



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YIN YANG-1 EN CAMBIO
DE RESPUESTA DE TH1 A TH2 EN LESIONES CUTÁNEAS DE
PACIENTES CON MICOSIS FUNGOIDE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LUIS ENRIQUE HUANOSTA MURILLO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: RODOLFO PASTELÍN PALACIOS**

VOCAL: **Profesor: MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO**

SECRETARIO: **Profesor: MARCELA ALCÁNTARA HERNÁNDEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

2º SUPLENTE: **Profesor: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “BERNARDO SEPÚLVEDA”, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

EN COLABORACIÓN CON UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO, “FEDERICO GÓMEZ”, SSA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marcela Alcántara Hernández

SUSTENTANTE:

Huanosta Murillo Luis Enrique

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	1
II. ABREVIATURAS	2
1. RESUMEN	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. PIEL	4
2.2. DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4+ EN LINFOCITOS EFECTORES TH1 Y TH2	5
2.3. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YIN-YANG-1	9
2.4. MICOSIS FUNGOIDE	11
2.4.1. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN MICOSIS FUNGOIDE	13
2.4.2. ANTECEDENTES DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
5. HIPÓTESIS	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	21
6.2. ANÁLISIS DE IMÁGENES	22
6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
7. RESULTADOS	24
7.1. EXPRESIÓN DE IFNγ EN LESIONES CUTÁNEAS Y TEJIDOS DE PIEL CONTROL	25
7.2. EXPRESIÓN DE IL-4 EN LESIONES CUTÁNEAS Y TEJIDOS DE PIEL CONTROL	27

7.3. EXPRESIÓN DE YY1 EN LESIONES CUTÁNEAS Y TEJIDOS DE PIEL CONTROL	30
7.4. EXPRESIÓN DE YY1 E IL-4 POR LA MISMA CÉLULA	33
7.5. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE YY1 Y LA EXPRESIÓN DE IL-4	34
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES	41
10. BIBLIOGRAFÍA	42

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1.	Diversas manifestaciones cutáneas de micosis fungoide	13
Figura 2.	Expresión de IFN γ en lesiones cutáneas de pacientes con MF en diferentes etapas	25
Figura 3.	Cuantificación de la expresión total de IFN γ en la dermis y epidermis	27
Figura 4.	Expresión de IL-4 en lesiones cutáneas de pacientes con MF en diferentes etapas	28
Figura 5.	Cuantificación de la expresión total de IL-4 en la dermis y epidermis	30
Figura 6.	Expresión de YY1 en lesiones cutáneas de pacientes con MF en diferentes etapas	31
Figura 7.	Cuantificación de la expresión total de YY1 en la dermis y epidermis	32
Figura 8.	Tinción doble para YY1 e IL-4	33
Figura 9.	Análisis de correlación entre la expresión de YY1 e IL-4 en la dermis de pacientes con MF	35
Tabla 1.	Resumen de las características de los pacientes con MF	24

II. ABREVIATURAS

AP-1	Proteína Activadora 1
APC	Célula Presentadora de Antígeno
DAB	Diamino-benzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Asociado a Enzimas
GATA-3	Proteína 3 de unión a GATA
IFNγ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IOD	Densidad Óptica Integrada
LCCT	Linfoma Cutáneo de Células T
MF	Micosis Fungoide
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
STAT-1	Transductor de señal y activador de la transcripción 2
STAT-3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
STAT-4	Transductor de señal y activador de la transcripción 4
TCR	Receptor de Células T
TGF-β	Factor de crecimiento Tumoral β
YY1	Yin-Yang-1

1. RESUMEN

La micosis fungoide (MF) es el linfoma cutáneo más común. Consiste en una neoplasia de linfocitos T CD4+ localizados preferentemente en la epidermis. Es una enfermedad de progresión lenta; en etapas tempranas se presentan lesiones en forma de placa, que pueden invadir el 95 – 100% de la superficie corporal (eritrodermia) o puede progresar a etapas avanzadas con la presencia de tumores cutáneos.

Se ha propuesto un patrón de citocinas tipo Th1 en etapas tempranas de la enfermedad, que cambia hacia un perfil tipo Th2 al progresar la enfermedad, sin embargo, no ha habido estudios robustos que demuestren de manera concluyente dicho cambio de perfil.

