



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO, FEDERICO GÓMEZ
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS**

IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YIN YANG (YY1) Y SU ASOCIACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE TGF- β EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO MURINO DE ASMA CON DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD.

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
ARCADIO HERNÁNDEZ MATA**

Directora: Dra. Sara Huerta Yopez

Asesora: Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez



México D. F. 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Lugar de realización:

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez. Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología, Dr. Daniel Méndez Hernández, Centro Médico Nacional, La Raza, IMSS.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación local del IMSS (99-693-0014), recibió financiamiento del IMSS (09B5 61 2800) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (48020).

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la Dra. Sara Huerta Yopez por haberme permitido ser su alumno y por toda la atención prestada a la realización de esta tesis, así como también le agradezco a todo su excelente equipo de trabajo que me apoyo durante mi estancia en el Hospital Infantil.

A la Dra. Martha A. Sánchez y a mis sinodales, muchas gracias, ya que con su gran ayuda y amabilidad, me auxiliaron con las revisiones de este trabajo.

Y por ultimo, pero no con menos importancia, con mucho cariño y amor a mis padres y hermanos, que han estado siempre conmigo en todas y cada una de mis decisiones buenas y malas bajo cualquier circunstancia. Su enorme esfuerzo y ayuda fueron indispensables para que pudiera seguir adelante, por lo tanto, este triunfo en gran parte es de ustedes. Gracias.

INDICE

Resumen	5
Introducción	6
Marco teórico	8
1. Epidemiología del asma	8
2. Etiología del asma	8
2.1 <i>Linfocitos T</i>	8
2.1 <i>Linfocitos Th1 y Th2</i>	10
2.2 <i>Citocinas</i>	12
2.2.1 <i>Interleucina 4</i>	12
2.2.2 <i>Interleucina 5</i>	13
2.2.3 <i>Factor de crecimiento transformante (TGF-β)</i>	13
3. Patogenia del asma	15
3.1 <i>Etapas de la respuesta alérgica</i>	15
3.1.1 <i>Etapa de sensibilización</i>	15
3.1.2 <i>Etapa de respuesta tardía</i>	17
3.2 <i>Funciones de la IgE en la respuesta alérgica. Hipersensibilidad inmediata ajuste del alérgeno y regulación de IgE</i>	18
3.3 <i>Importancia funcional y procesamiento del TGF-β</i>	19
3.4 <i>Participación del TGF-β en el reclutamiento y activación de células inflamatorias</i>	21
3.5 <i>Factor de transcripción Ying-Yang 1 (YY1)</i>	23
3.6 <i>Regulación de la transcripción mediada por YY1</i>	23
3.6.1 <i>Coactivadores de YY1</i>	26

3.7. <i>Relación entre YY1 y TGF-β</i>	26
4. Tecnología de microarreglos de tejidos	28
Planteamiento del problema	30
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
Hipótesis	32
Metodología	33
1 Modelos murinos de asma	33
2 Deshidratación e inclusión del tejido	36
3 Corte de tejido y preparación de laminillas	36
4 Tinción H/E	37
5 Punteado de laminillas	37
6 Microarreglo de tejidos	37
7 Inmunohistoquímica	38
8 Análisis morfométrico	39
9 Análisis estadístico	40
Resultados	41
Discusión de resultados	54
Conclusiones	59
Propuestas	60
Anexo	61
Referencias	63

RESUMEN

La atópia es uno de los principales factores para el desarrollo del asma, se conocen una variedad de genes y sus productos, que están relacionados con la susceptibilidad del asma. TGF- β es una citocina que se ha asociado con la inflamación y remodelación en procesos asmáticos, además esta reportado que YY1, un factor de transcripción que se encuentra de manera ubicua, activa la transcripción de TGF- β en modelos *in vitro*. La finalidad de este trabajo radica en evaluar la asociación existente entre la expresión de esta citocina y la expresión del factor de transcripción, en un modelo *in vivo* con diferentes grados de severidad. Para conocer esta asociación, se emplearon modelos murinos con diferentes grados de asma, alérgicos a ovoalbúmina (OVA), de donde se obtuvieron microarreglos de tejidos para vasos y bronquios, a los que por medio de pruebas inmunohistoquímicas y con el apoyo del análisis morfométrico se cuantificó la densidad de área de la expresión para TGF- β y YY1, estandarizándose las condiciones del ensayo. Por último se calculó una correlación de Pearson para evaluar la asociación. Se encontró que la expresión de TGF- β en vasos y bronquios está asociada con la expresión de YY1 en células de las vías aéreas, presentando una correlación de Pearson positiva ($r = 0.391$ y $p = 0.035$). Por lo tanto, estos resultados sugieren la posibilidad de que YY1 puede estar regulando la expresión de TGF- β *in vivo*, y la elevada expresión de esta citocina está asociada con el grado de severidad del asma.

INTRODUCCIÓN

El asma es una compleja entidad caracterizada fisiológicamente por una obstrucción variable al flujo aéreo y patológicamente por múltiples anormalidades de la vía aérea, en su epitelio, lámina propia y submucosa. Esta es una enfermedad crónica muy frecuente en el ser humano, que representa un grave problema de salud pública. Se estima que la prevalencia del asma en el mundo varía ampliamente, desde menos del 5% de la población en Grecia e Indonesia, hasta más del 25% en Australia y Nueva Zelanda. Los datos comunicados de prevalencia de asma, según estudios hechos en diferentes ciudades de México, arrojan información que va desde 2.7 hasta 21.8%, variando notablemente de una región a otra.

La inflamación y remodelación de la vía aérea son dos características del asma que se han estudiado profundamente en los últimos 20 años; el reconocimiento de que la inflamación es el hecho clave en el asma, producida por una compleja interacción entre células inflamatorias y células residentes de la vía aérea, ha llevado a formular hipótesis sobre cuál o cuáles de estas células puedan dirigir este proceso. Así mastocitos, eosinófilos, células epiteliales y linfocitos CD4 han sido propuestos como las células que conducen el proceso inflamatorio.

El equilibrio Th-1/Th-2 proporciona un sistema que permite entender la secuencia de eventos inmunes que promueven la inflamación e hiperreactividad bronquial. El desequilibrio de este sistema favoreciendo el fenotipo Th2, desencadena el mecanismo de la hipersensibilidad tipo I. Está demostrado que la respuesta Th-1 por si sola puede revertir la respuesta de inflamación aérea y AHR (hiperreactividad aérea). El asma es en su mejor definición un síndrome, con una vía común de daño y remodelación, cuya etiopatogenia incluye múltiples mecanismos.

El TGF- β es una citocina que juega un papel importante en el curso de la patogénesis del asma, participando en la remodelación de las vías aéreas por medio de la activación

de fibroblastos, además su elevada expresión se encuentra asociada con el grado de severidad del asma, lo que la hace aún más importante para este estudio. Por otro lado YY1 es un factor de transcripción, presente en todas las células y estudios en modelos *in vitro* han demostrado que YY1 puede regular la transcripción de TGF- β , uniéndose al promotor de este gen. Por lo tanto los estudios *in vivo* mostraran una vinculación muy trascendente entre la expresión de estas dos moléculas y el grado de severidad del asma.

MARCO TEÓRICO

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL ASMA

En México es una de las 10 primeras causas de utilización de los servicios de salud, especialmente los de urgencias y de consulta externa. En los dos estudios de prevalencia publicados en los que se siguió la metodología del cuestionario ISSAC, (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) se encontró que la prevalencia es entre 5 y 7 % de los niños de las Ciudades de Cuernavaca y de Monterrey. En la Ciudad de México se encontraron cifras similares ⁽¹⁾.

Aún sin conocer con certeza la magnitud del problema, podemos decir que el asma representa una importante pérdida para los millones de pacientes que la sufren y para el sistema de salud, tanto desde el punto de vista económico como en calidad de vida. El asma se presenta en cualquier sexo, edad, o nivel socioeconómico, pero afecta mayormente a los niños con antecedentes de atópia. Tiene grandes variaciones regionales siendo mayor el uso de los servicios médicos en estados como Yucatán, Tabasco, Veracruz y Guerrero que en los que se encuentran en el altiplano ⁽²⁾.

2. ETIOLOGÍA DEL ASMA

La etiología del asma es compleja y multifactorial. Están involucradas interacciones entre los factores genéticos y los estímulos ambientales. Uno de los principales aspectos es la atópia, la cual se define como la predisposición genética del individuo ^(3;4) a inducir una respuesta de hipersensibilidad mediada por IgE a factores ambientales como los alérgenos que son antígenos no parasitarios inocuos para la mayoría de la población ⁽⁵⁾. Los componentes principales de este proceso de hipersensibilidad son:

2.1. Linfocitos T

A diferencia de los linfocitos B, que prefieren reconocer antígenos libres, los linfocitos T se han especializado en el reconocimiento de fragmentos de antígenos presentado por

moléculas de histocompatibilidad en la superficie de las células presentadoras de antígeno o de células diana. Para este fin los linfocitos T maduros disponen de un conjunto de proteínas de membrana que colectivamente se denomina TCR (T- cell receptor: receptor de la célula T). Además del complejo TCR, los linfocitos T disponen en su membrana de otras proteínas, denominadas colectivamente moléculas accesorias, que participan durante el reconocimiento y la activación del linfocito ⁽⁶⁾.

Por tanto, los linfocitos T, mediante las moléculas accesorias, se anclan de manera específica a las células de su entorno para inspeccionar, mediante el complejo TCR, los fragmentos de antígeno que presentan. Si se produce el reconocimiento específico de un fragmento de antígeno en particular, el complejo TCR desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula T que se denomina activación del linfocito T, si por el contrario, no se produce reconocimiento, el linfocito T se separa sin cambios para proceder a nuevos anclajes e inspecciones. Atendiendo a la función de los linfocitos T, se distinguen dos subtipos principales: los cooperadores (Th helper) y los citolíticos (Tc). Se denomina cooperadores a los linfocitos T que interactúan con los linfocitos B o con otros linfocitos T y les ayudan a dividirse, a diferenciarse y, en el caso de los linfocitos B, a sintetizar anticuerpos. También se denominan cooperadores a los que interactúan con los fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos) y les ayudan a destruir patógenos. Esta cooperación consiste, en la generación de señales por parte del linfocito T sobre la célula con la que coopera (linfocito B, fagocito). Para emitir las señales el linfocito T utiliza, bien moléculas de su membrana plasmática que interactúan con otras moléculas de la célula con la que coopera, o bien moléculas solubles que son sintetizadas por el linfocito T y que interactúan con receptores de la célula con la que coopera y con otras células más lejanas, moléculas que son denominadas citocinas. Los linfocitos T cooperadores expresan en su membrana la molécula CD4, mientras que la mayor parte de los citolíticos expresan CD8. Estos dos subtipos celulares difieren profundamente en su manera de reconocer fragmentos de antígenos: los linfocitos T CD4+ solo reconocen fragmentos de antígenos presentados por moléculas de histocompatibilidad de tipo II, y los linfocitos T CD8+ solo lo hacen en moléculas de tipo I ⁽⁶⁾.

2.1.1. Linfocitos Th 1 y Th2

En 1986, Mosmann y cols., describieron dos diferentes poblaciones de células T CD4+ en ratones, las cuales se diferencian por el tipo de citocinas que producen. Los linfocitos llamados:

- Th -1 producen principalmente interleucina 2 (IL-2), interferón γ (IFN γ), y factor de necrosis tumoral- α (TNF α).

- Th -2 producen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13.

Las citocinas producidas por cada una de estos subtipos funciona de manera autocrina y promueve el crecimiento de su propio fenotipo.

La retroalimentación de IL-4 producida por células Th-2 puede mantenerla activada. Además, existe una regulación positiva de células Th-2 por IL-4 y de células Th-1 por IFN- γ , estas citocinas pueden a su vez disminuir la actividad de células T de tipo apuesto. La IL-2 y el IFN- γ que son producidos por células Th-1 pueden amplificar la respuesta Th-1, lo cual a su vez inhibe una respuesta Th-2 ⁽⁷⁾.

Los linfocitos Th-1 y Th-2 son derivados de la misma célula T precursora. La diferenciación hacia células Th-1 o Th-2 depende de la interacción con el micro ambiente. Si las células presentadoras de antígeno, presentan un alérgeno a una célula T precursora *naive* en presencia de IL-12, dicha célula se diferenciará hacia Th-1. El desarrollo de las células Th-2 está regulado por IL-4 ⁽⁸⁾.

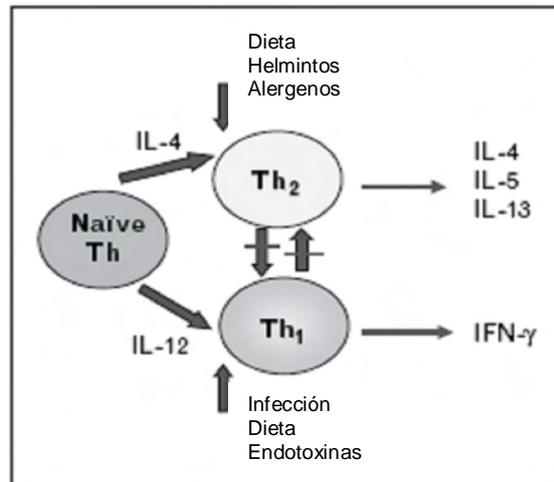


Figura 1. Diferenciación de T precursora a Th1 o Th2

El mecanismo por el que la IL-12 e IL-4 determinan la respuesta predominante aun no es claro. La endotoxina, componentes virales, y bacterias intracelulares (*Legionella* y *Mycoplasma*), estimulan la producción de IL-12 y pueden favorecer una respuesta de tipo Th-1. Sin embargo, si IL-4 está presente en el ambiente de citocinas, puede dominar sobre las demás citocinas ⁽⁹⁾. La concentración del antígeno también es muy importante. Con exposiciones bajas del antígeno, se produce una respuesta Th-2. Mientras que dosis altas de antígeno, incrementa la producción de IL-4, favoreciendo una respuesta de tipo Th-2 ⁽⁹⁾.

Aunque la mayor parte de los datos que se tienen hasta la actualidad han sido derivados de modelos murinos, es claro que la respuesta inmune de tipo Th-1 o Th-2 ocurre durante las enfermedades humanas. Esto es particularmente aparente en enfermedades atípicas y asma. Células obtenidas de muestras de lavados bronqueo alveolares de pacientes con asma atípica contienen una alta cantidad de células productoras de IL-4, IL-5 y GM-CSF, comparadas con células obtenidas de pacientes sanos ⁽¹⁰⁾. En biopsias bronquiales de pacientes con asma, los niveles del ARNm para IL-4 e IL-5 se encuentran elevados ⁽¹¹⁾. GATA-3, un factor de transcripción necesario para la producción de IL-5, se encuentra exclusivamente en células Th-2. La expresión del ARNm para GATA-3 es significativamente mayor en vías aéreas de sujetos

asmáticos comparado con sujetos sanos ⁽¹²⁾. Estos datos sugieren que el sistema inmune humano, como el del ratón, está también dividido en subtipos de células T que producen ciertas citocinas.

