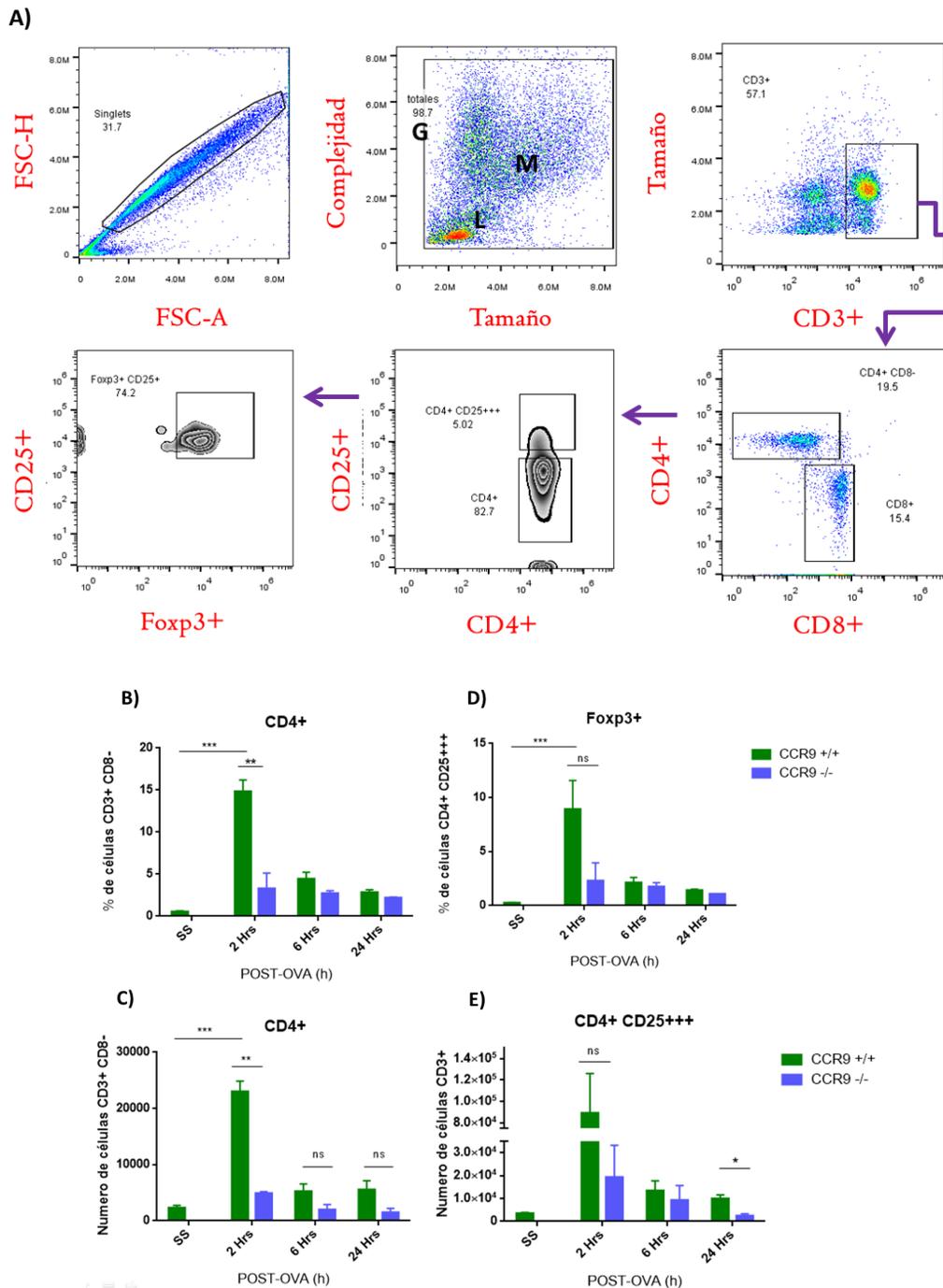
El pulmón comparte algunas características con otros sitios de la mucosa, pero la preservación de sus estructuras anatómicas delicadas requieren de un fino equilibrio entre respuestas pro- y anti-inflamatorias. Los linfocitos T son importantes para la regulación de la inflamación, que en situaciones de inflamación alérgica contribuyen al daño tisular y a la enfermedad.

Después del reconocimiento de antígeno o alérgeno presentado por las DCs, los linfocitos T CD4+ secretan de forma "latente" una forma de TGF- $\beta$ ; este dímero de TGF- $\beta$  y la proteína asociada a latencia (LAP) interactúa con la integrina  $\alpha\text{v}\beta 8$  en DCs provocando la secreción de la forma activa de TGF- $\beta$  y que actúa directamente sobre linfocitos T CD4+ para inhibir la diferenciación de células de alta afinidad T<sub>H1</sub> o T<sub>H2</sub> y junto con IL-2 y ácido retinoico promueven la diferenciación de linfocitos T reguladores inducidos (iT reg) T (Chiu y Openshaw, 2015).

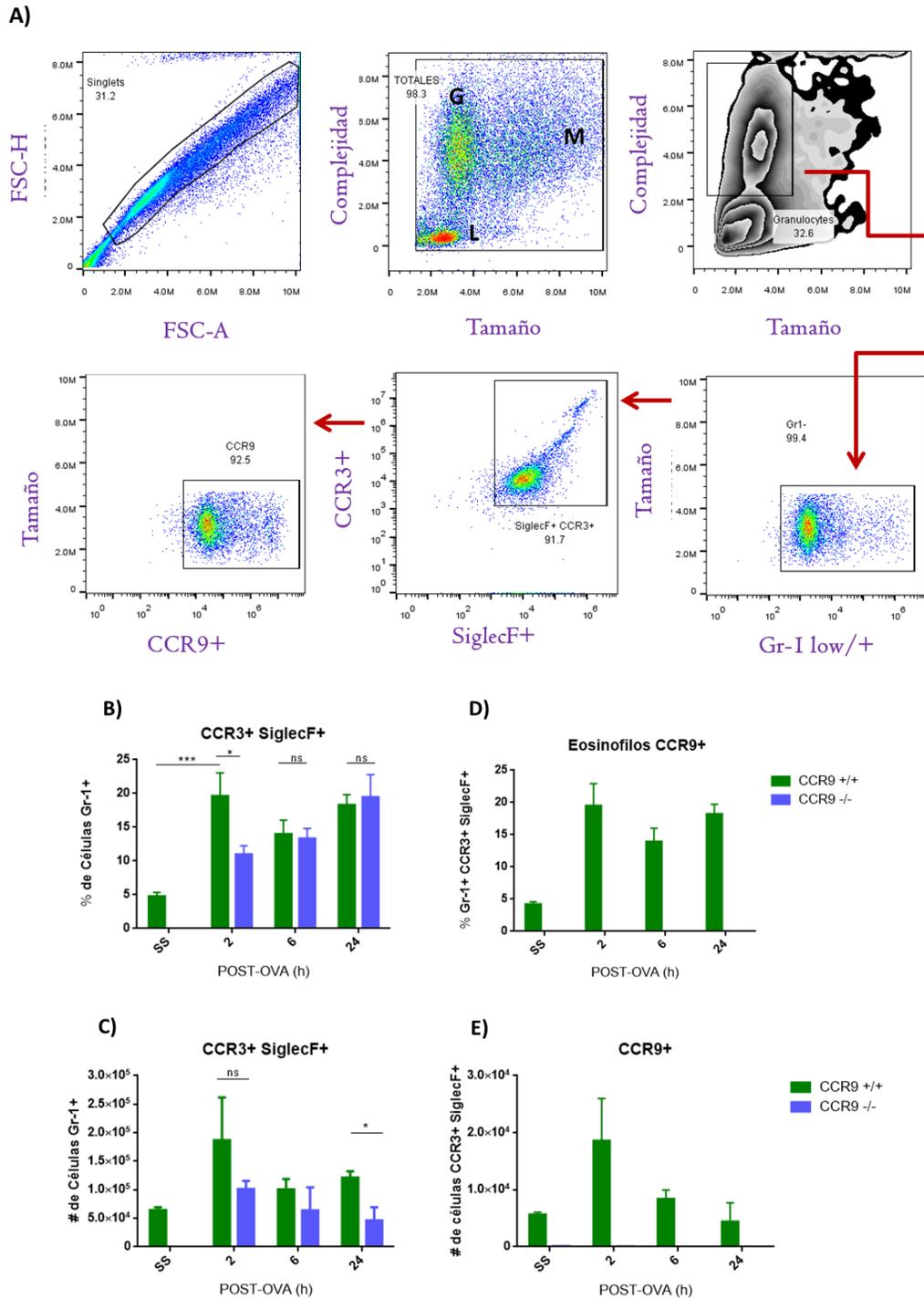
Los linfocitos T reg son caracterizados por la expresión del factor de transcripción Foxp3 y son cerca del 1-10 % de todos los linfocitos T en sangre (Chiu y Openshaw, 2015), se distribuyen ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides (Griffith *et al.*, 2014). Estas células mantienen la tolerancia a lo propio y previene la respuesta a alérgenos y microorganismos no patógenos de la flora microbiana, etc. (Feurerer *et al.*, 2009). Estas células pueden suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras (como la producción de citocinas) de una amplia gama de células del sistema inmune (Sakaguchi *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo del proceso inflamatorio alérgico, se observó una disminución de los linfocitos T CD4+ que se están reclutando a la mucosa 2 horas después de la sensibilización con OVA en ausencia de CCR9 (**Figura 30 b y c**), sin embargo a las 6 y 24 horas después de la inmunización no se encontró diferencias entre CCR9 +/+ y CCR9 -/-. Por otro lado se puede observar en la una cierta tendencia de linfocitos T reguladores a las dos horas en LBA sin embargo

no es significativa, horas más tarde después de la sensibilización con OVA se observó una reducción de linfocitos T reguladores a las 24 horas en ausencia de CCR9 (Figura 30 d e).