Por otro lado, el factor de transcripción YY1, tiene un papel importante en procesos fisiológicos normales como diferenciación celular, replicación y proliferación celular, ya sea a través de la activación o represión de genes relacionados con dichas funciones. También se ha estudiado la función de YY1 en la biología de distintos tipos de cáncer, en los que se ha demostrado que la sobre-expresión y/o activación de dicho factor de transcripción está asociada con procesos carcinogénicos como proliferación celular descontrolada, metástasis, resistencia a estímulos apoptóticos y tumorigénesis.

Recientemente se describió que el factor de transcripción YY1 es importante en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia un perfil tipo Th2, ya que promueve la expresión génica de citocinas a través de la regulación del locus Th2 y su interacción con el factor de transcripción GATA-3.

Con base en estos antecedentes se analizó la expresión de las citocinas IFN γ e IL-4 y del factor de transcripción YY1 mediante la técnica de inmunohistoquímica en biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con MF en diferentes etapas de la enfermedad. Se encontró una disminución significativa de la expresión de IFN γ al progresar la enfermedad. Además, se observó un aumento significativo en la expresión de IL-4 al progresar la enfermedad y el mismo comportamiento en la expresión de YY1. También por medio de una tinción doble, para YY1 e IL-4, se encontró que la célula que sobre-expresa YY1 también expresa IL-4. Al realizar un análisis de correlación entre la expresión del factor YY1 y las citocinas IL-4 e IFN γ , se encontró una correlación positiva entre la expresión de YY1 e IL-4, lo que nos sugiere que el factor YY1 podría estar regulando el cambio de respuesta hacia un perfil Th2 en etapas progresivas y esto es importante ya que se podría explicar la pérdida de la inmunovigilancia lo cual podría favorecer la progresión de la enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La piel en el sistema inmune

La piel, como la interface entre el organismo y el medio ambiente, proporciona una primera línea de defensa en contra de patógenos microbianos y agentes físico-químicos. La inmunovigilancia de un órgano tan grande y expuesto, representa un reto único para las células efectoras del sistema inmunitario. Si la respuesta es inadecuada pueden surgir infecciones o algún tipo de neoplasia, pero si la respuesta inmunitaria es excesiva el sujeto puede desarrollar inflamación crónica; lo cual a su vez también puede promover el surgimiento de neoplasias, y autoinmunidad. Por lo tanto, los mecanismos de defensa y los mecanismos de tolerancia deben de estar debidamente reguladas para lograr la homeostasis del sistema inmunitario en la piel, permitiendo que las respuestas sean propiamente ajustadas ante diversos retos¹.

La piel humana tiene dos principales compartimientos: la epidermis y la dermis. La epidermis es el compartimiento más externo y contiene cuatro estratos; el estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato corneo. Las células especializadas de éste compartimiento son los melanocitos, productores de melanina y las células de Langerhans, las cuales son las células inmunitarias residentes en la piel más abundantes. También se encuentran las células T, principalmente T CD8+¹.

La dermis cuenta con una gran diversidad celular. Contiene células especializadas, entre las cuales están las células dendríticas, linfocitos T CD4+ cooperadores, linfocitos T $\gamma\delta$ y células NKT. Además también están presentes

macrófagos, células cebadas y fibroblastos. La dermis es drenada por los conductos linfáticos y vasculares, a través de los cuales las células que migran pueden circular entre la piel, los nódulos linfáticos y la circulación periférica³.

Una función esencial de la piel es mantener la acción coordinada entre células epiteliales y del sistema inmunitario para generar respuestas adecuadas ante los diversos insultos físicos-químicos y microbiológicos manteniendo la homeostasis del tejido, por lo que es fundamental que las respuestas inmunes efectoras en la piel sean debidamente ajustadas. Una población celular que participa de manera activa en la homeostasis de este órgano son los linfocitos T, ya que son esenciales en la defensa contra diferentes patógenos y en la regulación de las respuestas inmunes, pero también pueden actuar como perpetuadores de diversas patologías cutáneas¹.

2.2. Diferenciación de los linfocitos T CD4+ en linfocitos efectores Th1 y Th2

Los linfocitos T efectores se caracterizan por su capacidad para expresar moléculas de superficie y secretar citocinas que activan otras células. En la piel constituyen una población importante de alrededor de 2×10^{10} células T residentes, que son más del doble de los que se encuentran en sangre periférica. La activación de los linfocitos T y su diferenciación en células efectoras y memoria requieren el reconocimiento del antígeno, coestimulación y citocinas que producen los propios linfocitos T y las células presentadoras de antígeno (CPA) y otras células en el lugar del reconocimiento del antígeno⁴.