2.2. Citocinas

Algunas interacciones críticas entre células del sistema inmune son controladas por mediadores solubles llamados citocinas. Estas citocinas son un diverso grupo de péptidos de señalización intercelulares, así como también son glicoproteínas con pesos moleculares entre 6000 y 60 000 y muchos de ellos no son genética y estructuralmente relacionados. Colectivamente, las citocinas no solo regulan la respuesta inmune e inflamatoria, también participan en la hematopoyesis, angiogénesis y algunos otros procesos biológicos ⁽¹³⁾.

Las citocinas median la proliferación y diferenciación de linfocitos después del reconocimiento antigénico en la fase de activación de respuesta inmune adaptativa y median la activación de células efectoras especializadas en la fase efectora de inmunidad adaptativa. Diferentes tipos de microbios y antígenos expuestos pueden inducir linfocitos T CD4+, que diferencian dentro de distintas poblaciones efectoras, tales como linfocitos Th1 y Th2, que producen diferentes citocinas y poseen funciones diferentes ⁽¹⁴⁾.

2.2.1 Interleucina (IL-4)

IL-4 es el mayor estímulo para la producción de anticuerpos IgE y para el desarrollo de linfocitos Th2 a partir de células T CD4+ naive. IL-4 es la citocina marca de las citocinas Th2. La principal fuente celular de IL-4 son linfocitos Th2, así como también mastocitos y basófilos ⁽¹⁴⁾.

Las acciones biológicas de IL-4 incluyen estimulación de IgE, mastocitos y eosinófilos, y suprimen reacciones dependientes de macrófagos.

- Es la principal citocina que estimula el cambio de cadenas pesadas de Ig en linfocitos B al isotipo IgE. Esta Ig es también la mediadora principal de reacciones de hipersensibilidad inmediata.
- IL-4 estimula el desarrollo de linfocitos Th2 de manera autocrina, actúa como factor de crecimiento.
- IL-4 antagoniza los efectos de IFN- γ para la activación de macrófagos e inhibe las reacciones inmunes mediadas por estas células.

2.2.2 Interleucina 5

Es un activador de eosinófilos y sirve como la unión entre la activación de linfocitos T y la inflamación eosinofílica. La principal acción de IL-5 es la activación de eosinófilos y estímulo y diferenciación de eosinófilos. Los eosinófilos activados son capaces de matar helmintos. Eosinófilos expresan el receptor Fc específico para anticuerpos IgE y son capaces por medio de eso unir a microbios cubiertos de IgE, tales como helmintos. Así de esta manera, las dos principales citocinas Th2, IL-4 e IL-5 funcionan en conjunto ⁽¹⁴⁾.

2.2.3. Factor de crecimiento transformante (TGF- β)

La principal acción de TGF- β en el sistema inmune es inhibir la proliferación y activación de linfocitos y otros leucocitos. Esto actualmente es una familia de moléculas relacionadas codificadas por distintos genes, comúnmente designados TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Las células del sistema inmune sintetizan principalmente TGF- β 1. Es una proteína homodimérica que es sintetizada como un precursor y activada por clivaje proteolítico. Los receptores de TGF- β incluyen receptores polipeptídicos de alta afinidad (tipo I y tipo II) que señaliza a través de un dominio serina/treonina cinasa que fosforila factores de transcripción llamados SMADs ⁽¹⁴⁾.

Acciones biológicas

- Inhibe la proliferación y diferenciación de linfocitos T y la activación de macrófagos, también actúa sobre otras células, tales como neutrófilos y células endoteliales, que en gran parte contrarresta los efectos de citocinas proinflamatorias.
- Tiene diversas acciones fuera del sistema inmune. Este puede inhibir la proliferación de algunos tipos celulares y estimular otros. Frecuentemente TGF- β puede inhibir o estimular crecimiento del mismo tipo celular *in Vitro*, dependiendo de las condiciones de cultivo. TGF- β causa síntesis de proteínas extracelulares tales como colágeno, enzimas modificantes de matriz tales como metaloproteinasas, y de receptores celulares de proteínas de matriz t, tales como integrinas. Estas acciones pueden promover la reparación de tejido después de la reacción inflamatoria inmune local que está siendo controlada.

La mayoría de los datos acerca de la patogénesis de esta enfermedad refiriéndose a asma atípica, es el desequilibrio entre el fenotipo **Th-1** (inmunidad mediada por células) y el **Th-2** (inmunidad mediada por anticuerpos). La genética, el ambiente intrauterino, la dieta materna e infantil, infecciones respiratorias y exposición al medio ambiente, todo lo anterior contribuye a que se pierda este delicado equilibrio. La manera en la cual todos estos factores convergen para determinar la reacción del sistema inmune de un sujeto determinado da como resultado inflamación y remodelación de vías aéreas. Los principales factores que favorecen un fenotipo Th-2 finalmente conducen a la atopia⁽¹⁵⁾.

La inmunidad adquirida es particularmente importante en el asma alérgica. Estudios epidemiológicos han demostrado que la atopia está asociada con AHR⁽¹⁶⁾, así como también, la incidencia⁽¹⁷⁾, la persistencia y la severidad⁽¹⁸⁾ de esta enfermedad. En un extenso estudio poblacional, la atopia fue el factor de riesgo más importante para el desarrollo de AHR⁽¹⁹⁾.

3. PATOGENIA DEL ASMA

El desarrollo clínico del asma es un proceso complejo, tomando en cuenta la existencia de una predisposición genética del individuo a la sensibilidad al alérgeno y el desequilibrio entre la inmunidad celular (Th1) y la inmunidad humoral (Th2). Esta reacción humoral provocada por el alérgeno genera la hipersensibilidad mediada por IgE, es decir, una respuesta alérgica. Tal reacción es posible dividirla en etapas, la etapa de sensibilización y la etapa de respuesta a posteriores exposiciones al alérgeno de la que tendremos dos fases de respuesta ⁽²⁰⁾.

3.1 Etapas de la respuesta alérgica.

3.1.1 Etapa de sensibilización

Esta primera fase es inmediata, se presenta en segundos alcanzando la respuesta máxima en una hora, la cual es caracterizada por ser un proceso anafiláctico, es decir, se presenta la participación de IgE.

Para dar inicio a una respuesta de tipo alérgica es obligatorio que un individuo atópico tenga una primera exposición al alérgeno, esto es, una sensibilización. Esta sensibilización consiste en que el alérgeno al ser inhalado y no poder ser eliminado, tiene contacto en las vías aéreas con las células dendríticas MHCII específico al alérgeno, migran a los nódulos linfáticos periféricos para el procesamiento y presentación de antígeno a los linfocito T y B ⁽²¹⁾.

A continuación se da una respuesta donde participan citocinas y moléculas coestimuladoras. De acuerdo al microambiente que se tiene se da una respuesta de tipo Th2 produciendo citocinas como IL-4, IL-13 e IL-5. IL-4 y 13 son esenciales para el reclutamiento de linfocitos B y para el cambio de isotipo de inmunoglobulina en las células plasmáticas ⁽²²⁾. En ensayos *in vitro*, la IL-4 y la IL-13 pueden inducir la liberación de citocinas pro inflamatoria y la expresión de moléculas de adhesión ⁽⁹⁾. La inhalación de IL-4 causa AHR en respuesta a la metacolina e incrementa la cantidad de

eosinófilos en esputo de pacientes asmáticos ⁽²³⁾, por otro lado, los ratones transgénicos que sobreexpresan la IL-13 desarrollan una incrementada AHR y una eosinofilia en vías aéreas ⁽²⁴⁾.

Participan señales coestimuladoras, en donde también participan integrinas y moléculas de adhesión intracelular ⁽²⁵⁾. Los anticuerpos IgE sintetizados por las células plasmáticas son secretados y liberados al torrente sanguíneo, se unen a sus receptores Fc de alta afinidad (FcεRI) localizados en los mastocitos en tejido y en basófilos de sangre periférica, así como en los receptores de baja afinidad (FcεRII o CD23) ubicados en linfocitos, plaquetas, macrófagos y en eosinófilos, protagonistas esenciales en el infiltrado inflamatorio y reclutados por IL-5. Una vez que las IgE específicas para el antígeno se encuentran unidas a las células cebadas, futuras exposiciones con el antígeno puede inducir una rápida activación ⁽²⁰⁾.

Un individuo puede ser susceptible al efecto de alérgeno mediante cualquiera de los siguientes mecanismos:

1. Antígenos presentados por el **complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II**, específicamente alérgenos inhalados los cuales van a ser presentados eficientemente por monocitos y células dendríticas.
2. El tipo de receptor específico de linfocitos T puede permitir una respuesta más eficiente de células T.
3. Más, o mayor actividad de, IL-4 puede causar una exagerada producción de IgE.
4. Una eficacia mayor de los receptores de alta afinidad para IgE en células cebadas, basófilos u otras células efectoras pueden causar una respuesta exagerada debida a la interacción alérgeno –IgE. Lo cual induce la liberación de mediadores inflamatorios, lo cual a su vez aumenta los niveles de IgE.
5. La contracción de músculo liso en respuesta a la liberación de agonista por células efectoras puede aumentar debido a un defecto o una disminución de receptores β₂ adrenérgicos.
6. Debido a los cambios en receptores específicos el individuo puede responder más eficientemente a toxinas inhaladas ⁽²⁶⁾.

3.1.2 Etapa de respuesta tardía

Al término de la primera exposición del alérgeno no se ha producido ningún tipo de reacción, es hasta la segunda exposición y en las posteriores exposiciones en las que se establece una respuesta alérgica, Cuando las moléculas de IgE específicas para el alérgeno que se encuentran en la superficie de las células cebadas, interactúan con el alérgeno, ocurre el entrecruzamiento de la IgE. Este entrecruzamiento induce la activación de una cascada de señales que causa la liberación de gránulos preformados que contienen mediadores inflamatorios preformados como son la histamina, heparina, serotonina, triptasa, citocinas de tipo Th2 (histamina, triptasan, ecosanoides, radicales libres y citocinas de tipo Th-2). Esta exocitosis de mediadores preformados constituye estableciendo así la fase temprana en minutos ⁽²⁷⁾.

Esta segunda etapa se presenta alrededor de 4 a 6 horas después de la exposición al alérgeno y es caracterizada por la contracción del músculo liso, así como de un aumento de la permeabilidad vascular (vasodilatación) e hipersecreción de moco, por acción de la histamina ⁽²⁸⁾. La pérdida de la integridad de microvasculatura, y el paso de las proteínas del plasma a las paredes de las vías aéreas causa el estrechamiento del lumen ⁽²⁹⁾. La triptasa potencia el efecto de la histamina, causando contracción del músculo liso ⁽²⁹⁾.

La fase tardía esta dada por la fabricación de derivados del ácido araquidónico como leucotrienos y prostaglandinas que tienen como efecto la contracción sostenida del músculo liso, vasodilatación y agregación plaquetaria. Junto con la producción de estos derivados del ácido araquidónico, se presenta la secreción de citocinas y quimiocinas responsables de la obstrucción de las vías aéreas por reclutamiento de eosinófilos mediadores de la inflamación crónica alérgica, linfocitos Th2 CD4, macrófagos y neutrófilos ⁽³⁰⁾. Con esto se produce una reacción inflamatoria sostenida. Una vez que la reacción de fase tardía inicia, los eosinófilos son los principales mediadores de la inflamación crónica en los pacientes con asma ⁽³¹⁾.

Los eosinófilos contribuyen al mantenimiento de la respuesta alérgica y del daño al tejido. La diferenciación selectiva de los eosinófilos se da gracias a IL-5. Este hecho se ha demostrado en un estudio con ratones transgénicos que sobreexpresan IL-5, en ellos se mantiene una eosinofilia marcada, en tanto que la delección de IL-5 en ratones expuestos al antígeno muestran una disminución significativa de la eosinofilia pulmonar ^(30;31). Se sabe también que los eosinófilos son reclutados por quimiocinas producidas por los mastocitos y los linfocitos T como Eotaxina 1 y 2, además de la liberación de mediadores: “Major basic protein”, neurotoxina derivada de eosinófilos, peroxidasas, proteínas catiónicas, leucotrienos, RANTES. Estos mediadores dan lugar a daño directo en el pulmón por la citotoxicidad en las células epiteliales, hiperreactividad aérea, vasodilatación, contracción del músculo liso, secreción de moco, de-granulación de mastocitos y reclutamiento de más eosinófilos, manteniendo así la respuesta Th2. Con estas reacciones la inflamación alérgica es un ciclo de reclutamiento de células inflamatorias y de un daño tisular crónico provocando cambios estructurales en el tejido y disminuyendo la funcionalidad del pulmón ⁽³¹⁾.

3.2 Funciones de IgE en la respuesta alérgica: Hipersensibilidad inmediata, ajuste del alérgeno y regulación de IgE.

Asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica son por poco invariables acompañadas por altos niveles de IgE. Análisis genéticos han demostrado que la hiperreactividad bronquial (BHR) y los niveles de IgE están ligados. Así en la práctica clínica alergenos específicos de IgE es generalmente partidario a una conexión a la inducción de síntomas alérgicos en vías aéreas, y es usado como una guía para modificación ambiental e inmunoterapia ^(31;32).

La interacción de IgE con el antígeno es conocida por guiar una variedad de secuelas inmunológicas. El entrecruzamiento de IgE unidos a los mastocitos por FcεRI provoca la liberación de mediadores vasoactivos preformados, síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, y la transcripción de citocinas. En la mucosa bronquial estos mediadores de reacciones de hiperreactividad inmediata rápidamente inducen edema en la mucosa,

producción de moco y contracción del músculo liso y eventualmente secretan un infiltrado inflamatorio.

La IgE induce de-granulación in vivo es frecuentemente seguida a una fase de reacción tardía (LPR), una segunda fase de respuesta hiperreactiva ocurre algunas horas después la reacción aguda y dependiente sobre eosinofilos. En asmáticos, esto se manifiesta como una segunda etapa de disminución de flujo de aire 4-8 hrs después del contacto inicial con el alérgeno ^(31;33).