**Fig. 30 CCR9 es importante para el reclutamiento de linfocitos T CD4+ en la fase temprana y tardía para linfocitos T reg en la inflamación alérgico pulmonar *in vivo*.** A) Las células del LBA fueron analizadas mediante citometría de flujo tomando en cuenta solo los eventos sencillos y de acuerdo a sus propiedades de tamaño y granularidad, después se seleccionaron a través de CD3+, CD4+, CD8+, CD25+ y Foxp3+. B) Porcentaje y C) Número de células totales en LBA, los linfocitos CD4+ de ratones inmunizados están disminuidos en ausencia de CCR9 a las 2 horas, y no hay diferencias a las 6 y 24 horas. D) Porcentaje y E) Número de células totales en LBA de los linfocitos T CD4+ CD25+++ y Foxp3+ se observa una reducción 24 horas después de la sensibilización con OVA. Un experimento representativo de 3. Los datos representan la media + s.e.m., n = 3 WT y 3 KO. La significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.



**Fig. 31 CCR9 es importante para el reclutamiento de eosinófilos en la fase tardía de inflamación alérgica pulmonar *in vivo*.** **A)** Imagen representativa de análisis 24 horas después de la inmunización con OVA, las células del LBA fueron analizadas mediante citometría de flujo tomando en cuenta solo los eventos sencillos y de acuerdo a sus propiedades de tamaño y granularidad, después se usaron los marcadores Gr-1 low/neg, CCR3+, SiglecF+ y CCR9+. **B)** Se muestra el número de células totales en LBA, los eosinófilos CCR3+ y SiglecF+ a las 2 horas y se ven reducidos en ausencia de CCR9. **C)** Se muestra el número de células en porcentaje, los eosinófilos CCR3+ y SiglecF+ a las 24 horas y se ven disminuidos en ausencia de CCR9, no se encontraron diferencias significativas entre CCR9 +/+ y CCR9 -/- a las 6 y 24 horas. **D)** Porcentaje y **E)** Células totales de LBA donde hay mayor índice de células CCR9+ durante las primeras etapas de la inflamación y que se reduce progresivamente después de la sensibilización con OVA. Un experimento representativo de 3. Los datos representan la media + s.e.m., n = 3 WT y 3 KO. La significancia es representada por \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test y ns= no significativo.

Finalmente se evaluó el reclutamiento de eosinófilos, una población celular típica del infiltrado inflamatorio causante de la exacerbación e hiperreactividad de las vías aéreas principalmente de la fase tardía en la hipersensibilidad tipo I o alérgica. Se encontró un reclutamiento de granulocitos en el LBA por cito-centrifugación (**Figura 18 y 19**). Por citometría se observó un decremento a las 2 horas de eosinófilos ( $Gr1^{low/neg}$ , CCR3+, SiglecF+) en ausencia de CCR9 en el LBA sin embargo en números totales no se encontraron diferencias significativas entre células CCR9 +/+ y CCR9 -/- a las 6 y 24 horas después de la sensibilización con OVA (**Figura 31b**). Posteriormente a las 24 horas después de la inmunización hay una reducción de eosinófilos (**Figura 31c**). Además se observa una expresión de CCR9 en las primeras etapas de la inflamación posiblemente para el reclutamiento de células con morfología granulocítica y/o eosinófilos (**Figura 31 d y e**).

En resumen todos estos datos indican que el receptor de quimiocinas CCR9 es importante para la localización y activación de células dendríticas  $F4/80^{low/neg}$ ,  $CD11c^+$ ,  $MHC\ II^{+++}$ ,  $CD103^+$ ,  $CD86^+$  principalmente en las primeras etapas de la inflamación alérgico pulmonar y que esto podría impactar sobre otras poblaciones celulares como son los linfocitos T  $CD4^+$  residentes como los migratorios y que a su vez tenga efecto sobre las funciones efectoras de eosinófilos (como la producción de proteínas) que causan daño tisular.

## Discusión

Para que las células del sistema inmune lleguen a un sitio tejido-específico es necesaria la expresión de quimiocinas. Se han identificado que estas tienen un papel importante en el reclutamiento de células en condiciones de homeostasis, así como de inflamación. Principalmente en un proceso alérgico pulmonar, se ha reportado el incremento en la expresión de quimiocinas como CCL3, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL17, CCL22, CXCL8 entre otros, así como sus respectivos receptores, sin embargo hay otras quimiocinas hasta el momento no bien estudiadas como CCL25 y su receptor CCR9. Antecedentes directos del grupo de investigación detectaron altos niveles de CCL25 en el parénquima pulmonar, lo que sugiere que el par CCR9-CCL25 podría estar involucrado en reclutamiento tejido-específico de pulmón (López-Pacheco *et al.*, 2016). Diversos modelos experimentales se han validado para el estudio de la fisiopatología del fenómeno de la alergia pulmonar (López-Pacheco *et al.*, 2016).

Los ratones sensibilizados con OVA C57BL/6 CCR9 +/+ y CCR9 -/- desarrollaron inflamación alérgica pulmonar en respuesta a OVA y se observaron poblaciones típicas en LBA tanto por cytopsin (**Figura 19**), como por FACS (**Figura 26**). Dicha respuesta se validó por la presencia de anticuerpos IgE-OVA específicos, infiltrado celular principalmente linfocitos, neutrófilos, eosinófilos etc., sobreproducción de moco, hiperplasia de células y engrosamiento de la barrera

epitelial localizada en el pulmón (**Figura 22b**), con la finalidad de observar la dinámica de las células dendríticas durante las primeras etapas de la inflamación alérgico pulmonar en ratones deficientes de CCR9-/-y además poder explicar el papel inmunomodulador de CCR9 en estas células dendríticas, se caracterizó una subpoblación las células dendríticas DEC-205+ importante en este proceso inflamatorio pulmonar debido a la distribución *in situ* y su función.

Cuando el tracto respiratorio es estimulado con antígenos por las vías aéreas, las dendríticas residentes pierden sus propiedades tolerogénicas y promueven el desarrollo de respuestas celulares tipo T<sub>H</sub>1 o T<sub>H</sub>2 contra los aero-antígenos (Holt *et al.*, 2008). La fase inmediata de la inflamación alérgica pulmonar se caracteriza por congestión vascular, vasodilatación, edema y estimulación del musculo liso al alérgeno minutos después de la exposición (Kumar *et al.*, 2013). Pero las células dendríticas son las primeras en instruir y regular la inmunidad en el microambiente pulmonar, para la toma de decisiones entre responder y no responder (Pulendran *et al.*, 2010; Matzinger, 1994; Banchereau *et al.*, 2000; Steinman *et al.*, 2003). Principalmente por la presión antigénica a la que se somete el pulmón todos los días, por eso se precisa de una caracterización profunda sobre las subpoblaciones de células dendríticas. Además no se conoce como se regula el balance entre señales pro y anti-inflamatorias que afectan el microambiente local en el pulmón en un estado de homeostasis y como es que se pierde en un proceso alérgico pulmonar (Holt *et al.* 2008; Kopf *et al.*, 2015; Lambrecht y Hammad, 2015). Como tampoco se conocen los mecanismos que dirigen y regulan las células dendríticas en el pulmón para perder la tolerancia inmunológica ante antígenos que en su mayoría no afectan o son inocuos para personas sanas.