El antígeno es la primera señal necesaria para la activación de los linfocitos, lo que asegura que la respuesta inmune resultante sea específica. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ reconocen complejos péptido-MHC mostrados por las CPA. Además del reconocimiento por el TCR de los péptidos mostrados por las moléculas del MHC, otras proteínas de superficie del linfocito T participan en el proceso de activación de este linfocito, como las moléculas de coestimulación⁴.

Las moléculas de coestimulación representan la segunda señal para la activación del linfocito T. Sin la coestimulación, los linfocitos T no responden al reconocer al antígeno y mueren por apoptosis, o entran en un estado de falta de reactividad llamado anergia. La vía de coestimulación mejor caracterizada en la activación del linfocito T es aquella en que interviene el receptor de superficie del linfocito T llamado CD28, que se une a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 expresadas en las CPA activadas, de esta manera las señales del CD28 cooperan con el reconocimiento del antígeno para iniciar las respuestas de los linfocitos T vírgenes, induciendo vías de transmisión de señales que potencian o actúan junto con las señales del TCR para estimular la expresión de proteínas de supervivencia, citocinas y receptores para citocinas, para promover la proliferación celular e inducir la diferenciación hacia las células efectoras y memoria⁴.

Las tercera señal de activación, constituida por las citocinas induce en los linfocitos la transcripción de genes que permite la diferenciación hacia distintos perfiles con funciones especializadas. Es así como las citocinas producidas en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa promueven la diferenciación de los linfocitos T vírgenes CD4+ en linfocitos Th1, Th2, Th17 o Treguladores. Con la

activación continua se producen cambios epigénicos, de forma que los genes que caracterizan cada perfil, entre ellos los de citocinas, son más accesibles para la activación y mientras que los genes correspondientes a otros perfiles de diferenciación se hacen más inaccesibles. Debido a estos cambios, el linfocito T diferenciado se compromete progresivamente en una vía específica. Las citocinas producidas por cualquier perfil dado promueven el desarrollo de este subgrupo e inhiben la diferenciación hacia las subpoblaciones CD4⁺⁴.

Para fines de este trabajo nos enfocaremos en los perfiles de diferenciación Th1 y Th2, así como la regulación entre estos.

Diferenciación Th1. El factor de transcripción T-bet es un miembro de la familia T-box y se considera el regulador maestro de la diferenciación Th1. La expresión de T-bet se induce en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes en respuesta al antígeno y al interferón gama (IFN γ). El IFN γ activa el factor de transcripción STAT-1, que a su vez estimula la expresión de T-bet. T-bet promueve entonces la producción de IFN γ a través de una combinación de una activación directa del gen del IFN γ y la inducción de la reestructuración de la cromatina del *locus* del IFN γ . La interleucina 12 (IL-12) contribuye al compromiso Th1 al unirse en receptores situados en los linfocitos T CD4⁺ estimulados por el antígeno y activar el factor de transcripción STAT-4, que potencia aún más la producción de IFN γ ⁴.

La diferenciación hacia un perfil Th1 permite una respuesta inmune efectora contra patógenos intracelulares y contra células neoplásicas. El IFN γ en la respuesta anti-neoplásica puede aumentar la expresión de las moléculas de clase I del MHC

por las células tumorales y la sensibilidad a la lisis por los linfocitos T citotóxicos. El IFN γ también puede activar a los macrófagos para que destruyan a las células tumorales. La importancia del IFN γ en la inmunidad antitumoral la demuestra el hallazgo de un aumento de la incidencia de tumores en ratones con una inactivación génica que carecen de esta citocina, del receptor para el IFN γ o de componentes de la cadena de transducción de señales del receptor para el IFN γ ⁶.

Diferenciación Th2. GATA-3 es un factor de transcripción que actúa como un regulador maestro de la diferenciación Th2 y que aumenta la expresión de los genes de citocinas Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, que se localizan en el mismo locus génico. GATA-3 interactúa directamente con los promotores de estos genes y también mediante la reestructuración de la cromatina, lo que abre el locus para que sea accesible a otros factores de transcripción. La diferenciación Th2 se desarrolla en respuestas a parásitos protozoarios o helmintos. En contraste con los linfocitos Th1, la dominancia de una respuesta Th2 en los tumores se relaciona con pronóstico pobre en la mayoría de los casos⁴.