Los anticuerpos IgE (pero no otros isotipos) son capaces de transferencia pasiva de ambos hiperreactividad aguda y una fase reacción tardía al cambio del alérgeno. Esto es postulado de que los síntomas de la vía aérea crónica resultan de la persistencia de la respuesta inflamatoria de la fase tardía en situaciones de exposición al alérgeno. Evidencias en modelos humanos y animales sugieren que la activación de mastocitos mediada por IgE da un aumento a ambas respuestas, aguda y de fase tardía. Respuestas agudas son acompañadas por evidencia de activación de mastocitos y liberación de mediadores. Inhibición de la activación de los mastocitos o interferencia con la función de los mediadores, bloques de ambas fases de la respuesta. En adición a la activación de mastocitos vía FcεRI, la interacción de IgE con otros receptores, incluye CD23 (FcRII). La interacción CD23-IgE provee un importante mecanismo por el cual alérgeno-IgE específico pueden aumentar respuesta inmune celular y humoral en marcos de encuentros recurrentes con el alérgeno ⁽³³⁾.

3.3 Importancia funcional y procesamiento del TGF β

TGF-β son una familia de citocinas multifuncionales que tienen una vital importancia, Los TGF-β's están implicados en procesos de desarrollo y diferenciación, inhiben el crecimiento de células epiteliales y endoteliales así como las funciones inmune y hematopoyética, promueven el crecimiento del tejido conectivo, favorecen la quimiotaxis de fibroblastos, macrófagos, linfocitos y estimulan la reparación de tejidos. También se los ha relacionado con procesos patológicos, como son la producción excesiva de

matriz extracelular, que desencadena fibrosis tisular, y la síntesis de otros factores de crecimiento ⁽³⁴⁾.

El TGF- β presenta 3 isoformas de las cuales solo TGF- β 1 es producido por linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, donde tiene como función principal la quimiotaxis de células inflamatorias, así como en la activación y supresión de de las mismas, esto lo hace con la dependencia de la concentración local de esta citocina y del grado de diferenciación de las células blanco. El conocimiento de las funciones de esta citocina en modelos experimentales sugiere la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas que se basen en la regulación de esta familia de citocinas. El TGF- β es el miembro prototípico y mejor estudiado de una familia de factores de crecimiento celular, ubicuos, multifuncionales y esenciales para la sobrevivencia, que tienen un papel importante en el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la inflamación, la reparación de tejidos y la respuesta inmune ⁽³⁵⁾.

El TGF- β inhibe la división en muchos tipos celulares, incluyendo células de origen epitelial, endotelial y hematopoyético. El TGF- β actúa en el ciclo celular deteniendo a las células al final de la fase G1. Este efecto lo logra mediante la represión de c-myc, factor transcripcional mitogénico, así como con la inducción de inhibidores de las cdk (*cyclin dependent kinases*), cinasas que junto con las ciclinas son el motor del ciclo celular. El hecho de que ciertas deficiencias en la vía del TGF- β contribuyan al desarrollo de tumores malignos, le da el rango de supresor de tumores ⁽³⁶⁾.

El TGF- β también regula la respuesta inmune. El TGF- β suprime la proliferación y diferenciación de células B y T *in vitro*, antagonizando los efectos de citocinas que participan en inflamación como son IL-1 β , TNF- α o IFN- γ , y suprimiendo la expresión de receptores para IL-1 β e IL-2. En macrófagos, la producción de superóxido y óxido nítrico es bloqueada por TGF- β . Además, el TGF- β inhibe la adhesión de neutrófilos a células endoteliales, por lo tanto limita el reclutamiento de células inflamatorias en la lesión ⁽³⁷⁾.

El TGF- β controla la producción de los componentes de la matriz extracelular, la remodela, y altera la adhesión celular y, en consecuencia la interacción entre las células ⁽³⁸⁾. Este factor incrementa la síntesis y depósito de componentes extracelulares tales como fibronectina, proteoglicanos y algunas formas de colágena. Además, la síntesis de inhibidores de enzimas de degradación tales como el inhibidor del activador del plasminógeno y el inhibidor tisular de metaloproteasas se incrementan, mientras que la expresión de proteasas tales como la colagenasa y el activador del plasminógeno se disminuye por acción del TGF- β . Este aumento en la síntesis de inhibidores y disminución en la síntesis de proteasas conduce a la acumulación neta de proteínas de matriz, la cual es indispensable para el proceso de reparación tisular ⁽³⁹⁾.

El TGF- β también es un factor quimiotáctico y activador de macrófagos y fibroblastos. Estas actividades son benéficas y de duración limitada dentro del contexto de la reparación de heridas. Sin embargo, en algunas ocasiones existe un incremento incontrolado en la producción y/o activación del TGF- β , lo que lleva a la producción excesiva de tejido conectivo. Este fenómeno se presenta en una variedad de enfermedades como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar idiopática, escleroderma, glomerulonefritis, ciertas formas de artritis reumatoide, esquistosomiasis y vitreoretinopatía proliferativa. Estas enfermedades se caracterizan por inflamación crónica y acumulación patológica de matriz, que algunas veces está acompañada por cicatrización ⁽³⁹⁾.

3.4. Participación del TGF- β en el reclutamiento y activación de células inflamatorias

Todo el proceso de inflamación y reparación tisular se caracteriza por el reclutamiento ordenado y progresivo de células inflamatorias, comenzando por las plaquetas, y continuando por la migración de neutrófilos seguido por macrófagos y linfocitos, terminando con la migración de fibroblastos a la región dañada. Los primeros sucesos dentro del proceso de la inflamación ocurren con la agregación y de-granulación plaquetaria, en la que hay una liberación de los primeros mediadores inflamatorios dentro de los cuales está el TGF- β que se encontraba en los gránulos alfa de las

plaquetas. Al estar en el inicio de la inflamación y solo encontrarse plaquetas en el sitio TGF- β es liberado en concentraciones mínimas (fentogramos), concentración suficiente para promover la quimiotaxis de monocitos y linfocitos sanguíneos ⁽⁴⁰⁾. Al estar presentes una mayor cantidad de células en el lugar de la inflamación la concentración de TGF- β aumenta a picomoles, activando a los monocitos y de esta manera incrementando la expresión de genética de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento liberado de plaquetas, entre otras. Cada una de estas citocinas tiene a su vez importantes funciones promotoras de la inflamación y activación de la respuesta inmunológica, por lo tanto se considera que durante el proceso inflamatorio, la participación proinflamatoria del TGF- β es indirecta, ya que es mediada a través de la atracción y activación de monocitos para que éstos, a su vez generen otras citocinas que magnifican la respuesta inflamatoria ⁽⁴¹⁾.

También es durante estas etapas de la inflamación cuando el TGF- β participa en el inicio de la regeneración y cicatrización del tejido lesionado, al atraer quimiotácticamente y activar a fibroblastos y células endoteliales. Otro aspecto de importancia en este proceso es el control autocrino que tiene el TGF- β que consiste en inducir su propia producción actuando sobre todo en monocitos ⁽⁴²⁾.

Hasta este momento TGF- β ha tenido un efecto proinflamatorio y si esto continua así se seguiría reclutando mas células inflamatorias, y este proceso se convertiría en un mecanismo de lesión tisular. Sin embargo, la misma respuesta inflamatoria está dotada de mecanismos que suprimen las respuestas proinflamatorias y así evitan la inflamación excesiva que es capaz de producir daño tisular. Cuando la inflamación es extensa existen muchas células que producen TGF- β induciendo altas concentraciones de esta citosina llevándolo a nanomoles, lo que la hace actuar como una citocina antiinflamatoria tal vez porque en este momento existen células macrófagos diferenciadas que se desactivan ante la exposición a altas concentraciones de TGF- β ⁽⁴¹⁾.

3.5 Factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY1)

YY1 es una proteína ubicua que tiene un peso de 68-kDa, contiene dedos de zinc, este factor de transcripción es codificado por el gen de YY1 localizado en el cromosoma 14 en el segmento q32.2. Estructuralmente esta conformado por cuatro dedos de zinc de tipo C2H2, con dos dominios específicos que caracterizan su función como un activador o represor. El dominio de represión está dado por el dominio C-terminal. La región N-terminal actúa como un potente dominio activador. Esta región está llena por un dominio rico en glicina y 11 residuos consecutivos de histidina. Así, la posición C-terminal actúa como un represor en la transcripción y la posición N-terminal actúa como un potente dominio de activación. Lo que distingue esta proteína de otros factores de transcripción es su habilidad no solo de iniciar la transcripción sino que también la regula a través de activación o represión ⁽⁴³⁾.

YY1 posee la propiedad inusual de regular la transcripción en diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción ⁽³⁹⁾. Entre los genes que activa se incluyen IFN- α , β -caseína, *c-fos* y *c-myc*; así como también los promotores de diversos virus en los cuales se incluyen el citomegalovirus (CMV), virus de la leucemia murina, virus del papiloma humano (VPH) y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ⁽⁴³⁾.

Se ha encontrado que YY1 regula positivamente la expresión de ligandos de quimiocinas como CCL13, en linfocitos de pacientes con asma ⁽¹⁸⁾, y que regula negativamente la expresión de los receptores para quimiocinas, CCR5 y CXCR4 en linfocitos de pacientes con SIDA, la sobreexpresión de YY1 reduce la expresión de CCR5 y CXCR4 en su superficie celular, reduciendo así la infección por HIV-1 ^(16;17).

3.6 Regulación de la transcripción mediada por YY1

Se ha sugerido que YY1 reprime la transcripción usando múltiples mecanismos. Frecuentemente estos mecanismos involucran la competición de YY1 con factores de

activación en los sitios de unión que se traslapan, por lo tanto, decrece la actividad del promotor y resulta una represión de la transcripción. Otras hipótesis incluyen la regulación negativa de YY1 sobre los activadores unidos al promotor cercanos a él. En general, los modelos que explican a YY1 como un represor o activador de la transcripción son ⁽⁴³⁾:

- El modelo del desplazamiento.
- Interferencia con la función de los activadores transcripcionales.
- Interacción con correpresores.
- Activación directa.
- Inhibición del cofactor inducido de la represión de YY1.
- Reclutamiento de coactivadores.

- El modelo del desplazamiento. Existen evidencias que sugieren la presencia de varios promotores con secuencias de sitios para YY1 que se traslapan y compiten con factores activadores. Inducción de desplazamiento del activador reprimida de la represión transcripcional mediada por YY1. YY1 puede efectuar represión transcripcional en los sitios de unión del promotor llevando una competencia con los activadores con un sucesivo desplazamiento del activador.

-Interferencia con la función de los activadores transcripcionales.

a) Directa. YY1 reprime directamente la activación transcripcional, a pesar de la presencia de un activador transcripcional al sitio promotor de un gen, YY1 se adhiere a distancia, resultando en la represión del promotor.

b) YY1 emplea inhibición de la activación de transcripción, vía unión física directa. YY1 interfiere con la acción del activador transcripcional, provocando represión de la transcripción

c) YY1 utiliza la inhibición de la transcripción por interacción. El modelo DNA-binding sugiere la habilidad de YY1 para interferir con la comunicación del activador y en

consecuencia la retardada activación del activador, mediado, representando un ejemplo de una interferencia indirecta del sitio de unión de una interacción física con DNA y el sitio promotor del gene.

Interacción con correpresores. El factor de transcripción YY1 tiene la habilidad para unirse a correpresores que actúan directamente para facilitar la represión transcripcional. El dedo de zinc y las regiones ricas en glicina de YY1 son conocidas por ser instrumentos en la actividad represora de YY1, adicionalmente YY1 frecuentemente requiere la ayuda de cofactores que interactúan con sus dominios de represión para facilitar dicho efecto. Este modelo explica que YY1 modula la represión del activador transcripcional por complejos que forma con correpresores, YY1 podría reclutar los correpresores que directamente actúan para facilitar la represión transcripcional o inducir el remodelamiento o rearreglo cromático para enfatizar el asistente mediado por YY1 DNA interacción y represión.

YY1 es también capaz de reprimir los cofactores pivóticos para la actividad celular y regulación viral, incluyendo interferón β y γ . Dos mecanismos que podrían actuar para la regulación de la transcripción mediada por YY1 de los productos del gen como los IFN incluye 1) una similar competencia desplazamiento con YY1 y un sitio común de unión AP-1 y 2) la represión mediada solamente en la presencia de un sitio cercano a una proteína como AP-2.

Activación directa

Estudios han mostrado interacciones con cofactores que actúan en el N-terminal, sugiriendo una posibilidad de una regulación de actividad represiva excediendo activación. YY1 podría activar directamente la transcripción del gene por unión a los promotores del gene y/o factores transcripciones que estimula la activación transcripcional mediada por YY1.

3.6.1. Coactivadores de YY1

YY1 puede actuar independientemente. Algunos de los efectos de YY1 sobre el gene de transcripción son ejecutados vía cofactores. La proteína AAV de E1A es un ejemplo de un coactivador de YY1. Posible mecanismo involucrado en activación colaboradora puede incluir interacción proteína-proteína con E1Ap300 complejo requerido por E1A para el relieve de represión mediado por YY1. Se ha demostrado que E1A puede servir como un iniciador de la activación de transcripción mediada por YY1 vía ataque a el promotor P5⁽⁴³⁾.

3.7 Relación entre TGF- β y YY1

TGF- β se encuentra aumentado en pulmones de individuos asmáticos y puede modular la inflamación y remodelación en vías aéreas. Algunos estudios genéticos han encontrando que el polimorfismo del nucleótido C-509T en el gen promotor de TGF- β puede ser asociado con la alterada expresión del gen y el fenotipo de asma⁽⁴⁴⁾.

La expresión de TGF- β está influida por polimorfismos en el gen de TGF- β , y algunos de esos polimorfismos podrían estar asociados con asma y otros padecimientos^(29;45).

En particular, se ha descrito un polimorfismo en el promotor de TGF- β , se trata de un cambio citosina (C) a timina (T) del par de base 509 [C-509T] (posición relativa para empezar el sitio de transcripción definido en *GenBank* NM-000660 t NT-011109) que altera el sitio de unión del factor de transcripción YY1 y está asociado con altas concentraciones circulantes de TGF- β en plasma⁽⁴⁵⁾. Esto ha hecho pensar que el alelo T en este sitio de unión de YY1 sobre el promotor de TGF- β influye en la expresión de esta citocina y a su vez con la fisiopatología del asma⁽⁴⁶⁾, sin embargo, éstos todavía no han sido demostrados durante la fase completa de la enfermedad.

El incremento de TGF- β es localizado principalmente en el tejido conectivo extracelular del espacio subepitelial de las vías aéreas en asociación con los proteoglicanos unidos en el medio. Las células epiteliales de las vías aéreas, eosinófilos, linfocitos T, fibroblastos y macrófagos expresan TGF- β ; sin embargo, la fuente celular precisa del incremento de TGF- β en las vías aéreas de individuos con asma no es conocida aún ⁽⁴⁷⁾.