En el presente trabajo se ha demostrado que hay un incremento de células dendríticas DEC-205 en las primeras 2 horas de la inflamación (**Figura 25**), que progresivamente van disminuyendo con respecto al tiempo. Las células dendríticas que estaban en un estado basal de homeostasis se hallaban en los intersticios con una interacción normal entre estas células y los macrófagos alveolares que mantenían un bajo número de células dendríticas (Holt *et al.*, 1993), sin embargo cuando estas condiciones cambiaron a un estado inflamatorio principalmente la auto-renovación de los macrófagos fue alterada, lo que podría explicar un incremento en el número de células dendríticas totales DEC-205 en el espacio alveolar. El número de células dendríticas intersticiales DEC-205 en un ratón CCR9 +/+, pasaron a tener un fenotipo pro-inflamatorio en el espacio alveolar a través de CCR6. Sin embargo existen otros factores como la liberación de citocinas y quimiocinas provenientes de células epiteliales alveolares que localmente reclutan de la periferia células dendríticas derivadas de monocitos (Geissmann *et al.*, 2010), que producen citocinas tolerogénicas como IL-10, TGF- $\beta$  etc., para la resolución de la inflamación ante los antígenos no-patógenos como la OVA. Lo que podría estas pasando es que las células que se reclutan de la periferia pasan de un

compartimento a otro es decir del intersticio hacia el espacio alveolar, y que aquellas células que se encuentran en el tejido como células residentes también pasan inmediatamente al espacio alveolar sin embargo en ausencia de CCR9 a las 2 horas se sugiere que no hay reclutamiento de células dendríticas desde la periferia y las que se encontraban en el intersticio migraron al espacio alveolar dejando un número bajo de células en el intersticio (**Figura 25 a y b**). En condiciones basales el reclutamiento de monocitos sirve como materia prima para la diferenciación de pre-DCs a cDCs, y se puede observar que hay un incremento en el número de células dendríticas que llegan a través de la sangre y rápidamente se ve compensado por aquellas células que migran a ganglios peribronquiales o mueren por apoptosis. Esto indica que en las primeras etapas de la inflamación CCR9 es importante para el reclutamiento de células dendríticas DEC-205 al pulmón.

Las células dendríticas DEC-205 presentes en pulmón coexpresan Langerina, bajos niveles de la integrina CD11b y coexpresan la integrina  $\alpha\beta 7$  (CD103), un ligando de la molécula de adhesión celular E-cadherina expresada por la mayoría de las células epiteliales (Merad y Manz, 2009; Idoyaga *et al.*, 2013).

En estudios previos se ha demostrado que en lavado broncoalveolar hay una reducción de células CD11c+ y MHC clase II (López-Pacheco *et al.*, 2016) por FACS. Sin embargo, dichas células carecen de características fenotípicas que las asocien a una población particular en el pulmón. Existen principalmente dos subpoblaciones tejido-residentes en el pulmón a) DCs CD103+ CD8- que son excelentes en la activación y la presentación cruzada de antígenos que son cargados en los linfocitos T CD8+, y b) las DCs CD11b+, las cuales potencian la diferenciación de linfocitos T CD4+ (Salmon *et al.*, 2016; Idoyaga *et al.*, 2013). Además de macrófagos, especializados en la resolución de los desechos celulares y la fagocitosis que mantienen la restauración de la homeostasis en el tejido durante de la inflamación (Davies *et al.*, 2013; Geissmann *et al.*, 2010; Lambrecht, 2006).

Las células dendríticas CD103+ residentes transportan péptidos para presentar en los ganglios y generar tolerancia inmunológica, además de potenciar la diferenciación  $T_H2$  de linfocitos T vírgenes y T regs *in vivo* (Nakano *et al.*, 2012; Idoyaga *et al.*, 2013), por ello posiblemente son más importantes que las células dendríticas CD11b+ que se reclutan más tarde hacia el sitio inflamatorio, por ello nos enfocamos en las dendríticas CD103+ migratorias y se encontró por citometría de flujo una disminución a las 2 horas en el número total de células dendríticas en ausencia de CCR9 (**Figura 27c**) y que correlaciono con datos de las células dendríticas DEC-205 *in situ*. Lo cual sugería que posiblemente las células dendríticas DEC-205 *in situ* podrían pertenecer a la población de DCs CD103+ *in vivo*.

En resumen se demostró por FACS que hay más células dendríticas CCR9+ en un ratón silvestre a las 2 horas después de la OVA comparado con un ratón CCR9 -/-, lo que sugiere que CCR9 es necesario para el reclutamiento de estas células hacia el pulmón. Sin embargo se analizó a las 6 y 24 horas posteriores e interesantemente se encontró un incremento de células dendríticas en ausencia de CCR9 a las 6 horas *in vivo* (**Figura 27b**) comparado con un ratón silvestre.

En conclusión, no hay células dendríticas en el pulmón a las 2 horas en ausencia de CCR9, lo cual podría sugerir dos hipótesis *a*) una migración inmediata a ganglios peribronquiales o *b*) falta de reclutamiento hacia el pulmón. La dinámica de las células dendríticas se ve alterada ya que en la cinética las células no llegan a alcanzar el número en un ratón CCR9 +/+, pero incluso se observó una tendencia a incrementar en el número de células dendríticas intersticiales, perivenulares y alveolares a las 6 horas, lo que sugiere una tercera hipótesis *c*) un retraso en el reclutamiento en ausencia de CCR9 (**Figura 25b**). Cualquiera que sea la respuesta debe existir un mecanismo por el cual CCR9 esté afectando la migración de las células dendríticas, sin embargo existen muchos procesos que pueden ser afectados tales como, el procesamiento de antígenos, la maduración y la migración.

La migración celular es regulada por cambios en la expresión de receptores de quimiocinas en la superficie (recambio de receptores de quimiocinas), y estos eventos moleculares en los receptores de quimiocinas involucran la activación intracelular de receptores pro-inflamatorios en pulmón como CCR5 (Lloyd, 2002; Griffith *et al.*, 2014), y el incremento en otros receptores como CCR7 (Schulz *et al.*, 2016; Flores-Romo, 2001; Banchereau *et al.*, 2000). La expresión de CCR7 durante la maduración de las células potencia a estas para responder a quimiocinas linfoides como CCL19 y CCL21, que son producidas constitutivamente por órganos linfoides secundarios (Schulz *et al.*, 2016; Masopust y Schenkel, 2013).

Si bien existen antecedentes sobre el concepto de reclutamiento tejido-específico (Satpathy *et al.*, 2008) y se reconocen en las células dendríticas moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas que restringen principalmente la migración (pero no totalmente), para mantenerse en el tejido (Randolph *et al.*, 2008; Griffith *et al.*, 2014), no está claro para todos los tejidos no linfoides como el pulmón.

Las propiedades de la “educación” sobre el reclutamiento hacia los tejidos está ampliamente descrito en intestino y en la piel (Masopust y Schenkel, 2013). Por ejemplo, la activación de los linfocitos B en placas de Peyer y en ganglios linfáticos preferencialmente induce la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y CCR9 (Iwata *et al.*, 2004; Kunkel y Butcher, 2003). Además resultados reportados sugieren que CCR9 es necesario para el reclutamiento dirigido de células dendríticas

plasmacitoides hacia intestino en un estado basal, incrementando el reclutamiento durante la inflamación (Wendland *et al.*, 2007), y aunque CCR9 no es necesario para la entrada de pDCs dentro de los ganglios linfáticos u otros órganos como el pulmón, puede ser específico para la migración de pDCs hacia los órganos periféricos. Otros estudios reconocen a CCR9 como importante para el reclutamiento de linfocitos T  $\alpha 4\beta 7+$  hacia intestino delgado. Por esta razón este trabajo podría ser un ejemplo de reclutamiento dirigido de células dendríticas hacia el pulmón.

Sin embargo la migración es un proceso muy complejo, pero si era afectada la migración a pulmón podría ser debido a que las células presentarían deficiencias en la motilidad. La motilidad es una combinación intrínseca entre factores relacionados con la locomoción de las células dendríticas y la expresión de receptores de quimiocinas.

Observaciones en un modelo murino de infección con *Toxoplasma gondii*, los linfocitos T efectores no patrullan el cerebro con un patrón de movimiento browniano, por el contrario exploran aleatoriamente con un patrón de movimiento tipo Levy, cubriendo así más territorio en el cerebro. Esta estrategia es usada por un gran número de animales, incluyendo predadores marinos, aves y mamíferos y así poder incrementar la eficiencia de caza. La presencia de CXCL10 dentro del cerebro inflamado incrementa la velocidad de motilidad en los linfocitos T, pero sin alterar este patrón de migración (Masopust y Schenkel, 2013; Ray *et al.*, 2004).

Lo que se sugiere, es que podría estar sucediendo es a) una retención del reclutamiento en la periferia y por eso encontramos menos células en el pulmón, debido a que se encuentran retrasadas; es decir podría ser por una propagación al azar tipo browniano que no permite la llegada hacia el pulmón, así como también b) la posibilidad de un movimiento al azar súper difusivo (tipo Lévy) que permita el reclutamiento hacia ganglios peribronquiales más rápido con respecto al tiempo (Krummel *et al.*, 2016). En algunos estudios, CCR9 se ha propuesto que funcione como un factor de retención tímico, ya que en estudios con ratones deficientes de CCR9  $-/-$  se encuentra un mayor número de linfocitos  $\gamma\delta$  en el bazo y en ganglios linfáticos (Reinhardt *et al.*, 2014).

Lo que sugiere es que la ausencia de CCR9 genera una alteración en la expresión selectiva de integrinas que causen la retención de las células dendríticas en la periferia y que horas más tarde después de la sensibilización con OVA se encuentren en las vías aéreas. Muy probablemente sea así ya que en un modelo de alergia pulmonar inducido con OVA (Lopez-Pacheco *et al.*, 2016) en un ensayo de ELISA se observó un incremento de TGF- $\beta$  a las 6 horas en ausencia de CCR9 y que a las 24 horas disminuía, comparado con el con el CCR9  $+/+$ . Lo que se sugiere es que el TGF- $\beta$  que es producido localmente por DCs residentes, macrófagos alveolares, incluso células epiteliales

(Hussell y Bell, 2014; Sakaguchi *et al.*, 2010; Chiu y Openshaw, 2015; Randolph *et al.*, 2008) no se esté consumiendo por ninguna célula dendrítica ya que no se encuentran en el pulmón a las 2 horas y esta comience a consumirse después de las 6 horas, porque las células dendríticas comienzan a llegar.