Cada perfil de células efectoras diferenciadas produce citocinas que promueven su propio desarrollo y pueden suprimir el desarrollo de las otras subpoblaciones de linfocitos. El IFN γ secretado por los linfocitos Th1 promueve una mayor diferenciación Th1 e inhibe la diferenciación de linfocitos Th2. De forma análoga, la IL-4 producida por los linfocitos Th2 promueve la diferenciación Th2 y el factor de transcripción GATA-3 inhibe la expresión de la cadena transmisora de señales del receptor para la IL-12. Este antagonismo Th1-Th2 puede explicar la asociación de Th2 con pronóstico pobre en cáncer. Al predominar este tipo de respuesta, se

inhibe la producción de citocinas Th1 lo que lleva a una pérdida de la inmunovigilancia y de la respuesta anti-neoplásica⁸.

Debido a la importancia de la diferenciación de los linfocitos T en la regulación de la respuesta inmunitaria en condiciones de homeostasis y patológicas, los mecanismos que intervienen en este fenómeno son un campo activo en investigación. En los últimos años se han encontrado nuevos factores que regulan esta función entre ellos se encuentra el factor de transcripción Yin Yang-1.

2.3. Factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY1)

Yin-Yang-1 (YY1) es un factor de transcripción expresado de manera ubicua, cuya región con dedos de Zinc le proporciona los dominios de unión a DNA. Este factor se caracteriza por tener un papel fundamental en procesos biológicos normales como diferenciación, replicación y proliferación celular. YY1 ejerce sus efectos en genes involucrados en estos procesos a través de su habilidad para iniciar, activar, o reprimir la transcripción dependiendo de los estímulos recibidos por las células y por su asociación con otros factores celulares. Los mecanismos de acción de dicho factor incluyen la activación o represión directa mediante la unión al sitio promotor, la activación o la represión indirecta a través del reclutamiento de cofactores, o la activación o represión por la interrupción de sitios de unión o por cambios conformacionales del DNA¹⁰.

La importancia fisiológica de la actividad de YY1 ha sido aplicada en modelos de biología de distintos tipos de cáncer. La mayoría de los datos son consistentes con la hipótesis que indica que la sobreexpresión y/o activación de YY1 está asociada

con la proliferación celular descontrolada, resistencia de estímulos apoptóticos, tumorigénesis y potencial metastásico. Los mecanismos moleculares que han sido investigados indican que esto se debe a una bajo-regulación de la actividad de p53, alteración en la expresión de NF-κB, regulación tanto de los genes como de los productos génicos de muerte y la unión diferencial de YY1 en presencia de mediadores inflamatorios^{10, 11}. Sin embargo recientemente se describió su papel en la actividad del sistema inmunitario, regulando la diferenciación de los linfocitos T CD4+¹².

Anteriormente, se había estudiado la capacidad de YY1 de activar o reprimir genes relacionados con el sistema inmune, sin embargo hasta hace poco se desconocía su papel en la regulación de la diferenciación de los linfocitos. Inicialmente se describió que algunos genes como *tbx21*, *il4*, *il5*, *ifng* e *il13* contienen sitios consenso de unión para YY1, sin embargo se desconocía si este factor podría funcionar como activador o represor de estos genes. En un modelo de asma utilizando linfocitos provenientes de ratones heterocigotos (*yy1^{+/-}*) se observó menor expresión de IL-4 y menos inflamación alérgica, comparado con el fenotipo silvestre¹². Por otro lado, se demostró que en una línea celular de linfocitos T, la sobre-expresión de YY1 disminuye la función del promotor de *tbx21* actuando como represor de la respuesta Th1²⁵. En un estudio reciente se describió que YY1 es necesario para la modificación de la cromatina, ya que se ha visto que interactúa con algunos factores modificadores de la cromatina como; histona acetiltransferasas, histona deacetilasas, histona metiltransferasa. Por lo que al interactuar con alguno de estos factores puede modificar o remodelar el locus de

citocinas Th2. Otra función importante del factor YY1 es que puede mediar las interacciones entre la región de control del locus Th2 y los promotores de genes de citocinas Th2^{10, 12}.