TGF- β es secretada como un complejo constitutivo y puede ser procesado vía proteasas, ácidos o especies reactivas de oxígeno para ser activadas ⁽⁴⁶⁾. En el control de la actividad de TGF- β , están involucrados múltiples mecanismos, un ejemplo importante son los mecanismos transcripcionales que son regulados por citocinas inflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno encontrado en las vías aéreas de individuos con asma. Si el polimorfismo presente en el promotor de TGF- β , C-509T, tiene impacto en la transcripción de TGF- β , éste podría tener importantes efectos sobre la actividad de TGF- β en las vías aéreas. YY1 es un factor de transcripción expresado ubicuamente con dedos de zinc que podría funcionar como un activador o represor de los genes de transcripción, porque la afinidad de YY1 y actividad promotora del alelo T están incrementados cerca del 30%, en comparación con el alelo C, lo que lleva a especular que las alteraciones en la afinidad de YY1 son responsables para la asociación de C-509T con el asma. Estudios sugieren que el polimorfismo en el nucleótido C-509T del gene TGF- β es un importante locus para susceptibilidad al asma. Se especula que el alelo T de C-509T contribuye al desarrollo del asma por incremento de los niveles basales del gene TGF- β en las vías aéreas de individuos susceptibles debido al incremento de la afinidad a YY1 al promotor ⁽⁴⁴⁾.

Con lo anterior, es razonable pensar que cuando se encuentre una mayor expresión de YY1, la expresión de TGF- β se verá incrementada, por lo que esta relación entre este factor de transcripción y esta citocina será directa, y a su vez la alta expresión de TGF- β se asociará con un efecto negativo en vías aéreas de sujetos asmáticos contribuyendo al grado de severidad del asma. No se ha publicado un estudio donde se asocien estas proteínas que demuestren una relación directa, por lo que este trabajo aplicando la

tecnología de microarreglos de tejidos y la tinción inmunohistoquímica, resulta novedoso el análisis de esta asociación.

4. TECNOLOGÍA DE MICROARREGLOS DE TEJIDOS

Una de las herramientas de análisis global recientemente utilizada para la validación de la expresión, tanto de ácidos nucleicos como de proteínas, de manera *in situ*, son los arreglos de tejido. Estos, permiten validar posibles marcadores tumorales en forma masiva, debido a que se puede analizar un gran número de muestras clínicas bajo las mismas condiciones experimentales de manera paralela ⁽⁴⁸⁾.

La tecnología de microarreglos de tejidos empleada en este estudio es una nueva tecnología actualmente usada ampliamente en estudios básicos y clínicos. La tecnología de microarreglos de tejidos es un aumento sobre la tecnología de sección histopatología tradicional, que es basada en muestras simples y tienen baja eficiencia. Las ventajas del microarreglo incluyen alta eficiencia, bajo costo, ahorro de tiempo, confiabilidad y comodidad para control experimental. Desde la principal característica del microarreglo de tejido es combinar el estudio de un gene y sus productos de expresión con histomorfología, esto posee un gran potencial es estudios onco-patológicos. La preparación del punto, la tinción y la exanimación tienen limitada la aplicación de esta tecnología a enfermedades no tumorales ⁽⁴⁹⁾.

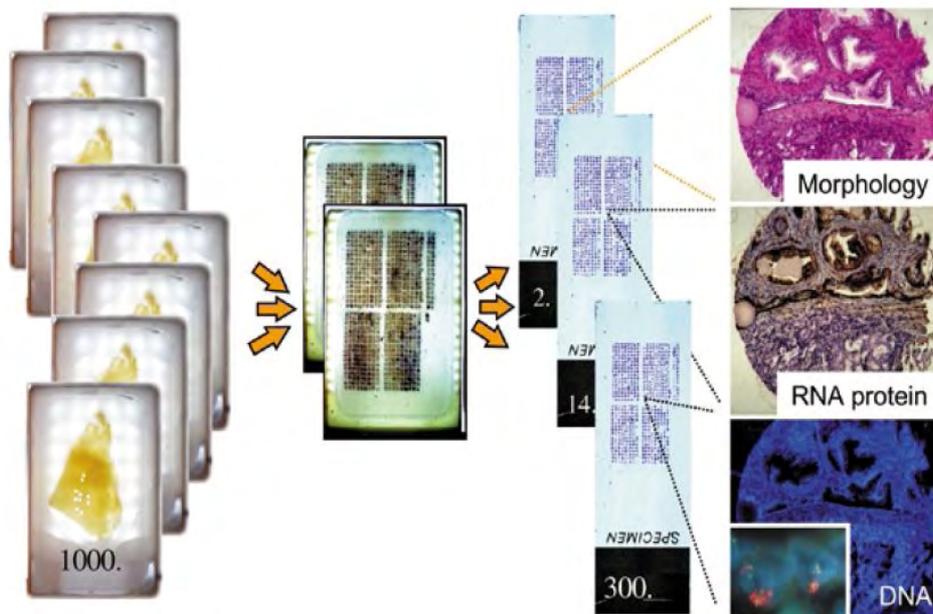


Figura 2. Principio del microarreglo de tejidos

Puntos cilíndricos, son obtenidos de bloques individuales de tejidos, fijados en formalina, embebidos en parafina. Estos son transferidos a un bloque de microarreglo de tejidos, cada bloque de microarreglo de tejido generado puede ser seccionado y las laminillas resultantes tienen el mismo tejido en las mismas posiciones. Las laminillas pueden ser utilizadas para análisis moleculares, tales como tinción de hematoxilina-eosina, inmunohistoquímica, mRNA, o análisis de alteración genética usando FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma es una patología frecuente entre niños de edad escolar además de presentar etiología multifactorial, donde uno de los factores importantes es la atopia. Esta enfermedad continua siendo un problema de salud pública en México y en el mundo.

Se sabe que la expresión elevada de TGF- β se correlaciona con el grado de severidad del asma. Por otro lado, se conoce en estudios *in vitro*, que YY1 puede regular a TGF- β , ya que el promotor de este gen presenta sitios de unión para el factor de transcripción, además de que el polimorfismo C509-T en este promotor puede aumentar la afinidad de unión de YY1 por el mismo, activando la transcripción de este gen.

Sin embargo, no existen estudios *in vivo* en donde se correlacionen la expresión de YY1 y TGF- β , en diferentes grados de severidad de asma.

El esclarecimiento de la patogénesis del asma puede contribuir al conocimiento de nuevas rutas en el establecimiento de nuevos tratamientos terapéuticos, con el fin de disminuir la severidad y la prevalencia de este padecimiento.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la asociación que existe entre TGF- β y la expresión de YY1 en tejido pulmonar de ratones asmáticos con diferente grado de severidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para aplicarla en el microarreglo de tejidos
2. Evaluar la expresión de TGF- β en tejido pulmonar de modelos murinos de asma con diferentes grados de severidad.
3. Evaluar la correlación de la expresión de TGF- β con la expresión de YY1

HIPÓTESIS

La presencia del polimorfismo en el promotor de TGF- β modifica la unión de YY1, esto aumenta la transcripción de este gen. Por lo que, la correlación que existe entre la expresión del factor de transcripción YY1 y la expresión de la citocina TGF- β en tejido pulmonar de ratones asmáticos es directa y esto a su vez se relaciona con el grado de severidad.

METODOLOGÍA

Durante el experimento los ratones se mantuvieron en condiciones de bioterio, esto es, con acceso a agua y alimento a una temperatura de 21-24°C. Los ratones fueron clasificados por modelos de la siguiente manera:

1. Modelos murinos de asma

Modelo 1 (Asma leve). El día 0 y el día 5 los ratones recibieron 100 μ L de una suspensión que contenía 10 μ g de ovoalbúmina (OVA) en 1 mg de alum (SUPERFOS), por vía intraperitoneal. El día 12 recibieron OVA al 0.75% directamente en la traquea. El día 16 se evaluó la respuesta alérgica inducida.

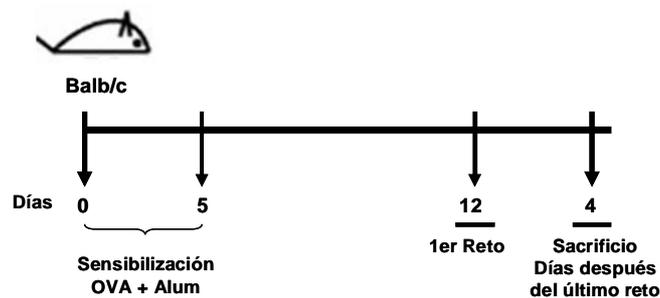


Figura 1. Modelo murino de asma leve

Modelo 2 (Asma Moderada). El día 0 y el días 5 los ratones recibieron 100 μ L de una suspensión que contenía 10 μ g de OVA en 1 mg de alud, por vía intraperitoneal. El día 12 y 23 recibieron OVA al 0.75% directamente en la traquea. Los días 4, 8, 16, 30 y 60 después del último reto se evaluó la respuesta alérgica inducida.

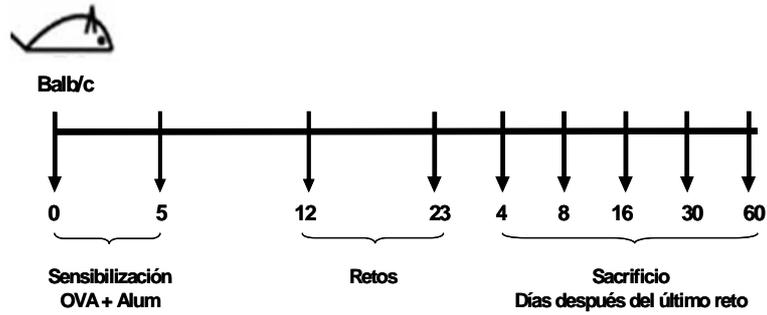


Figura 2. Modelo murino de asma moderada

Modelo 3 (Asma Severa). El días 0 y el días 5 los ratones recibieron 100 μ L de una suspensión que contenía 10 μ g de OVA en 1 mg de alum, por vía intraperitoneal. El día 12, 23 y 33 recibieron OVA al 0.75% directamente en la traquea. Los días 16, 30 y 60 después del último reto se evaluaron la respuesta alérgica inducida.

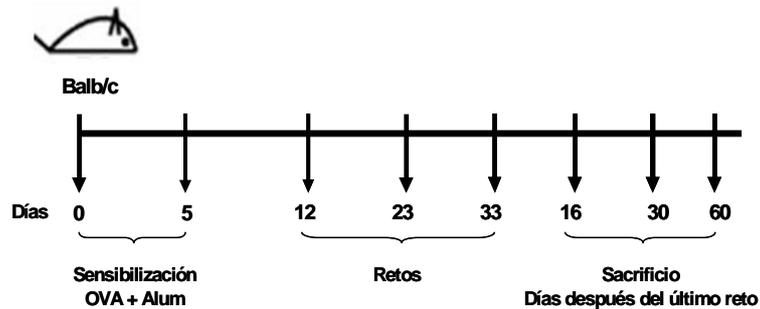


Figura 3. Modelo murino de asma severa

Controles. Cada grupo control recibió solo SS en lugar de OVA, de la misma manera que se describe en cada uno de los diferentes modelos. Este trabajo experimental fue llevado a cabo bajo los siguientes esquemas de trabajo.

Cuadro 1. Esquema de trabajo de los grupos problemas

Grupo	Sensibilización	Retos	Esquema	Marcaje	Días de sacrificio
Problema	OVA + Alum	1	Leve	D	16
		2	Moderado	F	28
		2	Moderado	H	32
		2	Moderado	J	34
		3	Severo	L	44
		2	Moderado	N	64
		3	Severo	O	42
		2	Moderado	Q	52
		3	Severo	S	72

Cuadro 2. Esquema de trabajo de los grupos controles

Grupo	Sensibilización	Retos	Esquema	Marcaje	Días de sacrificio
Control	Solución salina	1	Leve	C	16
		2	Moderado	E	28
		2	Moderado	G	32
		2	Moderado	I	34
		3	Severo	K	44
		2	Moderado	M	64
		3	Severo	Ñ	42
		2	Moderado	P	52
		3	Severo	R	72

En los días de sacrificio, los ratones fueron anestesiados en una cámara de éter, con el fin de ex-sanguinarlos por medio de un corte en el plexo axilar. La sangre que se colectó se dejó que formara el coagulo y posteriormente, al retirarlo, se centrifugó para obtener los sueros que fueron almacenados a -80 °C. Comenzando con un corte por el

estómago, se procedió a abrir al animal hasta la parte superior cuidando de no cortar la traquea y los pulmones. Ya que estaban descubiertos los pulmones y la traquea se cortó uno de los pulmones, el cual fue almacenado para posteriores pruebas de biología molecular, el otro pulmón se profundió, se introdujo una aguja con el bisel hacia arriba por la traquea administrando etanol hasta que el pulmón se observara inflado, para conservar su estructura original, este pulmón fue retirado y colocado en tubos Falcon de 50 mL, que contenían 10 mL de etanol absoluto para su posterior inclusión en parafina.

2. Deshidratación e inclusión del tejido

Los pulmones obtenidos fueron cortados de vértice a vértice, posteriormente este tejido se colocó dentro de “cassettes” de inclusión para su posterior deshidratación. Para deshidratar el tejido estos “cassettes” se introdujeron en etanol al 70% por 30 minutos, posteriormente este alcohol se reemplazo por etanol al 96% por 30 minutos, luego se pasaron por alcohol absoluto durante 15 minutos seguido de acetona por otros 15 minutos, luego permanecieron en xilol por media hora y por último se pasaron a una mezcla de xilol-parafina durante 30 minutos, todo estos tiempos los tejidos junto con los reactivos estuvieron dentro de la estufa.

La inclusión se realizo con la parafina y los moldes previamente calentados, colocando la parte plana del tejido al fondo del molde de acero inoxidable y justo en el centro, sobre el molde se coloco la tapa del “casette” y se vertió parafina liquida sobre este, se espero hasta que solidificara la parafina enfriándola en hielo y se separo el bloque de parafina del molde de metal.

3. Corte de tejido y preparación de laminillas

Los cortes se realizaron en un micrótomo con un grosor de 4 μ , se hicieron dos cortes el mismo bloque para colocarlas en una misma laminilla. Estos cortes se colocaron en un baño de flotación, con agua destilada previamente calentada, se introdujo la laminilla ya

marcada en el baño de flotación, de tal manera que al sacarla los cortes quedaran sobre el centro del portaobjetos.

4. Tinción de H/E

En los portaobjetos que se montaron los cortes del tejido para la tinción de rutina H/E. Las laminillas fueron desparafinadas en un horno a 60° C e hidratadas mediante un tratamiento con alcohol a concentraciones decrecientes. Posteriormente el tejido fue contrateñido por 30 segundos con hematoxilina de Harris - eosina. Finalmente se deshidrató en alcohol a concentraciones crecientes y xileno, e inmediatamente se cubrieron con resina sintética. Las muestras se analizaron mediante microscopia de luz convencional.