Se sabe que las dendríticas adquieren un fenotipo semi-maduro el cual va acompañado de cambios morfológicos incluyendo la pérdida de estructuras de adhesión o su capacidad migratoria a cambio de la capacidad de procesar antígeno, acompañado de la expresión de moléculas de coestimulación para la activación de las células dendríticas (Hammer y Ma, 2013; Randolph *et al.*, 2008; Banchereau *et al.*, 2000). Observaciones en este trabajo experimental indicaron que hay una tendencia en la menor expresión de marcadores de maduración *in vivo* (**Figura 28**), lo que sugiere, que podría verse alterada la maduración en una célula dendrítica deficiente de CCR9, por ello se confirmó el dato usando otra estrategia experimental, la cual fue realizar ensayos *in vitro* con células dendríticas derivadas de medula ósea. Lo que se encontró fue verdaderamente interesante pues había una disminución en la expresión de marcadores de activación como CD80 y CD86 además de MHC clase II en ratones deficientes de CCR9 (**Figura 29c**), implicando probablemente una relativa inmadurez potencial en las BMDCs. No esperábamos que la ausencia de CCR9 influyera sobre la maduración y activación de las BMDCs, ya que el estímulo fue con LPS y no con OVA. El LPS y la OVA son antígenos que pueden ser reconocidos como un estímulo inflamatorio involucrando la activación de ciertos TLRs, esto nos indica que las células dendríticas son activadas por un estímulo microbiano y al mismo tiempo por un antígeno como la OVA que puede ser integrada como una señal de DAMP que se encuentra en el microambiente, programando así a las DCs para inducir señalización intracelular y activación de factores de transcripción y poder inducir una respuesta particular (Pulendran *et al.*, 2010) estos cambios están asociados a rearrreglos en el citoesqueleto para la movilización celular.

Existen diversos reportes en los que CCR9 está involucrado en la señalización mediada por Jak/Stat en linfocitos T con efectos directos en la migración y reorganización del citoesqueleto, acompañado de cambios morfológicos; incluyendo estructuras de adhesión (Ambriz-Peña *et al.*, 2014). JAK/STAT pertenece a una gran familia de receptores de citocinas, estos receptores están asociados de forma estable a tirosinas quinasa citoplasmáticas denominadas quinasas Janus (JAK: Janus kinase), que fosforilan, y activan, proteínas reguladoras de la expresión génica STAT (signal transducers and activators of transcription; transductores de señal y activadores de la transcripción). Aunque muchas vías de señalización intracelular conducen desde los receptores de superficie hasta el núcleo, donde modifican la transcripción génica, la vía de señalización Jak/Stat constituye la vía más directa al núcleo (Alberts *et al.*, 2014). Además en ratones deficientes de Jak3-

/-, Jak3 es importante para la maduración y reclutamiento hacia los ganglios linfáticos de células dendríticas (Rivas-Caicedo *et al.*, 2009) y en ratones deficientes de Jak3-/-, se ve alterada la morfología de células dendríticas ante estímulos como quimiocinas (Ibarra-Gómez, 2011). Lo que sugiere, es que la retención de las células dendríticas en la periferia pueda ser por una alteración en la maduración y activación de las mismas y por esta razón no se recluten al pulmón en las primeras etapas de la inflamación, además este mismo mecanismo puede afectar a las células dendríticas residentes en el parénquima pulmonar y presenten anergia funcional o una deficiencia en la migración.

En resumen, en los últimos años, muchas de las vías de señalización intracelular clave y las moléculas cascada abajo de los receptores de quimiocinas en la señalización de las DCs han comenzado a ser identificadas, y se han propuesto algunos modelos de transducción de señales (Griffith *et al.*, 2014; Schulz *et al.*, 2016). Sin embargo, un modelo global unificado que abarque la diversidad de receptores de quimiocinas y la notable heterogeneidad de sus efectos biológicos no está bien caracterizado en este momento Por lo que sería interesante indagar sobre el papel de CCR9 y su señalización vía intracelular en las células dendríticas.

Se sugiere que las células dendríticas con una parcial maduración no estén llegando al sitio de inflamación, ya que la pérdida de CCR9 podría comprometer múltiples aspectos de la actividad celular normal incluyendo la proliferación, fagocitosis, presentación cruzada, adhesión celular y directamente la migración. Sin embargo la hipótesis sobre la migración alterada tendría que ser comprobada analizando los ganglios mediastinales y peribronquiales. Nuestro presente trabajo sobre el conocimiento de que CCR9 -/-, demuestra un defecto en la activación de las células dendríticas, papel importante en la motilidad para la migración a pulmón durante la inflamación inmediata.

Resulta interesante que CCR9 no afecta solo a células dendríticas durante las primeras etapas de la inflamación sino que también a otras poblaciones, como los linfocitos T. Observamos que en ausencia de CCR9, los linfocitos T CD4+ en porcentaje como en números totales disminuye drásticamente durante las primeras 2 horas (**Figura 30 b y c**). Las células dendríticas pueden re-estimular localmente la función efectora de los linfocitos T a través de la producción de CCL17 y CCL22 (Lambrecht y Hammad, 2015). Sin embargo, para la inducción de una respuesta adaptativa eficiente, usualmente tarda varios días para que los linfocitos se activen, así que un pequeño número de linfocitos T deben redistribuirse rápidamente a los órganos linfoides para un encuentro con las APCs. De esta manera la respuesta inmune es una carrera contra el tiempo porque las DCs y los linfocitos deben encontrarse rápidamente para una respuesta inflamatoria o tolerogénica (Junt *et*

*al.*, 2008). Es posible que la ausencia de CCR9 pueda llevar a una inmunosupresión temporal, mediante dos formas, en a) no hay células dendríticas; no hay presentación y posteriormente migración de linfocitos T CD4+ desde los ganglios hacia el pulmón o b) no hay reclutamiento de linfocitos T hacia el pulmón desde la periferia; no hay respuesta T<sub>H</sub>2 (secreción de citocinas), lo que sugiere que las células dendríticas tienen un papel indirecto en el reclutamiento de los linfocitos por la re-estimulación local de citocinas.

Resulta interesante que aún en tiempos más cortos se están desarrollando cambios en la dinámica de la inflamación pulmonar, que es consistente con el papel de estas células en la regulación y duración de las exacerbaciones en la inflamación alérgica pulmonar.

Cualquiera que sea el escenario, puede ser beneficiosa para el huésped, porque la inhibición de linfocitos T CD4+ efectores limita la respuesta inmunológica en las primeras 2 horas después de la sensibilización con OVA, debido principalmente a la no-activación de los linfocitos T residentes y aquellos que se encuentran en ganglios para la regulación de la respuesta inflamatoria alérgica pulmonar.

Los linfocitos T reguladores inducidos (iTreg) se generan a partir de linfocitos T CD4+ vírgenes tanto *in vitro* como *in vivo* a través de distintas vías y dependiendo del microambiente. Uno de los mecanismos mejor definidos en la inducción de linfocitos T regs involucra un mecanismo dependiente de TGF- $\beta$  (y de DC CD103+, en intestino). Así, la estimulación de linfocitos T CD4+CD25- vírgenes, a través de su TCR y en presencia de TGF- $\beta$  se genera *de novo* una subpoblación de linfocitos que son fenotípicamente similares a los linfocitos T reguladores tímicos (tTreg), en cuanto a la expresión de CD25, CTLA-4 y Foxp3 (Huehn y Beyer, 2015). Lo que se sugiere es que como no hay reclutamiento de linfocitos T CD4+ al pulmón a las 2 horas no hay inducción de linfocitos T regs *in situ*, aunque parece haber una tendencia en la inducción de iTreg (**Figura 30 d y e**), además de que el TGF- $\beta$  no es consumido hasta después de las 6 horas después de la sensibilización en CCR9 -/- (López-Pacheco *et al.*, 2016), no favoreciendo condiciones tolerogénicas. Se observó que en ausencia de CCR9 disminuía el número de linfocitos T reguladores a las 24 horas (**Figura 30e**), lo que podría pasar es que no hay supresión de linfocitos T efectores, porque quizá los linfocitos no migraron a pulmón debido a la ausencia de células dendríticas que no activaron a los linfocitos en ganglios para su reclutamiento hacia el pulmón.

Por lo tanto, la respuesta de las células epiteliales y linfoides en las primeras etapas de la inflamación es crítica para el posterior desarrollo de la inmunidad adaptativa en el pulmón. por lo que no son solo responsables del reclutamiento de células del sistema inmune, sino que también proporcionan las señales coestimuladoras necesarias para inducir proliferación y diferenciación de

linfocitos B y T (Chiu y Openshaw, 2015), que van causando el estrechamiento las vías aéreas y la degranulación de células cebadas (Robb *et al.*, 2016), esto genera una respuesta asmática tardía caracterizada por un infiltrado rico en basófilos, neutrófilos y eosinófilos en el parénquima pulmonar y en las vías aéreas.