Además, se demostró que YY1 puede reclutar al factor de transcripción GATA-3 en el locus de citocinas Th2 favoreciendo la transcripción del locus Th2. Hwang et. al han mostrado que YY1 y GATA-3 coinmunoprecipitan en células que sobreexpresan estas dos proteínas, las cuales se colocan en células Th2, lo que sugiere una asociación física entre ellas. Estudios cinéticos de unión de proteínas muestran que YY1 se une al locus Th2 aproximadamente de 12-24 horas antes de la unión de GATA-3. Por lo cual YY1 se ha sugerido como un factor necesario y crítico para la diferenciación Th2 por cooperación con GATA-3 y por modificación de la cromatina e interacciones cromosómicas¹². Lo cual ayuda a elucidar el proceso fundamental de la diferenciación de células T cooperadoras, información que puede ser útil en el desarrollo de una estrategia terapéutica para enfermedades mediadas por células Th2.

Este novedoso mecanismo de regulación de la diferenciación de los linfocitos T CD4+ podría tener implicaciones importantes en la patogénesis de enfermedades en las que participen linfocitos Th2.

2.4. Micosis fungoide

El linfoma cutáneo de células T comprende un complejo de desordenes con varias consideraciones, manifestaciones y cursos clínicos. La micosis fungoide (MF) es una neoplasia de linfocitos T CD4+ que se localizan preferentemente en la

epidermis, es el linfoma cutáneo más común y se caracteriza por su progresión lenta. La enfermedad se presenta con lesiones en forma de manchas o placas en áreas definidas de la piel, las lesiones de placa de MF tienen predilección por áreas que no están expuestas al sol (por ejemplo; glúteos, muslo, y pecho), aunque cualquier área de la piel puede ser afectada. Las placas pueden mostrar hipopigmentación o hiperpigmentación, y petequia, así como también una variedad de tropismos en los cuales las células se acumulan en áreas especializadas de la epidermis, llegando a formar los llamados microabscesos de Pautrier¹³.

La piel de pacientes con micosis fungoide puede mostrar áreas poco definidas de eritema, aparentemente surgidas de manera espontánea o conforme la enfermedad va progresando. Cuando el eritema alcanza un punto de predominancia en más del 80% del área superficial, la enfermedad evoluciona hacia una etapa que es llamada micosis fungoide eritrodérmica. Finalmente, la enfermedad puede evolucionar o no hacia una etapa tumoral. Los tumores cutáneos pueden surgir de pacientes con MF en fase de placa o eritrodermia. Los tumores están caracterizados por una fase de crecimiento exagerado, resultando en el desarrollo de lesiones elevadas y frecuentemente ulcerantes¹³.



Figura 1. Diversas manifestaciones cutáneas de micosis fungoide. A MF placa. B MF Eritrodermia. C. MF Tumor (Girardi, *et al.* 2004)

Los principales hallazgos histológicos en placas de micosis fungoide representan algunas características importantes de la enfermedad. Un infiltrado linfocítico en la dermis superficial, con linfocitos migrando entre queratinocitos epidérmicos, define el llamado epidermotropismo que caracteriza a este linfoma¹³. Los linfocitos pueden mostrar grados variados de atipia (pleomórficos, hiper Cromáticos y de núcleo irregular). Además del estudio histológico de rutina, la tinción de una biopsia de piel con un panel de marcadores de linfocitos es utilizado para hacer un diagnóstico de la enfermedad.

2.4.1. Producción de citocinas en MF

Los linfocitos T activados en micosis fungoide tienen la capacidad de cambiar la expresión de moléculas señalizadoras y varias citocinas, que efectúan funciones específicas benéficas o por otro lado, median funciones inflamatorias. El análisis de las células clonales en biopsias de piel y en muestras de sangre periférica de pacientes con linfoma cutáneo de células T han mostrado la expresión de varios marcadores de activación, como lo son CD45RO, antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el receptor para IL-2 (CD25)¹⁴.

Después de la estimulación del receptor de IL-2, en las células T activadas se da la fosforilación de algunas proteínas de señalización intracelular; por ejemplo, de la molécula STAT-3, y se ha visto que en una línea celular obtenida de una biopsia de piel de un paciente con MF, la activación constitutiva de ésta molécula contribuye a que las células tumorales puedan evadir la señalización generada por IFN γ ¹⁵.