5. Puenteado de laminillas

Los tejidos que fueron teñidos por la tinción de H/E, fueron puenteados en regiones del pulmón donde se mostraron características propias y representativas de los grupos analizados, con el objeto de tener una muestra representativa que fue colocada en el microarreglo de tejidos.

6. Microarreglo de tejidos

Para la construcción del arreglo de tejidos se procedió de la siguiente manera. De cada bloque de parafina con tejidos diferentes, se hicieron cortes de 3 μm para la tinción de hematoxilina y eosina con el fin de identificar la región de interés. Es decir, una región que contenga exactamente la lesión que se pretende analizar. Posteriormente, se procedió a la construcción del arreglo utilizando el *CHEMICON's Advanced Tissue Array* (ATA 100 Chemicon) en colaboración con la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, en donde a grandes rasgos una aguja calibre 0.5 mm marco los pozos de 3 mm de profundidad de un bloque de parafina de 2.5 X 2.5 cm "en blanco", delimitándose una matriz de 5 x 5

elementos y el cual se denominó como bloque receptor. Una vez elaborada la matriz, con una aguja de calibre 0.4mm se extrajeron los cilindros de tejido de cada una de las muestras impregnadas en parafina del bloque donador y como guía se utilizará el corte teñido con hematoxilina y eosina. Cada uno de estos cilindros de tejido, fueron implantados en el bloque receptor y una vez completada la matriz de 168 tejidos, se relleno con una pequeña cantidad de parafina líquida sobre el arreglo para igualar la altura de los cilindros. Posteriormente, el arreglo se calentó en un horno a 60 °C por 15 minutos para homogeneizar la parafina de los cilindros implantados con la del bloque receptor y eliminar los espacios entre los cilindros de las muestras y el bloque mismo, los cuales pudieran causar problemas al momento del corte. Finalmente el arreglo se enfrió durante 5 minutos en hielo y se obtuvieron cortes de 3 µm con un micrótopo rotatorio como lo muestra la siguiente figura:

MAPA

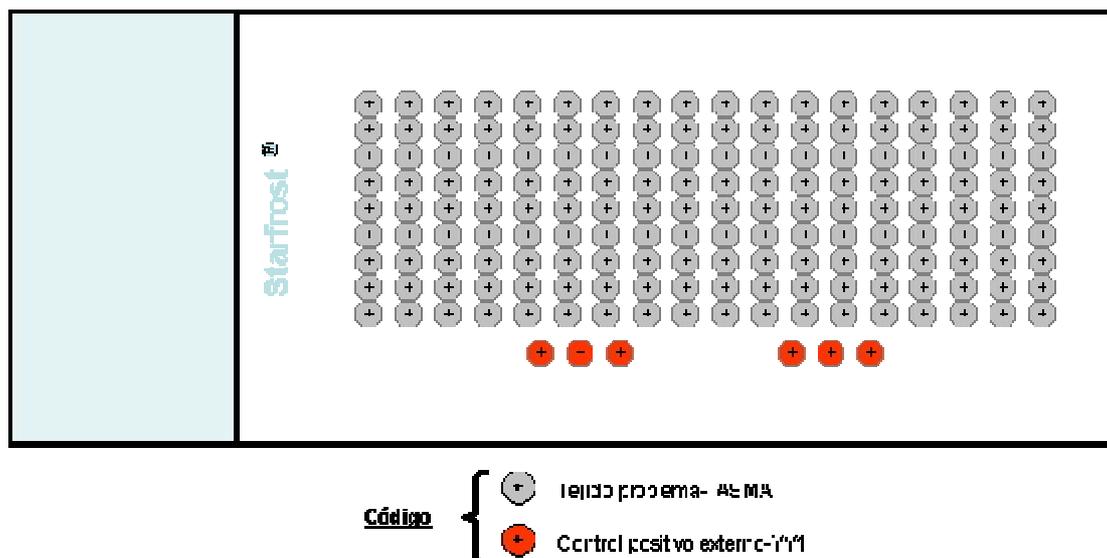


Figura 4. Mapa del microarreglo de tejidos

7. Inmunohistoquímica

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un sólo tiempo en todos los grupos. Los cortes se montaron en

laminillas cubiertas con silano. Se mantuvieron en una estufa bacteriológica a 62 °C por 1 hora, para desparafinar, con el siguiente procedimiento se procedió a hidratar la muestra: 3 baños en xileno, con duración de 8 minutos cada uno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 5 minutos.

Se realizó la recuperación de antígeno con citrato de sodio, por 20 min en ebullición y las laminillas se lavaron para eliminar el exceso de citrato. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos dos veces. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, con una solución de suero normal de cerdo y con suero humano al 2% por toda una noche. Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-YY1 y anti-TGF β (dilución 1:500) por 4 horas. Después se incubó con el segundo anticuerpo conjugado a Biotina link, con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR), por último el color se generó mediante la adición del substrato DAB (diamino benzidina) durante 8 minutos; la reacción se detuvo con agua de la llave y fue contrateñida con hematoxilina 5 seg.

Después el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

8. Análisis morfométrico

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) y la densidad de la expresión se cuantificaron en 4 campos para cada muestra, utilizando un analizador de imágenes con el programa Imagen-Pro® Plus de Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA.

9. Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos y la información fue procesada utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Los datos se presentan mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizó mediante ANOVA de una vía. Se realizó análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar la diferencia entre grupos. En la evaluación de los grupos de estudio y controles se utilizó t de Student. Un valor de $p < 0.05$ es considerado como significativo. Para el análisis de correlación se realizó un análisis de Pearson.

RESULTADOS

En la estimación de la respuesta alérgica inducida por OVA se observó mediante la tinción de H/E y PAS, que la cantidad de infiltrado inflamatorio aumenta de acuerdo al grado de severidad del asma, es decir, en el asma leve se visualiza un mínimo infiltrado inflamatorio, y éste aumenta en el modelo de asma moderada, para el modelo de asma severa tal infiltrado aumenta de manera considerable con respecto al segundo modelo. De esta manera la cantidad de moco en el grado mas severo de asma se encuentra en mayor proporción que en asma moderada y éste a su vez en mayor con referencia al asma leve. (Figura 7)

En la estandarización del microarreglo de tejidos, se encontró que la dilución ideal para la tinción de TGF- β fue 1:500 (0.0004 μ g/ μ L) y para YY1 1:1500 (0.00013 μ g/ μ L), utilizando una técnica de bloqueo diferente para cada anticuerpo, utilizando suero normal de cerdo al 2% para YY1 y una mezcla de suero normal de cerdo y suero humano al 2%, con el objetivo de bloquear la mayor cantidad de receptores Fc's evitando el pegado inespecífico del anticuerpo TGF- β .

Se realizó la tinción de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de TGF- β en tejido pulmonar de los ratones de estudio (tratados con OVA) y ratones controles (tratados con SS), uno de los microarreglos corresponde a los bronquios, mientras que el otro corresponde a los vasos (Figura 6). Sobre la tinción de TGF- β en estos microarreglos, se realizaron fotocomposiciones representativas para cada modelo experimental, en estas fotografías se incluyen: un control de isótopo, el cual es un anticuerpo de la misma naturaleza del anticuerpo primario, con el fin de que este control muestre que el primer anticuerpo no se este pegando de manera inespecífica.

Para analizar la expresión de TGF- β en vasos se incluyen imágenes representativas de los controles de solución salina y de casos de estudio tratados con OVA, para cada uno de los modelos experimentales. En éstas se observó que el anticuerpo primario no se pega inespecíficamente, también se presenta un aparente aumento de tal expresión

entre los grupos de estudio y los respectivos controles, además de que la expresión de TGF- β es posible observarla en células del tejido epitelial de los vasos sanguíneos, en macrófagos y linfocitos. En estas imágenes es posible ver como el infiltrado inflamatorio aumenta en cada uno de los modelos. (Figuras 8-10)

La tinción de TGF- β en los bronquios (Figuras 11-13), se muestra una mayor cantidad en los modelos mas graves, es decir, el grupo de asma severa ha mostrado un mayor expresión de TGF- β con respecto a lo grupos de menor grado de asma. La expresión de esta citocina se hace más evidente en el citoplasma y la región perinuclear de las células del epitelio bronquial, así como también en macrófagos y linfocitos.

Con las fotos obtenidas de los microarreglos de tejidos se realizó el análisis del área de expresión para la tinción en vaso y en bronquios. Primero se hizo un análisis general entre todos los ratones que recibieron SS y los grupos que fueron sensibilizados con OVA, esto es para el microarreglo de vasos (Figura 14), donde se muestra la desviación estándar como la barra vertical, interpretando que el aumento de la expresión en ratones sensibilizados con OVA es significativo con respecto a los que tienen sólo solución salina ($p < 0.0001$). En le evaluación de la expresión de TGF- β de manera general en el microarreglo de bronquios, se obtuvo la grafica de la figura 14, donde también se muestra la diferencia significativa entre estos grupos ($p = 0.0017$).

El análisis del área de expresión que muestra la expresión de TGF- β en los vasos del tejido pulmonar en los diferentes grupos de asma (Figura 15), los resultados reflejan que existe una diferencia entre cada uno de los grupos de estudio y sus respectivos controles, este diferencia también se hace evidente entre la expresión de TGF- β entre el asma severa y el asma moderada ($p < 0.05$).

Mientras que para el análisis realizado en los bronquios de los diferentes grupos de asma se puede visualizar que tal expresión aumenta entre cada grupo de asma y su respectivo control y además entre los grupos de asma severa y moderada es

significativa ($p < 0.001$), lo mismo diferencia se hace en los grupos de asma leve y moderada (Figura 16).

Previamente se evaluó la expresión de YY1, esto se informó en el trabajo de tesis de la QFB Díaz Elizondo G⁽⁵⁰⁾, donde se observó que la densidad de la expresión de YY1 aumentó conforme al grado de severidad del asma. En las figuras 17 y 18, se muestra este aumento en vasos y bronquios respectivamente. En este trabajo se llegó a la conclusión de que la expresión de YY1 aumenta con el grado de severidad del asma.

Con los datos obtenidos de la expresión de YY1 y TGF- β se procedió a realizar una prueba estadística de correlación (Pearson), la cual muestra una correlación positiva estadísticamente significativa (Figura 19), con una $r = 0.391$, intervalo de confianza del 95% de 0.029 - 0.662, $p = 0.035$. Lo cual quiere decir que la expresión de YY1 es directa a la expresión de TGF- β .

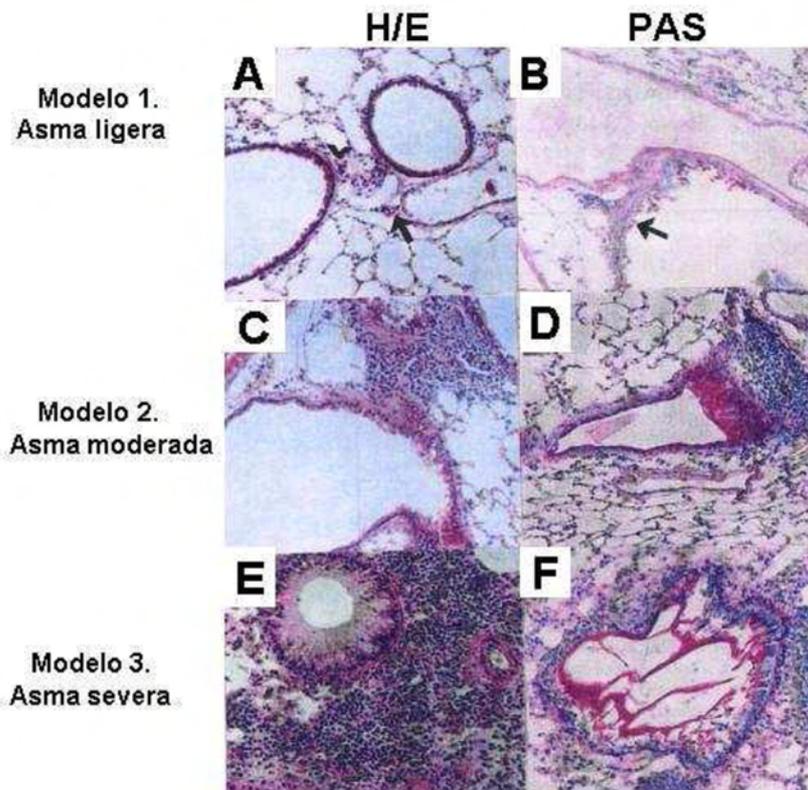


Figura 1. Estimación de la respuesta alérgica. A, C Y E fueron teñidas con HE (Hematoxilina y eosina), fotografías representativas para cada modelo de asma que muestran el infiltrado inflamatorio, resultado de la respuesta alérgica. B, D y F, fueron teñidas por PAS (periodic-acid-shift) fotografías representativas de cada modelo donde se muestra en color rosa el moco producido. 40X

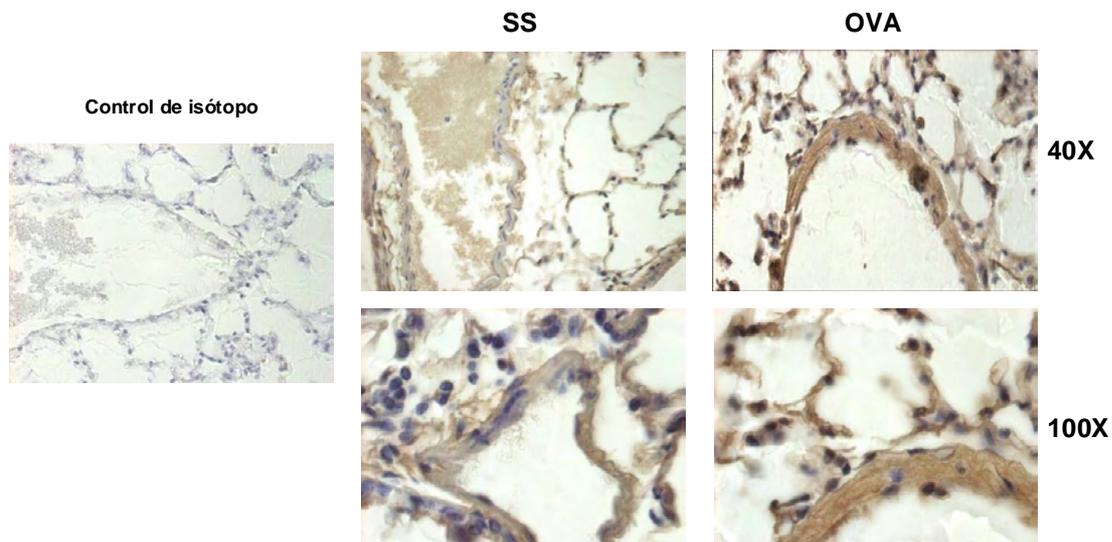


Figura 8. Fotografías representativas que muestran la tinción de inmunohistoquímica para TGF- β en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma leve. Se observan control de isótopo (40x), solución salina como control y grupo que solo recibió un reto de OVA.