La producción de anticuerpos de alta afinidad y linfocitos B de memoria es resultado de la diferenciación clásica de los linfocitos B dependiente de los linfocitos T (Chiu y Openshaw, 2015), muy probablemente la generación de anticuerpos de alta afinidad provengan de células plasmáticas de memoria que se indujeron en la pre-sensibilización de OVA con Alum “Hidróxido de Aluminio” (**Figura 16**), el alum potencia la inmunidad humoral, posiblemente mediante la activación directa de células dendríticas foliculares (FDCs) y linfocitos B foliculares (Kool *et al.*, 2008), por eso quizá no encontramos alteraciones en la producción de IgE (**Figura 21**), tanto el LBA como en suero. Además de que los linfocitos T foliculares ( $T_{FH}$ ) en las amígdalas, están especializados en la generación y mantención de linfocitos B de alta afinidad (Chiu y Openshaw, 2015). Se sabe que los precursores de células plasmáticas al activarse en los tejidos linfoides cercanos al tracto respiratorio, expresan bajos niveles de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y CCR9 para poder migrar hacia la tráquea y la mucosa bronquial, pero expresan altos niveles de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  y CCR10 (Kunkel y Butcher, 2003). La contraparte de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  y CCR10, la molécula de adhesión (VCAM1) y la quimiocina CCL28 respectivamente se expresan constitutivamente por las células endoteliales de la mucosa en las vías aéreas (Campbell *et al.*, 2001). Lo que sugiere es que CCR9 no es tan importante para el reclutamiento de células plasmáticas a pulmón como tampoco para la producción de IgE.

Sin embargo, observaciones *in situ* sobre el infiltrado celular rico en eosinófilos no parece alterarse hasta las 24 horas (**Figura 22 b y d**). La relación entre una menor área de infiltrado a las 24 horas podría correlacionar con el número de eosinófilos CCR3, SiglecF+ disminuidos a las 2 y 24 horas en LBA (**Figura 31c**). El papel de los eosinófilos como marcador del asma humana crónica es de suma importancia para la reparación y/o daño hacia el tejido pulmonar ya que son una población de células que son moduladas por la interleucina IL-5, que estimula el desarrollo de eosinófilos desde la médula ósea hacia la mucosa pulmonar, mediante la producción de quimiocinas eotaxinas como las eotaxinas 1, 2 y 3 (CCL11, CCL24 y CCL26, respectivamente) (Pundir *et al.*, 2013; Holgate *et al.*, 2015; Lambrecht y Hammad, 2015). Los productos derivados de los eosinófilos como la peroxidasa causan hiperreactividad bronquial (BHR), similar a los neutrófilos producen citolisis. Trampas extracelulares de DNA que contienen gránulos eosinofílicos pueden llevar a una concentración alta de toxinas eosinofílicas como neurotoxina derivada de eosinófilos, proteína catiónica, cristales de Charcot-Leyden y la proteína básica principal, que causan daño estructural en las células epiteliales del pulmón (Lambrecht y Hammad, 2015). Nuestras observaciones sugieren que los eosinófilos

CCR3, SiglecF+ están disminuidos directamente o indirectamente en ausencia de CCR9. Las células dendríticas podrían tener un papel indirecto en la inmunosupresión temporal de los mediadores celulares en la fase temprana de la inflamación y tener consecuencias en el reclutamiento de eosinófilos (mediante la producción de citocinas) en la fase tardía. Lo cual es muy importante, ya que la eliminación de los eosinófilos a través de CCR9 como blanco terapéutico podría llevar a reducir la exacerbación y frecuencia de episodios de un cuadro asmático.

En resumen la homeostasis del pulmón debe ser equivalente a un estado de “alerta mínima”, que permita el intercambio gaseoso “O<sub>2</sub>” y mantenga la sobrevivencia de las células residentes, la mantención de los mecanismos para la discriminación de antígenos inocuos y aquellos potencialmente patógenos como punto de control para la regulación de la tolerancia inmunológica y homeostasis del tejido, con la capacidad local para la fuerte movilización de células efectoras. En este escenario en que las células dendríticas CCR9+ no se reclutan a pulmón durante las primeras horas, tiene un efecto sobre otras células como eosinófilos tanto directa- como indirectamente a las 24 horas limitando el daño en el tejido pulmonar por una respuesta innecesaria ante un antígeno no patógeno o una agresiva respuesta mediada por linfocitos T efectoras o de memoria contra antígenos como OVA.

Esto nos lleva a pensar que varias poblaciones contribuyen al mantenimiento de la homeostasis local en el tracto respiratorio, y en algunos casos exhiben funciones del microambiente, sin embargo las células dendríticas CCR9+ tienen un papel importante en la modulación de otras poblaciones celulares durante la inflamación alérgica pulmonar.

Por otro lado hay preguntas abiertas muy importantes sobre CCL25 como la ubicación exacta, la disponibilidad y la estabilidad en los tejidos *in vivo*.

## Conclusiones

1. Se estableció el modelo de inflamación alérgico pulmonar murino **inducido por OVA** evaluado a través del reclutamiento de diferentes poblaciones celulares en LBA por cytopspin, secreción de **IgE específica** de OVA, infiltrado celular *in situ* y producción de **moco** por histología.
2. CCR9 no es esencial para la producción de IgE en un modelo de inflamación alérgico pulmonar.
3. Histológicamente el reclutamiento de **células dendríticas alveolares, y perivenulares DEC-205+** es menor en un ratón deficiente CCR9 -/- a las 2 horas.
4. El reclutamiento de **células dendríticas CD103+** y **linfocitos T CD4+** es menor en un ratón deficiente CCR9 -/- a las 2 horas en LBA en ratones sensibilizados con OVA por FACS.
5. El reclutamiento de **linfocitos Treg** es menor en un ratón deficiente CCR9 -/- a las 24 horas en LBA en ratones sensibilizados con OVA por FACS.
6. El número de **eosinófilos** se ve disminuido en ausencia de CCR9 en un ratón a las 2 y 24 horas en ratones sensibilizados con OVA por FACS.
7. Se encontró una disminución en **marcadores de activación** de células dendríticas derivadas de médula ósea *in vitro*.

## Conclusión general

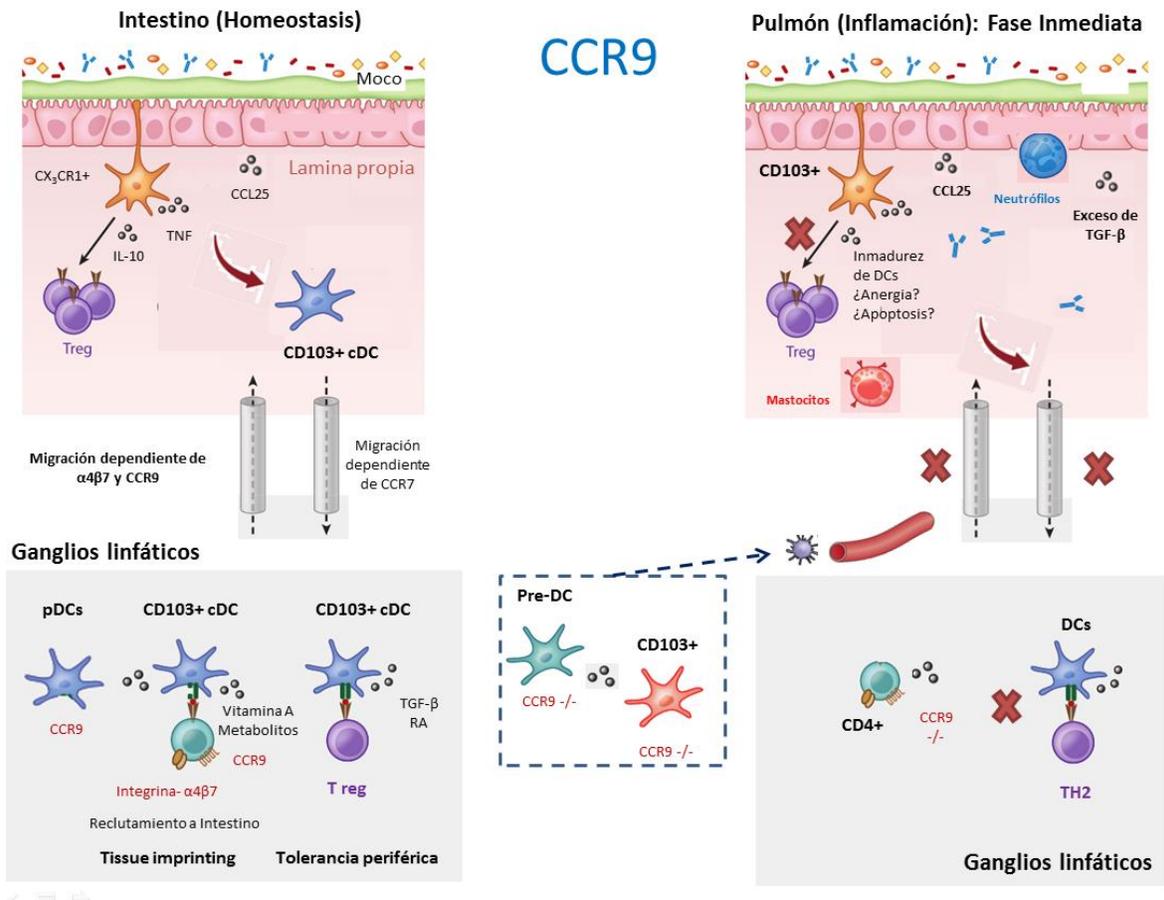
- En nuestro modelo de alergia pulmonar murino el receptor de quimiocinas CCR9 tuvo un papel importante en las primeras etapas de la inflamación para el reclutamiento de células a pulmón.
- El tiempo es importante para la regulación mediada por CCR9 durante un proceso alérgico inflamatorio pulmonar.