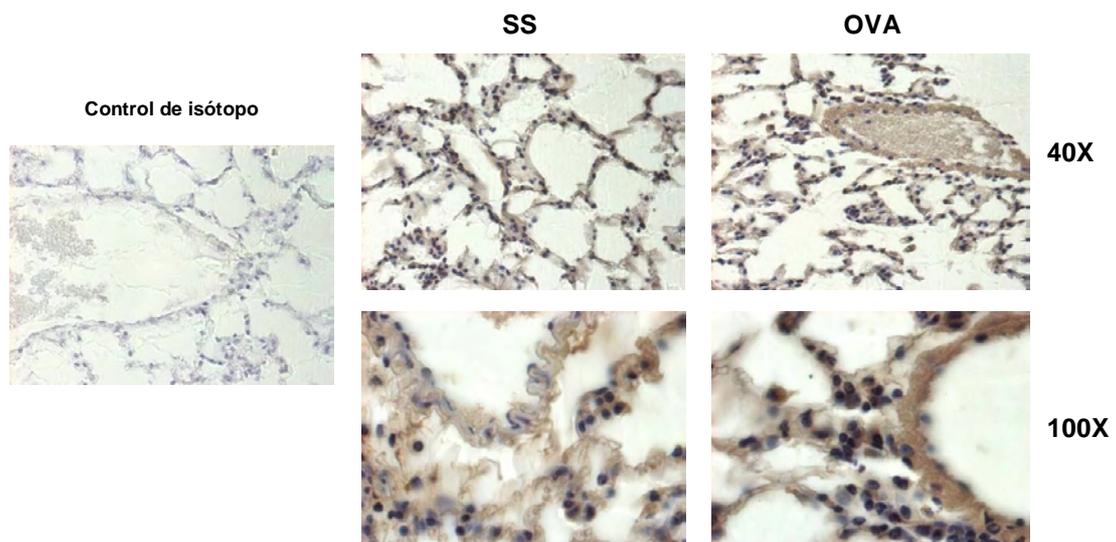


Figura 9. Fotografías representativas que muestran la tinción de inmunohistoquímica para TGF- β en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma moderada. Se observan control de isótopo (40x), solución salina como control y grupo que recibió dos retos de OVA.

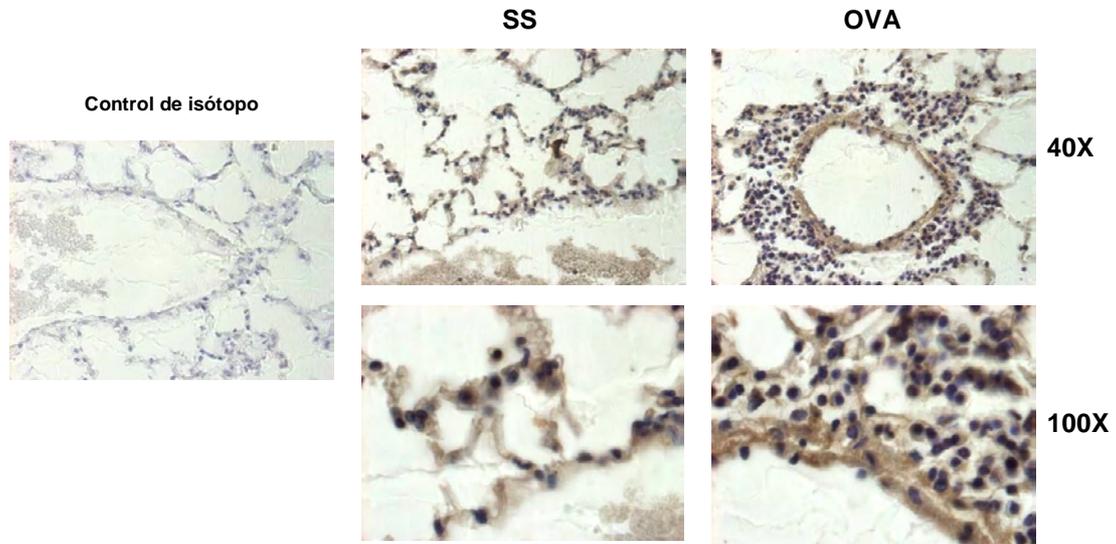


Figura 10. Fotografías representativas que muestran la tinción de inmunohistoquímica para TGF-β en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma severa. Se observan control de isótopo (40x), solución salina como control y grupo que recibió tres retos de OVA.

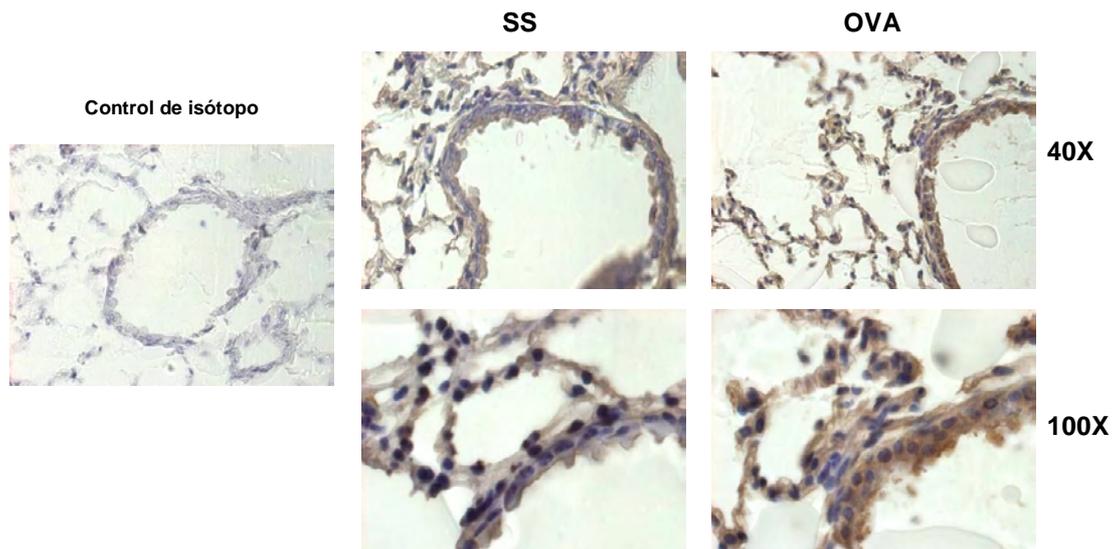


Figura 11. Fotografías representativas que muestran la tinción de inmunohistoquímica para TGF-β en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma leve. Se observan control de isótopo (40x), solución salina como control y grupo que solo recibió un reto de OVA.

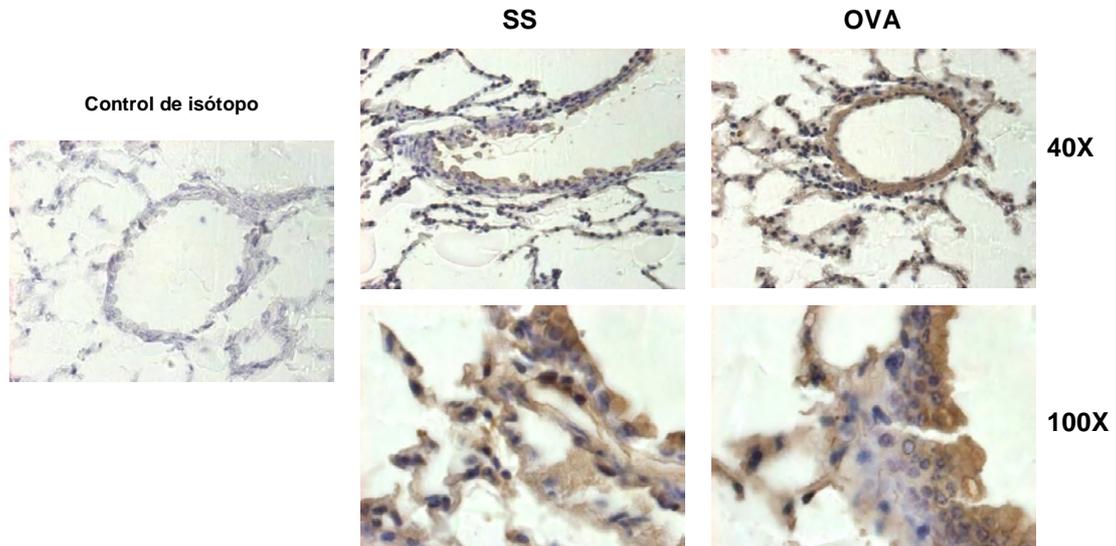


Figura 12. Fotografías representativas que muestran la tinción de inmunohistoquímica para TGF-β en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma moderada. Se observan control de isótopo (40x), solución salina como control y grupo que recibió dos retos de OVA.

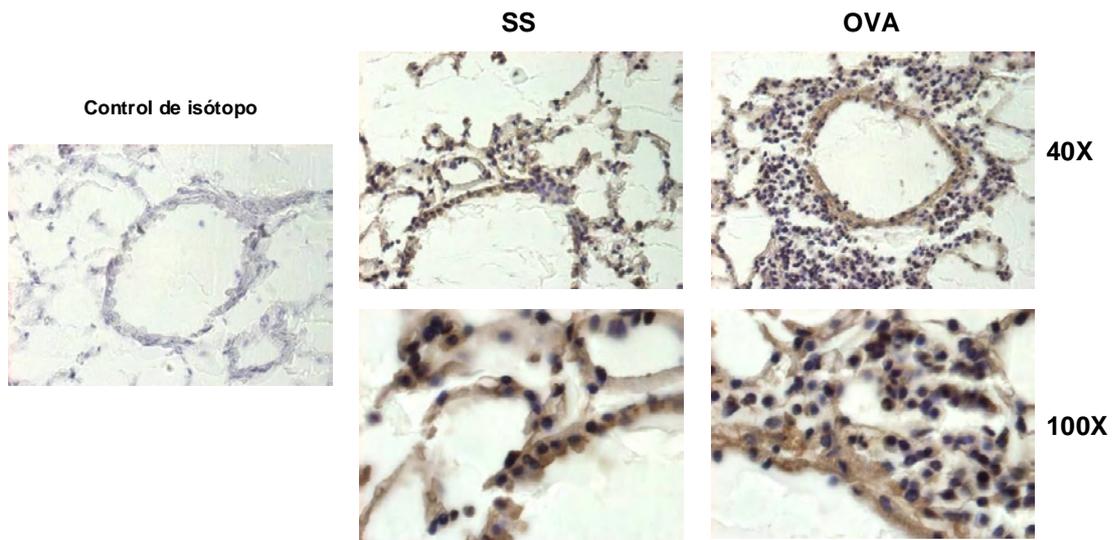


Figura 13. Fotografías representativas que muestran la tinción de inmunohistoquímica para TGF-β en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma severa. Se observan control de isótopo (40x), solución salina como control y grupo que recibió tres retos de OVA.

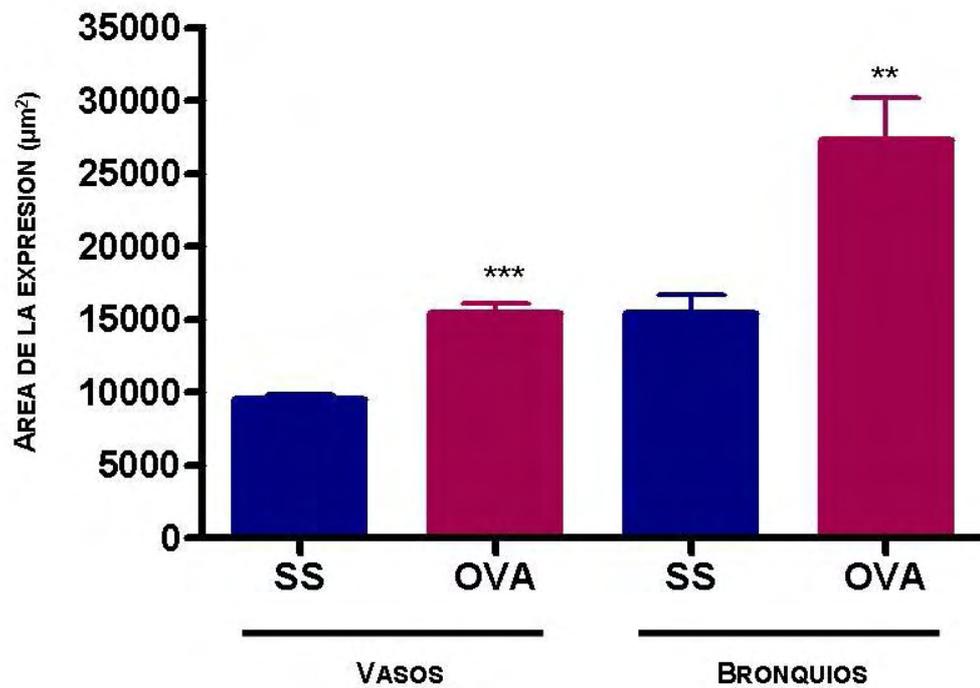


Figura 14. Análisis del área de expresión de TGF-β en vasos y bronquios donde se observa la comparación general de los grupos controles que recibieron solución salina y los grupos estudio que recibieron ovoalbúmina. La comparación en los vasos ($***p < 0.0001$, t de Student) y bronquios ($**p = 0.0017$, t de Student) mostraron un aumento en la expresión con respecto a sus controles que solo recibieron solución salina.

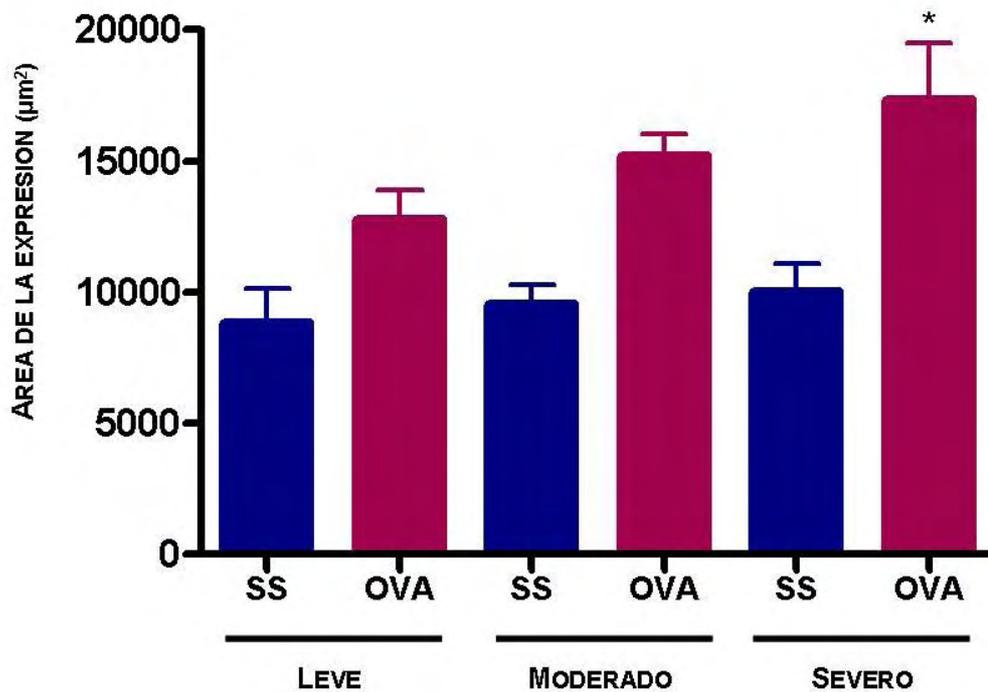


Figura 15. Análisis del área de expresión de TGF-β en vasos donde se observa la comparación de los diferentes grupos de ratones organizados en asma leve, moderada y severa, así como sus respectivos controles (* $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Tukey). Se muestra el aumento significativo de la expresión de TGF-β en el modelo severo con respecto a los modelos menos severos.

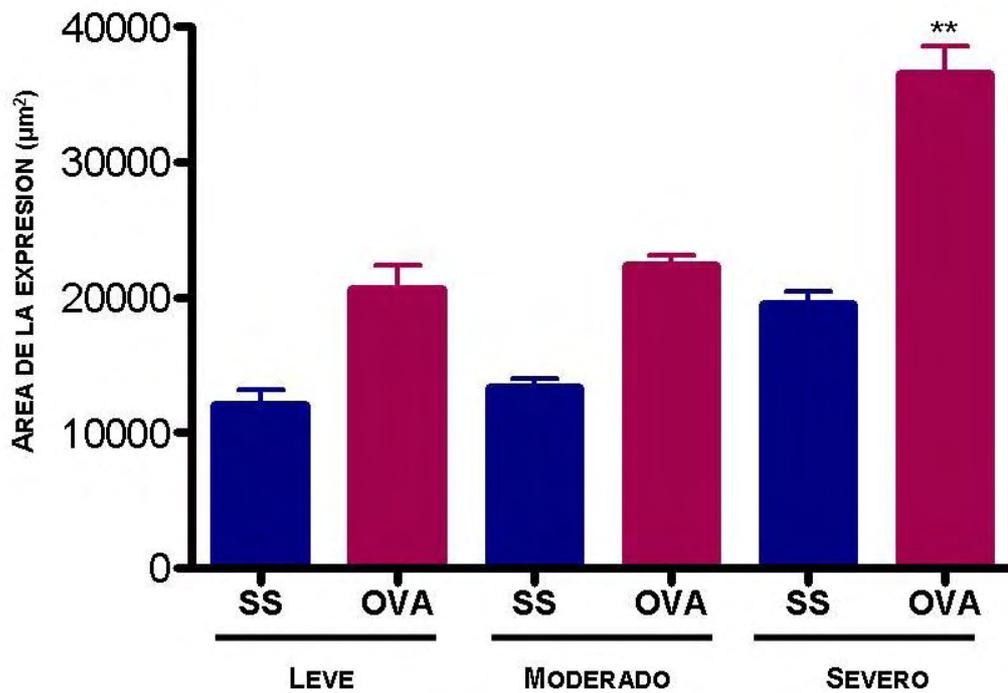


Figura 16. Análisis del área de expresión de TGF-β en bronquios donde se observa la comparación de los diferentes grupos de ratones organizados en asma leve, moderada y severa, así como sus respectivos controles (** $p < 0.001$, ANOVA, prueba de Tukey). El modelo de asma severa mostró el aumento significativo de la expresión de TGF-β, con respecto a los modelos de menor severidad.

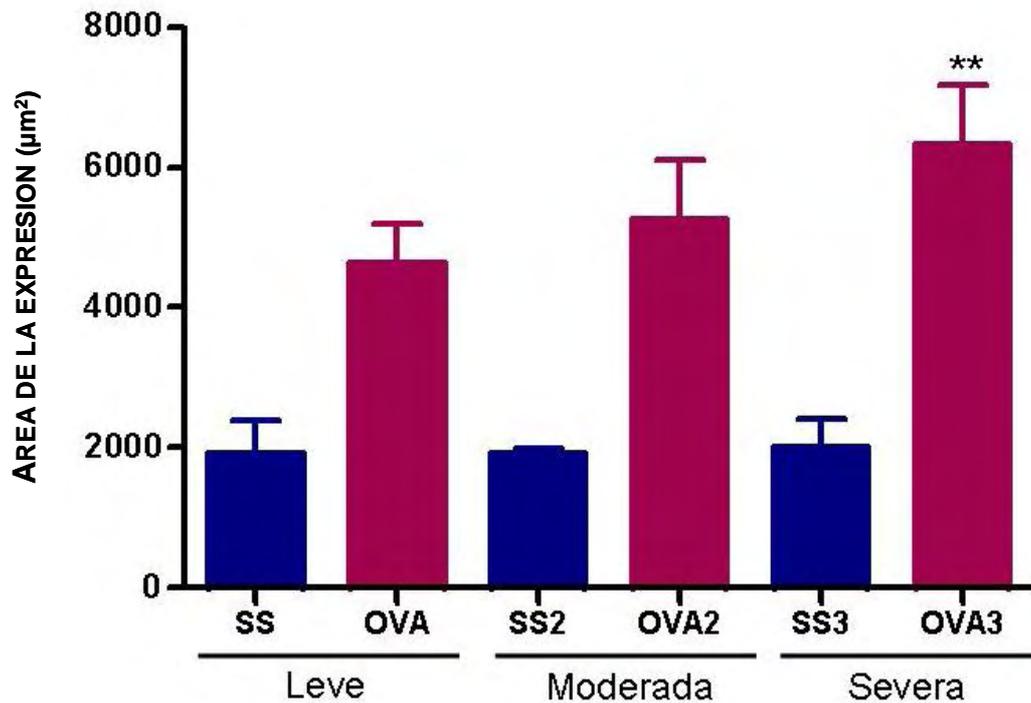


Figura 17. Análisis del área de expresión de YY1 en vasos. Se observa la comparación de YY1 en vasos en los diferentes modelos de asma (** $p=0.05$, ANOVA, prueba de Tukey). Se puede ver que el aumento significativo de la expresión de YY1 es significativa en los vasos del modelo de asma severa, esto es en comparación con los grupos de menor severidad⁽⁵⁰⁾.

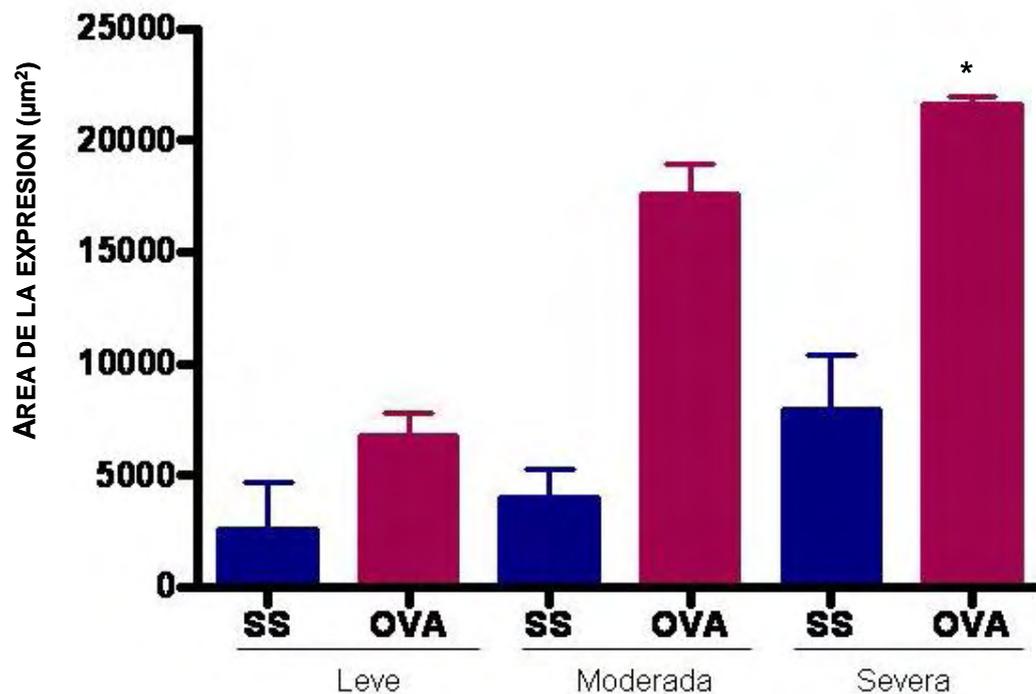


Figura 18. Análisis del área de expresión de YY1 en bronquios. Se observa la expresión de YY1 en bronquios, de acuerdo a los diferentes modelos de asma (* $p=0.05$, ANOVA, prueba de Tukey). Se puede visualizar que la expresión del factor de transcripción aumenta con el grado de severidad del asma, dando como resultado esta diferencia entre los diferentes grupos de asma ⁽⁵⁰⁾.

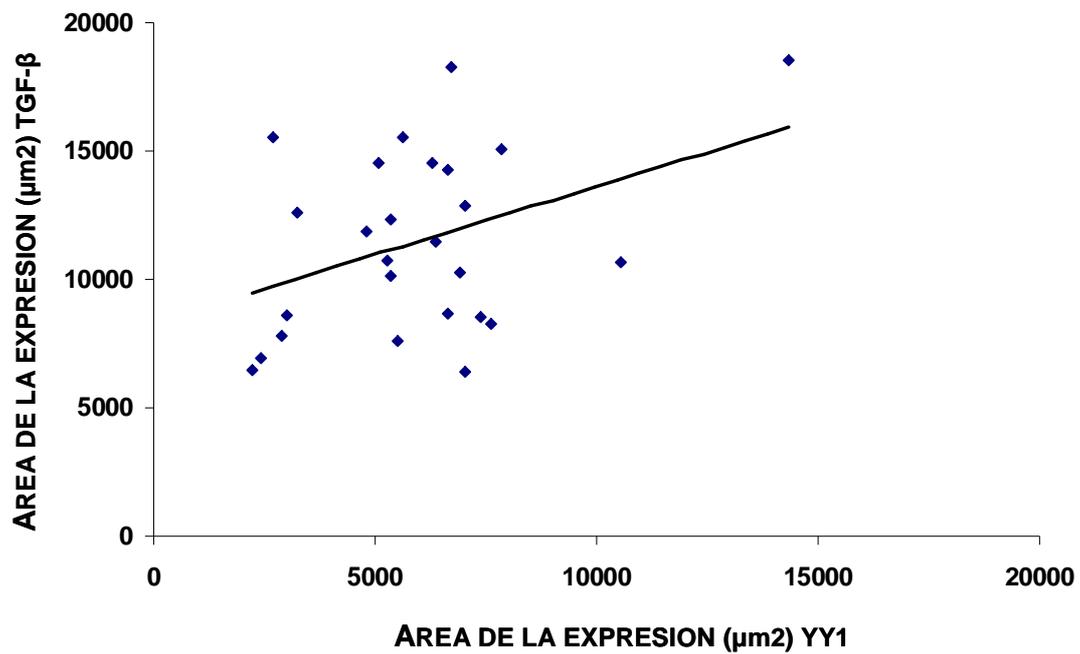


Figura 19. Correlación general de la expresión de TGF-β y la expresión de YY1 en vasos de tejido pulmonar de ratones asmáticos. Se muestra que esta correlación es positiva, $r = 0.391$ y $p = 0.035$.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Uno de los factores más importantes para el desarrollo del asma es la atópi, es decir, la predisposición genética para desencadenar una respuesta de hipersensibilidad mediada por IgE, por efecto de factores ambientales conocidos como alergenos. Actualmente se conocen diversos genes y sus productos relacionados con la susceptibilidad al asma. Tal es el caso del factor de transcripción YY1 (molécula que se encuentra presente en todas células y puede activar o reprimir la transcripción de diversos genes, dependiendo del medio ambiente y el tipo celular) el cual se ha reportado que regula genes involucrados en la patogénesis del asma, como lo es el TGF- β , esto en estudios *in vitro* ^(43;51). En este sentido se ha demostrado que la citocina TGF- β está asociada con la patogénesis del asma ⁽⁴⁷⁾ y su sobre-expresión se asocia con la severidad del asma y participa en la remodelación de las vías aéreas, activando fibroblastos y provocando la síntesis de componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágena tipo I y II, fibronectina, vitronectina y proteoglicanos ⁽⁵²⁾, además se ha descrito que el polimorfismo existente en el promotor del gen TGF- β ubicado en la posición C509-T (sitio de unión a YY1), favorece la unión del factor de transcripción YY1 al promotor de TGF- β y esto permite una sobre-expresión de esta citocina lo que podría contribuir de manera marcada en la severidad y los eventos de remodelación en asma ⁽⁴⁴⁾. Sin embargo, no existe un estudio en donde se demuestre que la sobre expresión de YY1 esté asociada con la sobre-expresión de la citocina TGF- β en modelos *in vivo*.

En este trabajo se propone abordar esta pregunta y para tal efecto, nuestro laboratorio ha estandarizado un modelo murino de asma con diferentes grados de severidad que van desde el asma leve, moderada hasta el asma severa. Se aplicó la tecnología de microarreglos de tejidos para evaluar la expresión de TGF- β en modelos murinos con diferentes grados de asma. La finalidad del microarreglo de tejidos es la de reducir la variabilidad entre diferentes ensayos y a diferentes tiempos, siendo su principal ventaja, además de que reduce tiempos y costos, disminuye la cantidad de los reactivos utilizados, debido a que en una sola laminilla es posible examinar múltiples tejidos todos representativos de cada grupo ⁽⁴⁹⁾.