## Perspectivas

1. Evaluar las células dendríticas CD103+ en ganglios peribronquiales por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.
2. Analizar las células dendríticas CD11b+ en LBA.
3. Analizar en láminas epidérmicas las células dendríticas CD103+ en tráquea.
4. Evaluar la expresión espacio-temporal de CX<sub>3</sub>CR1 y CCR9 en células dendríticas por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.
5. Analizar el índice de migración por quimiotaxis de células dendríticas derivadas de médula ósea CCR9 +/+ y CCR9 -/- *in vitro*.

6. Evaluar la función de las células dendríticas CCR9  $-/-$  mediante el co-cultivo con linfocitos T vírgenes.
7. Evaluar la expresión de otros receptores de quimiocinas a las 6 y 24 en ratones CCR9  $-/-$ .
8. Evaluar la expresión de citocinas tipo  $T_H2$  por RT-PCR en pulmón y LBA.

## Modelo



- Las células dendríticas CD103+ no llegan en ausencia de CCR9 desde la periferia hacia el pulmón
- No hay dendríticas no hay activación de linfocitos T en los ganglios e *in situ*
- Tolerancia por inmadurez de las células dendríticas
- CCR9 en las células dendríticas es importante para inducir una respuesta adaptativa en ganglios linfáticos

## Bibliografía

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y S. Pillai. 2015. *Inmunología Celular y Molecular*. Octava Edición. Elsevier. México.
2. Ambriz-Peña, X., E.A. Garcia-Zepeda., Meza, I. and G. Soldevila. 2014. *Jak3 enables Chemokine-Dependent Actin Cytoskeleton Reorganization by regulating Cofilin and Rac/Rhoa GTPases*. Plos One 9(2).
3. Andrew, H. and Liu MD. 2015. *Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma*. Journal Allergy Clin Immunology 136:860-5
4. Balhara, J. and A.S. Gounni. 2012. *The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword*. Mucosal Immunology 5, 605–609
5. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature 392, 245-252
6. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. and K. Palucka. 2000. *Immunobiology of dendritic cells*. Annu. Rev. Immunol. 18:767–811
7. Bateman, E.D., Hurd, S.S., Barnes, P.J., Bousquet, J., Drazen, J.M., FitzGerald, M., Gibson, P., Ohta, K., Byrne, P.O., Pedersen, S.E., Pizzichini, E., Sullivan, S.D., Wenzel, S.E and H.J. Zar. 2008. *Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary*. Eur Respir J; 31: 143–178
8. Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Calvo-Quesada, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., De Leval, L., Van-Rooijen, N., Le Moine, A., Vanderplasschen, A., Cataldo, D., Drion, P.V., Moser, M., Lekeux, P. and F. Bureau. 2009. *Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice*. Clin. Invest. 119:3723–3738.
9. Begin, P. and K.C. Nadeau. 2014. *Epigenetic regulation of asthma and allergic disease*. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 10:27
10. Bell, D., Young, J.W. and J. Banchereau. 1999. *Dendritic cells*. Advances in Immunology. Academic Press. Pp 255-317
11. Boehm, T and J. B. Swann. 2014. *Origin and Evolution of Adaptive Immunity*. Annu. Rev. Anim. Biosci. 2014. 2:259–83
12. Boltjes, A. and F. Van Wijk. 2014. *Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation*. Front Immunol. 5: 131.
13. Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R. and M.W. Russell. 2008. *Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue*. Mucosal Immunology 1, 31–37.
14. Bratke, K., Prieschenk, C., Garbe, Kuepper, M., Lommatzsch, M., y J.C. Virchow. 2012. *Plasmacytoid dendritic cells in allergic asthma and the role of inhaled corticosteroid treatment*. Clinical & Experimental Allergy, 43, 312–321.
15. Campbell, J. J. *et al.* 2001. *Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects*. J. Immunol. 166, 2842–2848
16. Chen, K. and J.K. Kolls. 2010. *Good and bad lipids in the lung*. Nature Medicine 16, 1078–1079
17. Chiu, C. and P. J. Openshaw. 2015. *Antiviral B cell and T cell immunity in the lungs*. Nature Immunology 16, 18–26.
18. Costa, M.F.S., Bornstein, V.U., Candea, A.L., Henriques-Pons, A., Henriques, M.G. and C. Penido. 2012. *CCL25 induces  $\alpha_4\beta_7$  integrin-dependent migration of IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T lymphocytes during an allergic reaction*. Eur. J. Immunol. 2012. 42: 1250–1260
19. Cui, D., Natftel, J.P., Lynch, J.C., Yang, G., Daley, W.P., Haines, D.E. and J.D. Fratkin. *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*. 2011. First Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. Philadelphia.
20. Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. and T. Lawrence. 2014. *Dendritic cell maturation: functional specialization through signalling specificity and transcriptional programming*. EMBO J. 16;33(10):1104-16
21. Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J. E. and P.R. Taylor. 2013. *Tissue-resident macrophages*. Nature Immunology 14, 986–995.

22. Drakes, M.L., Stiff, P.J. y T.G Blanchard. 2009. *Inverse relationship between dendritic cell CCR9 expression and maturation state*. Immunology, 127, 466–476
23. Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H and N.H. Ruddle. 2006. *Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis*. Nature Immunology 7, 344 – 353
24. Durham, A.L., Wiegman, C. and M.Adcock. 2011. *Epigenetics of asthma*. Biochimica et Biophysica Acta 1810 1103–1109.
25. Esterházy, D., Loschko, J., London, M., Jove, V., Oliveira, T. Y. and D. Mucida. 2016. *Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T reg cells and tolerance*. Nature Immunology 17, 545–555
26. Feuerer, M., Hill, J.A., Mathis, D. and Benoist, C. 2009. *Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes*. Nature Immunol. 10(7):689-95.
27. Flores-Romo, L. 2001. *In vivo maturation and migration of dendritic cells*. Nature Immunology 102 255-262
28. Forno, E., Young, O. M., Kumar, R., Simhan, H. & Celedon, J. C. 2014. *Maternal obesity in pregnancy, gestational weight gain, and risk of childhood asthma*. Pediatrics 134, e535–e546
29. Geissman, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M. and K. Ley. 2010. *Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells*. Science Vol. 327, Issue 5966, pp. 656-661.
30. Germain, R.N. 2002. *T cell Development and the CD4-CD8 Lineage Decision*. Nature Reviews. Immunology. Volume 2.
31. Gerner, M.Y., Kastenmuller, W., Ifrim, I., Kabat, J. and R. N. Germain. 2012. *Histo-Cytometry: A Method for Highly Multiplex Quantitative Tissue Imaging Analysis Applied to Dendritic Cell Subset Microanatomy in Lymph Nodes*. Immunity. 37(2): 364–376.
32. GeurtsvanKessel, C.H. and B.N Lambrecht. 2008. *Division of labor between dendritic cell subsets of the lung*. Mucosal Immunol. 1(6):442-50.
33. Gould, H.J. and B.J. Sutton. 2008. *IgE in allergy and asthma today*. Nature Reviews Immunology 8, 205-217
34. Griffith, J.W., Sokol, C.L and A.D. Luster. 2014. *Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity*. Annual. Rev. Immunol. 32:659–702
35. Hammad, H. and B.N Lambrecht. 2008. *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma*. Nature Reviews Immunology 8, 193-204
36. Hammer, G.E and A. Ma. 2013. *Molecular Control of Steady-State Dendritic Cell Maturation and Immune Homeostasis*. Annual. Rev. Immunol. 31: 743-91.
37. Hill, D.A. and D. Artis. 2010. *Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis*. Annual. Rev. Immunol. 28:623–67
38. Holgate, S.T., Wenzel, S., Postma, D.S., Weiss, S.T., Renz, H. and P.D. Sly. 2015. *Asthma*. [Nature Reviews Dis Primers](#). 10;1:15025
39. Holt, P.G. et al. 1993. *Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages*. J. Exp. Med. 177, 397–407
40. Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikstrom M.E. and F. L. Jahnsen. 2008. *Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract*. Nature Reviews Immunology 8, 142-152.
41. Huang, Y.J. and H.A. Boushey. 2015. *The microbiome in asthma*. Journal Allergy Clin Immunol 135:25-30.
42. Husell, T. and T.J. Bell. 2014. *Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context*. Nat Rev Immunol. 14(2):81-93.
43. Ibarra-Gomez, C.B. 2011. *Efecto de la deficiencia de la cinasa Jak3 en la morfología de las células dendríticas bajo el estímulo de quimiocinas*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México DF.
44. Idoyaga, J., Fiorese, C., Zbytnuik, L., Lubkin, A., Miller, J., Malissen, B., Mucida, D., Merad, M. and R.M Steinman. 2013. *Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction*. J Clin Invest.123 (2):844–854.
45. Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Bianco, G.A., Toscano, M.A., Salatino, M., Vermeulen, M.E., Geffner, J.R. and G. A Rabinovich. 2009. *Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10*. Nature Immunology 10, 981 – 991
46. Iwata, M. et al. 2004. *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells*. Immunity 21, 527-538.

47. Junt, T., Scandella, E. and B. Ludewig. 2008. *Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence*. Nature Reviews Immunology 8, 764–775.
48. Kim, E.Y. et al. 2008. *Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease*. Nat. Med. 14, 633–640
49. Kool, M., Soullie, T., Nimwegen, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H. and B.N. Lambrecht. 2008. *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells*. J Exp Med. 205(4):869-82.
50. Kopf, M., Schneider, C. and S. P. Nobs. 2015. *The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells*. Nature Immunology 16, 36–44
51. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. y R.N. Mitchell. 2008. *Robbins Patología Humana*. 8ª Edición. Elsevier Saunders. España.
52. Kunkel, E. J. and Butcher, E.C. 2003. *Plasma-cell homing*. Nature Rev. Immunology. 3, 822-829.
53. Kushwah, R. and J. Hu. 2011. *Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system*. Immunology 133(4): 409–419.
54. Lambrecht, B.N and H. Hammad. 2012. *Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology*. Annual. Rev. Immunol. 30:243–70
55. Lambrecht, B.N y H. Hammad. 2015. *The Immunology of Asthma*. Nature Immunology.
56. Lopez-Pacheco, C., Du Pont, G., Wurbel, M.A., Fortoul, T., Soldevila, G. and E. Garcia-Zepeda. 2012. *Role of the CC- Chemokine Receptor CCR9 in the Regulation of Inflammatory Process During Allergic Airway Inflammation*. World Allergy Organ J. 2012 Feb; 5(Suppl 2): S57–S58
57. López-Pacheco, C., Soldevila, G., Du Pont, G., Hernández-Pando, R. and E.A. García-Zepeda. 2016. *CCR9 Is a Key Regulator of Early phases of Allergic Airway Inflammation*. Mediators of Inflammation. Volume 2016. Article ID 3635809.
58. Maldonado, R.A. and U.H. von Andrian. 2010. *How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells*. Adv Immunology. 108: 111–165
59. Manni, M.L., Trudeau, J.B., Scheller, E.V., Mandalapu, S., Elloso, M.M., Kolls, J.K., Wenzel, S.E. and J.F. Alcorn. 2014. *The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma*. Mucosal Immunology 7, 1186–1198
60. Masopust, D. and J.M. Schenkel. 2013. *The integration of T cell migration, differentiation and function*. Nature Reviews Immunology 13, 309-320.
61. Mc William, A.S., Stumbles, P.A. and P.G Holt. 1999. *Dendritic cells: Biology and Clinical Applications*. Chapter 8; Dendritic cells in Lung. 122-133.
62. Mehta, A. and D. Baltimore. 2016. *MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic*. Nature Reviews Immunology 16, 279–294
63. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. and A. Mortha. 2013. *The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting*. Annual. Rev. Immunol. 31:563–604
64. Michalik M, Pierzchalska M, Legutko A, UraM, Ostaszewska A, et al. 2009. *Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture*. Med. Sci. Monit. 15:BR194–201
65. Mildner, A. and S. Jung. 2014. *Development and Function of dendritic cell subsets*. Immunity. 15;40(5):642-56
66. Nakano, H., Free, M.E., Whitehead, G.S., Maruoka, S., Wilson, R.H., Nakano, K. and D.N Cook. 2012. *Pulmonary CD103+ dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens*. Mucosal Immunol. Volume 5 Number 1. Jan; 5(1):53-65.
67. O'Connell, R.M. Rao, D.S. and D. Baltimore. 2012. *microRNA Regulation of Inflammatory Responses*. Annu. Rev. Immunol. 30:295–312
68. O'hayre, M., Salanga, C.L., Handel, T.M. and S.J. Allen. 2008. *Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment*. Biochem. J. 409, 635–649
69. Olguin-Alor, R. 2014. *Papel de las inhibinas en la diferenciación de células dendríticas*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 29 p.
70. Organización Mundial de la Salud (OMS), [s.f]. Consulta en línea el 07 de julio de 2016 en <http://www.who.int/respiratory/asthma/es/>
71. Papadakis, K.A., Prehn, J., Nelson, V., Cheng, L., Binder, S.W., Ponath, P.D., Andrew, D.P. and S.R. Targan. 2000. *The Role of Thymus-Expressed Chemokine and Its Receptor CCR9 on*

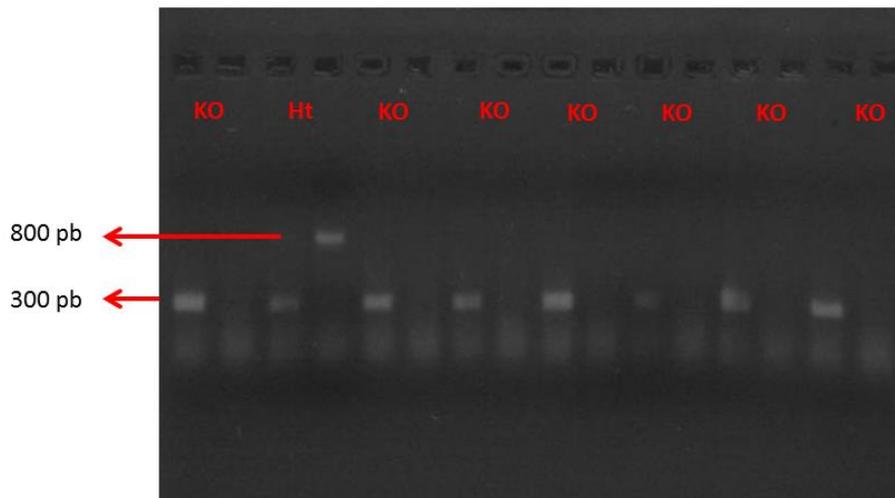
- Lymphocytes in the Regional Specialization of the Mucosal Immune System*. J. Immunol. 165: 5069-5076.
72. Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., Hammad, H. and B.N Lambrecht. 2013. *Conventional and Monocyte-Derived CD11b + Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen*. Immunity 38, 322–335.
  73. Platts-Mills, T.A.E. 2015. *The allergy epidemics: 1870-2010*. Journal Allergy Clin Immunology 136:3-13.
  74. Priyanka Pundir, Xiaofeng Wang and Marianna Kulka (2013). *Asthma in the 21st Century — Unexpected Applications of Ancient Treatments, Using Old Solutions to New Problems - Natural Drug Discovery in the 21st Century*, Dr. Marianna Kulka (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/56428.
  75. Pulendran, B. 2005. *Variation of the Immune Response with Dendritic Cells and Pathogen Recognition Receptors*. Journal of Immunology. 174:2457-2465.
  76. Pulendran, B., Tang, H. and S. Manicassamy. 2010. *Programming dendritic cells to induce T<sub>H</sub>2 and tolerogenic responses*. Nature Immunology 11, 647–655
  77. Randall, T.D. and R.E. Mebius. 2014. *The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with microorganisms*. Mucosal Immunology 7, 455–466
  78. Randolph, G.J., Ochando, J. and S. Partida-Sanchez. 2008. *Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors*. Annual. Rev. Immunol. 26:293–316
  79. Ray, S.J. et al. 2004. *The collagen binding  $\alpha 1\beta 1$  integrin VLA-1 regulates CD8 T cell-mediated immune protection against heterologous influenza infection*. Immunity 20, 167-179.
  80. Redington, A.E, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, RocheWR, et al. 1997. *Transforming growth factor- $\beta 1$  in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156:642–47
  81. Reinhart, A., Ravens, S., Fleige, H., Hass, J.D., Oberdorfer, L., Lyszkiewicz, M., Forster, R. and I. Prinz. 2014. *CCR7-mediated migration in the thymus controls  $\gamma\delta$  T-cell development*. Eur. J. Immunology. 44: 1320-1329.
  82. Reyes-Martinez. J.E. 2010. *Activación diferencial de células dendríticas murinas de origen mieloide con cepas de diferente virulencia del complejo Mycobacterium tuberculosis (MTC)*. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. 24 p.
  83. Rivas-Caicedo, A., Soldevila, G., Fortoul, T.I., Castell-Rodriguez, A. Flores-Romo, L. and E. A. García-Zepeda. 2009. *Jak3 is involved in Dendritic Cell Maturation and CCR7-Dependent Migration*. PloS One. 4(9).
  84. Robb, C.T., Regan, K.H., Dorward, D.A. and A.G. Rossi. 2016. *Key mechanisms governing resolution of lung inflammation*. Semin Immunopathol. 38(4):425-48.
  85. Sakaguchi, S., Miraya, M., Costantino, C.M. and D.A. Hafler. 2010. *Foxp3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nature. Rev. Immunol. 10(7):490-500.
  86. Salas, J.H. 2010. *Asma y condiciones especiales*. INER. PyDESA. México. Pag 28-37.
  87. Salmon, H., et al. 2016. *Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition*. Immunity. 44(4):924-38.
  88. Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C. and K.M Murphy. 2012. *Re (de)fining the dendritic cell lineage*. Nature Immunology 13, 1145–1154
  89. Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J. and I.J MacRae. 2014. *Structural basis for microRNA targeting*. Science 346, 608.
  90. Schulz, O., Hammerschmidt, S.I., Moschovakis, G.L. and R. Forster. 2016. *Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics*. Annual. Rev. Immunol. 34:203–42
  91. Shakib, F., Ghaemmaghami, A.M. and H.F. Sewel. 2008. *The molecular basis of allergenicity*. Trends in Immunology , Volume 29 , Issue 12 , 633 – 642
  92. Shlitzer, A., Loschko, J., Mair, K., Vogelmann, R., Henkel, L., Einwachter, H., Schiemann, M., Niess, J-H., Reindi, W. and A. Krug. 2011. *Identification of CCR9- murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs*. Blood. 117(24):6562-70.
  93. Steinman, R. 2012. *Decisions About Dendritic Cells: Past, Present and Future*. Annual. Rev. Immunol. 30: 1-22.
  94. Steinman, R.M. and Z. A. Cohn. 1973. *Identification of novel Cell Type in Peripheral Lymphoid organs of mice*. The Journal of Experimental Medicine, 137: 1142–1162