La estandarización del microarreglo fue primordial, ya que con este procedimiento encontramos las condiciones ideales para una mejor respuesta del anticuerpo. Debido a que al inicio el control de isotipo se unía inespecíficamente al tejido pulmonar, lo que indicaba que con el anticuerpo anti-TGF- β estaba sucediendo lo mismo, ya que los dos son de la misma naturaleza, esto se resolvió bloqueando el tejido con suero normal de cerdo y suero humano al 2%, con lo que fue posible bloquear la mayor cantidad de receptores Fc's. Posteriormente, en otros experimentos, se determinó que la dilución 1:500 para TGF- β era la óptima para obtener una tinción específica y logrando una tinción sin la aparición de fondo, de esta manera se logró elegir la concentración adecuada del anticuerpo.

La tinción resultante se revisó con el propósito de realizar un análisis de las áreas de expresión correspondientes para cada modelo de asma, uno de los microarreglos correspondientes a vasos y el otro a bronquios.

En los vasos, mediante las imágenes se observó que la expresión de la citocina aumentó en los grupos sensibilizados con OVA en comparación con sus respectivos controles, estos por la respuesta que se lleva contra el alérgeno. La expresión de TGF- β en los vasos de los diferentes modelos de asma, también se puede visualizar con las imágenes, pero esta diferencia se hace significativa con las gráficas obtenidas del análisis del área de expresión, lo que también se observa en la expresión de YY1, en los vasos de los modelos asmáticos. La expresión de la citocina en el modelo moderado se observó en menor cantidad, debido a que el infiltrado inflamatorio presentó una disminución, y en el modelo de asma leve el infiltrado fue discreto, por lo que se esperaba un descenso en la expresión de la citocina, hecho que se vio reflejado en la gráfica. La tinción se localizó primordialmente en células del tejido epitelial del vaso, linfocitos T, eosinófilos, principalmente porque células del sistema inmune sintetizan esta citocina y actúan en la respuesta inflamatoria.

En el epitelio bronquial, también se observó el aumento de la citocina en los modelos de estudios con respecto a los controles, esto comprueba el hecho de que el proceso inflamatorio por el que están pasando los sujetos asmáticos, sugiere la relación directa con la expresión de la citocina. Entre los grupos asmáticos, el modelo de asma severa en comparación con modelos de menor severidad, se observó la elevada tinción para TGF- β , localizándose principalmente en células que sintetizan TGF- β , como células del epitelio bronquial, también se hizo evidente en eosinófilos, linfocitos T y macrófagos. En este sentido se ha reportado que la expresión de TGF- β puede visualizarse en el tejido conectivo extracelular de los espacios subepiteliales de las vías aéreas en asociación con el proteoglicano decorina ⁽⁴⁴⁾. La presencia de TGF- β en el grupo moderado también se observa en menor grado, mientras que el grupo leve, se encuentra en disminución. La diferencia significativa de los modelos, se hace evidente con las gráficas de los análisis de las áreas de expresión, ya que la expresión de TGF- β aumenta en los cuadros más graves de asma donde se aplicaron tres retos del alérgeno, es decir, la concentración de ésta aumenta, estimulando la remodelación. Se ha encontrado que los niveles basales de TGF- β en las vías aéreas son elevadas en sujetos asmáticos y estos niveles se elevan aún más con las exposiciones a los alérgenos ⁽⁵²⁾, lo que sustenta en parte nuestro trabajo ya que se está asociando a TGF- β con la severidad del asma.

La expresión de YY1 en los vasos mostró un aumento significativo, de acuerdo a los grados de severidad del asma. El modelo que recibió los tres retos del alérgeno, presentó una elevada presencia del factor de transcripción, evento que puede ser explicado por el proceso inflamatorio llevado a cabo por la severidad del asma, la expresión también se visualizó en células del sistema inmune y que además participan en este proceso. En el modelo de asma moderada, además de presentar una disminución en la expresión de YY1, también se visualizó un descenso en la presencia del infiltrado inflamatorio, mientras que el modelo leve el factor de transcripción se presentó en menor cantidad ⁽⁵⁰⁾. Estos resultados al compararse con los obtenidos del análisis realizado a la tinción de TGF- β , pueden sugerir el suceso de que YY1 puede estar regulando TGF- β , citocina crucial en el curso de la patogénesis del asma.

Con este trabajo se sustenta lo reportado en anteriores publicaciones donde Silverman y cols ⁽⁴⁴⁾, identificaron que la presencia del polimorfismo C509-T modifica la afinidad de YY1 al promotor del gen de TGF- β resultando en el aumento de la transcripción de este gen y proponen que TGF- β tiene un efecto dañino en individuos asmáticos. El presente trabajo resultó novedoso porque anteriormente no existía evidencia de tal suceso.

El aumento de esta citocina profibrótica y su sostenida elevación estimulan la remodelación en vías aéreas, como se ha mostrado con la elevada expresión de la citocina que fue visualizada en los modelos de asma severo, es decir, el modelo que recibió tres retos de OVA. La inflamación como una respuesta del sistema inmunológico ante un posible daño se observa en procesos asmáticos, este efecto se encontró en el modelo severo donde el infiltrado inflamatorio se apreció en mayor grado, explicado por la presencia de células inflamatorias que secretan esta citocina implicando la elevada expresión en los modelos más graves.

La correlación estadística (Pearson) nos indica que la expresión de YY1 es directamente proporcional a la expresión de TGF- β , este último contribuyendo a la patogénesis del asma, por lo tanto, sugiere la posibilidad de que YY1 esté regulando la transcripción de TGF- β *in vivo*, evento que no se había demostrado en este tipo de modelo empleando diferentes grados de severidad de asma. Esta correlación muestra que existe una relación positiva. Cuando hay un aumento de YY1 se presenta el aumento de TGF- β , aunque esta correlación positiva no es perfecta, se observa esta tendencia ($r = 0.391$). No obstante, para aumentar esta tendencia se podrían realizar más mediciones o incluir otro grupo de asma, para que se tengan más datos sobre la correlación existente entre la expresión del factor de transcripción YY1 y la expresión de la citocina TGF- β . La evidencia de que este factor regula este gen ya ha sido demostrado en modelos *in vitro* ⁽⁴⁴⁾.

Este trabajo tuvo la particularidad de correlacionar la expresión de YY1 y TGF- β , algo que en parte puede reforzar los datos encontrados en reportes anteriores donde se

asocia el polimorfismo C509-T con la afinidad de YY1 ⁽⁴⁴⁾. Así con esta razón se encontró que la expresión del factor de transcripción YY1 aumentó directamente en relación con el grado de severidad del asma, posteriormente se encontró que la expresión de TGF- β una citocina crucial en el curso de la patogénesis del asma, también se encontraba en relación directa con el grado de severidad, por lo tanto es posible relacionar que el aumento de YY1 es directamente proporcional al incremento de TGF- β y este a su vez con el grado de severidad del asma.

CONCLUSIONES

Se logró con éxito estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de TGF- β , estableciendo condiciones óptimas de trabajo, dilución de TGF- β 1:500 (0.0004 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) bloqueo por toda la noche con una mezcla de suero normal de cerdo 2% y suero humano 2%, para evitar el pegado inespecífico y lograr una tinción sin fondo.

La expresión de la citocina TGF- β se identificó de manera general en células epiteliales de la vía aérea, linfocitos y macrófagos, localizándose principalmente a nivel citoplasmático y en la región perinuclear, mientras que la expresión general de YY1 se visualizó en células epiteliales, linfocitos y macrófagos, también en región citoplasmática y perinuclear de las células, todo esto en células que participan en la regulación de la respuesta inflamatoria.

La alta expresión del factor de transcripción YY1 en modelos de asma severa se relaciona con la elevada expresión de TGF- β , y esta correlación es directa y significativa, lo que sugiere que YY1 puede estar regulando de manera positiva la expresión de TGF- β *in vivo*.

Con estos resultados, la hipótesis planteada al inicio del presente trabajo ha sido comprobada, mostrando la relación directa entre estos factores importantes que participan en la patogénesis del asma.

PROPUESTAS

Son necesarios mas estudios para demostrar lo anterior, tales como, RT-PCR para evaluar el aumento de los mARN en los diferentes modelos de asma, así como también es posible realizar la inhibición de la actividad de YY1 por medio de DETA NONOAate (donador de oxido nítrico).

ANEXO

MATERIAL

Reactivos

Nombre	Fórmula	Marca
Acetona	$\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$	Sigma
Alcohol etílico absoluto	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Sigma
Bloqueador de suero normal de cerdo		Vector
Citrato de Sodio	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Chemicon
Eosina	$\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$	Sigma
Cristales de Hematoxilina		Sigma
Parafina		Chemicon
Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2	JT Baker
Resina		Merck
Silano		Sigma
Sustrato DAB (diamino benzidina)		Dako
Xilol	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$	Sigma
Buffer salino de fosfatos 10x		GIBCO

Soluciones

Nombre
Etanol al 70%
Etanol al 96%
Buffer Salino de Fosfatos (PBS) 1x
Citrato de sodio 0.01M pH 6.0

Equipo

	Descripción
Micrótopo	Accu-Cut SRM 200
Microarreglador	<i>CHEMICON's Advanced Tissue Arrayer</i> (ATA 100 Chemicon)
Baño de Flotación	Baño de flotación histológico redondo PROLAB
Horno	Fagor 5H-760 X
Agitador	Agitadores MIXMOR Incorporated
Baño maría	AQUABATH BarnsteadInternational
Microscopio óptico	Olympus

Material biológico

Cepa	Casos
Ratones Balb/c control	90
Ratones Balb/c con asma leve	10
Ratones Balb/c con asma moderada	50
Ratones Balb/c con asma severa	30

Lista de anticuerpos

Anticuerpo	Proveedor
Anti-TGF- β	Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA. USA
Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR)	DAKO LSAB + kit, DAKO corporation

REFERENCIAS

- (1) Barraza-Villarreal A, Sanín-Aguirre LH, Téllez-Rojo MM, Lacasaña-Navarro M. Prevalencia del asma y otras enfermedades alérgicas en niños escolares de Ciudad Juárez, Chihuahua. *Salud Publica Mex.* 2001; 43: 433-443.
- (2) INER. Acerca de la clínica del asma. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias . 1-3-2008. Disponible en: http://portal.iner.gob.mx/inerweb/GEN_cont_esp.jsp?contentid=1605&version=1&channelid=3
- (3) Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature.* 1999; 402; (6760 Suppl):B5-11.
- (4) Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol.* 1998;160:4730-7.
- (5) Halonen M, Stern DA, Lohman C, Wright AL, Brown MA, Martinez FD. Two subphenotypes of childhood asthma that differ in maternal and paternal influences on asthma risk. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:564-70.
- (6) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996; 383: 787-93.
- (7) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136: 2348-57.
- (8) Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2001; 2: 95-101.
- (9) Nakao A. Is TGF-beta1 the key to suppression of human asthma? *Trends Immunol.* 2001; 22: 115-8.
- (10) Guan E, Wang J, Norcross MA. Identification of human macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta as a native secreted heterodimer. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12404-9.
- (11) Awad MR, El Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation.* 1998; 66: 1014-20.
- (12) Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, et al. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of

variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its signaling pathway. *J Hum Genet.* 2002; 47: 478-83.

- (13) Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Cytokines. *Medical Immunology.* 10th Ed. San Francisco: McGraw-Hill; 2001; 149-64.
- (14) Abbas AK, Litchman AH. Cytokines. *Cellular and molecular immunology.* 5th Ed. Elsevier; 2007; 243-70.
- (15) Shi Y, Lee JS, Galvin KM. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... *Biochim Biophys Acta.*1997; 1332: F49-F66.
- (16) Moriuchi M, Moriuchi H. YY1 transcription factor down-regulates expression of CCR5, a major coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 2003; 278: 13003-7.
- (17) Moriuchi M, Moriuchi H, Margolis DM, Fauci AS. USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol.* 1999; 162: 5986-92.
- (18) Kalayci O, Birben E, Wu L, Oguma T, Storm Van's GK, Subramaniam V, et al. Monocyte chemoattractant protein-4 core promoter genetic variants: influence on YY-1 affinity and plasma levels. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 29: 750-6.
- (19) Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354: 610-21.
- (20) Baay-Guzman G.J., Hernández-Cueto A., Huerta-Yeppez S. Contribución de la hipoxia en la remodelación de tejido pulmonar en procesos asmáticos. *Rev Alergia Mex* 2008; 55: 18-32.
- (21) Varner AE. The increase in allergic respiratory diseases: survival of the fittest? *Chest.* 2002; 121: 1308-16.
- (22) Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol.* 2000; 97: 43-9.
- (23) Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest.* 1997; 100: 768-76.
- (24) Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1350-8.
- (25) Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998; 115: 257-69.

- (26) Maddox L., Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med.* 2002; 53: 477-98.
- (27) Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, et al. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest.* 2000; 105: 61-70.
- (28) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med.* 2001; 344: 350-62.
- (29) Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168: 431-5.
- (30) Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1592-600.
- (31) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Management of asthma exacerbations. *Thorax* 2004; 59: 545-6.
- (32) Postma DS, et al. Genetic susceptibility to asthma - bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med.* 1995; 333: 894-900.
- (33) Hans C.O, Raif S.G. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J Clin Invest.* 1999; 104: 837-43.
- (34) Prieto M, Rivas JV, Lopez NM. El TGF-beta: síntesis y mecanismo de acción. *Nefrología.* 2002;1435-146.
- (35) Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors.* 1993; 8: 1-9.
- (36) Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000; 103: 295-309.
- (37) Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 137-61.
- (38) Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.*1990; 6: 597-641.
- (39) Vilchis-Landeros MM, Juarez P, Lopez-Casillas F. Receptores y funciones del TGF-beta, una citocina crucial en la cicatrización. El papel fisiopatológico del TGF-beta en las neuropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF-beta como agentes terapéuticos potenciales. *Gac Med Mex.* 2003; 139: 126-130.

- (40) Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, Cartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 5788-92.
- (41) Hernandez-Pando R. Receptores y funciones del TGF-beta, una citocina crucial en la cicatrización. Participación del factor de transformación tumoral-beta en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. *Gac Med de Mex*. 2003; 139: 135-138.
- (42) Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, et al. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 1492-7.
- (43) Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*. 2006; 25: 1125-42.
- (44) Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169: 214-9.
- (45) Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 1999; 8: 93-7.
- (46) Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 220-8.
- (47) Bellocq A, Azoulay E, Marullo S, Flahault A, Fouqueray B, Philippe C, et al. Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 21: 128-36.
- (48) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4: 844-7.
- (49) Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 657-62.
- (50) Diaz-Elizondo G. Identificación del factor de transcripción Ying Yang 1 y su asociación con TGF-beta en un modelo murino de asma con diferentes grados de severidad. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. México: FES Zaragoza; UNAM;2008.p. 37-47
- (51) Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 169-82.

- (52) Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, Holgate ST, et al. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156(2 Pt 1): 642-7.