95. Stingl, G., Tamaki, K. and S.I. Katz. 1980. *Origin and Function of Epidermal Langerhans Cells*. Immunological Rev. Vol. 53.
96. Svensson, M and W.W. Agace. 2006. *Role of CCL25/ CCR9 in immune homeostasis and disease*. Expert Rev. Clin. Immunol. 2(5), 759-773.
97. Torday, J. S. et al. 2002. *Leptin mediates the parathyroid hormone-related protein paracrine stimulation of fetal lung maturation*. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 282, L405–L410
98. Trejo-Bittar, H.E., Yousem, S.A. and Wenzel, E. 2015. *Pathobiology of Severe Asthma*. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2015. 10:511–45
99. Valdivia-Silva, J., Medina-Tamayo, J. and E.A. García-Zepeda. 2015. *Chemokine-Derived Peptides: Novel Antimicrobial and Antineoplastic Agents*. International Journal. Mol. Sci. 16, 12958-12985
100. Van Rijt, L.S and B.N Lambrecht. 2005. *Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization*. Clin Exp. Allergy 35:1125–1134
101. Wenzel, S.E. 2012. *Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches*. Nature Medicine 18, 716–725.
102. Whitsett, J.A. and T. Alenghat. 2015. *Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity*. Nature Immunology 16, 27–35
103. Wurbel, M.A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Richelme, M., Carrier, A. and B. Malissen. 2001. *Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T-and B cell development and a reduction in T-cell receptor  $\gamma\delta^+$  gut intraepithelial lymphocytes*. BLOOD JOURNAL, VOLUME 98, NUMBER 9.
104. Youn, B-S., Kim, C.H., Smith, F.O. and H.E Broxmeyer. 1999. *TECK, an Efficacious Chemoattractant for Human Thymocytes, Uses GPR-9-6/CCR9 as a Specific Receptor*. Blood, Vol 94. 2533-2536.
105. Zaballos, A., Gutiérrez, J., Varona, R., Ardavín, C. and G. Márquez. 1999. *Cutting Edge: Identification of the Orphan Chemokine Receptor GPR-9-6 as CCR9, the Receptor for the Chemokine TECK*. J Immunology. 162 (10) 5671-5675.
106. Zabel, B.A., Rott, A. and E.C Butcher. 2015. *Leukocyte Chemoattractant Receptors in Human Disease Pathogenesis*. Annual. Rev. Pathol. Mech. Dis. 10:51–81.

## Anexos

### Análisis del genotipo de ratones CCR9 +/+ y CCR9 -/-

El producto de CCR9 se amplificó por PCR. El producto de CCR9 +/+ silvestre contiene la banda de 800 pb, el ratón deficiente CCR9 -/- presenta solo la banda de 300 pb y el ratón heterocigoto CCR9 +/- ambas bandas.



### Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la PCR y sus condiciones de amplificación.

#### CCR9-R1

GGCATTCAACCTCAGAATGTT antisense

T<sub>m</sub>= 62.8 °C

#### CCR9-F1

CATCCACACTGTGAGTGTTC sense

T<sub>m</sub>= 62.4 °C

#### CCR9-REV

GCAAAGTGCCTGACATTATTT centro

T<sub>m</sub>= 60.6 °C

1. Mix de 3 primers para la reacción de PCR
2. Tomar 1 µL de cada oligo y agregar 27 µL de H<sub>2</sub>O depc
3. Usar 1 µL del mix para cada reacción de PCR de 25 µL total.

## Reactivos

### PBS 10X pH 7.4 (1000 mL)

NaCl	80.0 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
H <sub>2</sub> O dd	1000 mL

### Buffer de FACS (500 mL)

Suero Fetal Bovino 2%	10 mL
Azida de Sodio 0.05 %	0.5 mL
PBS 1X pH 7.4	489.5 mL

### PBS 10X pH 7.4/BSA 10%

Albumina sérica Bovina	5 g
PBS 1X pH 7.4	Aforar a 50 mL

### PBS 1X Tween 20 (1000 mL)

Albumina 30 %	3.3 mL
H <sub>2</sub> O dd	996.7 mL

### PBS 1X/BSA 1% (50 mL)

BSA	0.5 g
H <sub>2</sub> O dd	Aforar a 50 mL

### EDTA 0.5 M (5 mL)

EDTA	0.981 g
H <sub>2</sub> O dd	Aforar a 5 mL

### Solución de lisis (DNA)

NaOH 50 mM	
EDTA 0.02 mM	
Tris 10 mM (pH 5)	

### TAE 50X (100 mL)

Tris-Base	24.1 g
CH <sub>3</sub> -COOH	5.71 mL
EDTA 0.5 M (pH 8)	10 mL

### H<sub>2</sub>O DEPC (1000 mL)

DEPC (0.05%)	500 µL
--------------	--------

### NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 8.3 (50 mL)

NaHCO <sub>3</sub>	0.8401 g
H <sub>2</sub> O dd	Aforar a 50 mL

**PBS 1X pH 7.4, Tween 20 (500 mL)**

Tween 20 (0.05%)

0.25 mL

PBS 1X pH 7.4

Aforar a 500 mL

**Agarosa 1.5 - 1.8 %****SFB**

Desactivar

Calentar 30 min a 56 °C

Alícuotas de 10 mL

Guardar a -20 °C

**ACK (Buffer de lisis de eritrocitos) (1000 mL)**NH<sub>4</sub>CL 0.15 M

8.29 g

KHCO<sub>3</sub> 1 M

1.00 g

Na<sub>2</sub>EDTA 0.1 M

37.2

H<sub>2</sub>O dd

800 mL

Ajustar pH 7.2 y filtrar

**Anticuerpos para ratón**

Anticuerpo	Referencia	Compañía	Dilución para Inmunofluorescencia	Fluorocromo	V total/ Concentración
CD3e	60-0031-U100	TONBO Biosciences	1/200	PeCy7	0.5 mL (0.2 mg/mL)
CD4			1/700	APC Cy7	
CD25		BD Pharmigen-Biosciences	1/100	Pe	0.5 mL (0.2 mg/mL)
CD8			1/200	PerCP Cy5.5	
FoxP3			1/50	APC	
Siglec-F	552125	BD Pharmigen-Biosciences	1/50	Rata α- ratón	0.5 mL (0.2 mg/mL)
CCR3	FAB729P	RD Systems	1/20	Pe	
Gr-1		TONBO	1/100	PerCP Cy5.5	
Cd11c	117324	Biolegend	1/300	APC Cy7	0.5 mL (0.2 mg/mL)
MHC II	107624	Biolegend	1/200	PerCP	0.5 mL (0.2 mg/mL)
CD103	13-1031-82	eBioscience full spectrum	1/300		0.5 mL (0.2 mg/mL)
CD86	105008	Biolegend	1/100	Pe	0.5 mL (0.2 mg/mL)
F480			1/200	APC	
CCR9			1/800		
α-rata biotina			1/600		
α-ratón AF 488			1/2000		
Sav APC	405207		1/600		
Sav PeCy7	405206	Sav PeCy7	1/600		
CD4			1/100	FITC	
CD3			1/200	Pe	
CD4			1/200	Pe Cy5	
CD80		Biolegend	1/200	α- ratón biotina	0.5 mL (0.2 mg/mL)
CD8				APC	
F480	123111	Biolegend	1/300	Pe/Cy5	125 µL (0.2 mg/mL)
CD3e		TONBO Biosciences	1/200	PeCy7	