El cambio en la producción de diversas moléculas señalizadoras y citocinas, junto con la progresión lenta, contribuye a que la micosis fungoide se considere una enfermedad inflamatoria de la piel, en la cual, las células tienen la capacidad de producir diversas citocinas.

Las células activadas en micosis fungoide también pueden tener efectos regulatorios sobre los linfocitos T normales. Por ejemplo, se ha demostrado por análisis de mRNA que en líneas celulares de linfoma cutáneo de células T las células tumorales tienen la capacidad de producir citocinas antiinflamatorias como interleucina 10 (IL-10) y factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y también encontraron que en estas células no se expresan citocinas tipo Th1, lo cual podría explicar la inhibición de una respuesta antitumoral específica¹⁷. Este fenómeno se puede considerar para el riesgo incrementado de cáncer secundario e infecciones en pacientes con MF.

A pesar de que se ha analizado con varios enfoques la producción de citocinas en MF, aún no existe un consenso acerca del perfil de diferenciación dominante de los linfocitos T en las lesiones. Por ejemplo; un estudio de ELISA realizado del

sobrenadante de un cultivo de células de dermis y epidermis, para cuantificar la producción de citocinas, demostró que en etapas tempranas de la enfermedad no hay un patrón detectable de linfocitos T CD4, ya que las células son capaces de producir IL-4 e IFN γ ¹⁸. Otro estudio realizado por PCR de material genético extraído de leucocitos de sangre periférica y de células de biopsias de pacientes con MF demostró que las lesiones cutáneas en la fase de placa, están caracterizadas por un perfil epidérmico de citocinas tipo Th1, ya que se detectó mRNA de IFN γ e IL-2¹⁹.

En un estudio, por análisis de microarreglos de DNA obtenido de células mononucleares de sangre periférica, se encontró una menor expresión, con respecto a sujetos control, de los genes específicos para la diferenciación de las células T CD4+ hacia un perfil Th1, por ejemplo *tbx21* y *txk*²⁰. Esto coincide con lo reportado anteriormente en células mononucleares de sangre periférica activadas dónde se observó un incremento en la producción de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 5 (IL-5) que frecuentemente afectan a los pacientes, especialmente aquellos que están en la etapa eritrodérmica. También se han reportado diferencias entre las citocinas encontradas en las diferentes etapas de MF. Vowels et al demostraron la presencia del mRNA de IFN en los pacientes en etapa de placa con detección variable de IL-4 e IL-5 y en etapa de tumor, las dos últimas citocinas son siempre detectables²¹.

En análisis hechos por mRNA de lesiones de pacientes con MF se ha encontrado que hay niveles incrementados de IL-4 y bajos niveles de IFN γ ¹⁶. La disminución de la expresión de IFN γ y la dominancia de las citocinas Th2 podría contribuir a la

pérdida de la inmunovigilancia en las lesiones de MF, permitiendo así la progresión de la enfermedad hacia una etapa tumoral.

2.4.2. Antecedentes de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) se ha explorado la producción de citocinas en los linfocitos T CD4+ obtenidos de las biopsias de piel lesionada de pacientes con MF en etapa de placa. En este caso la técnica utilizada fue citometría de flujo con el propósito de detectar las citocinas directamente en los linfocitos T CD4+. Para esto se realizaron suspensiones celulares de las biopsias de piel lesionada y se cultivaron en presencia de activadores policlonales (Ionomicina y acetato de forbol miristato) y de inhibidores del transporte proteico. Los resultados obtenidos demuestran que en los pacientes en etapa de placa, el perfil dominante de células T cooperadoras en la dermis es de tipo Th1, ya que se encuentran mayor cantidad de linfocitos T CD4+ productores de IFN γ . De manera interesante, en la epidermis se puede observar una población de linfocitos grandes con morfología atípica que se han descrito en la bibliografía como linfocitos neoplásicos. Estos linfocitos producen IL-4 en estado basal y al activarlos producen tanto IFN γ como IL-4. Estos resultados indican fuertemente que las células con potencial fenotipo neoplásico producen constitutivamente IL-4 desde las etapas tempranas. En las etapas tardías, como los tumores, dónde las células neoplásicas se encuentran en grandes cantidades en la piel, esta producción de IL-4 podría llevar eventualmente a la inhibición de la respuesta Th1. Por lo que resulta esencial determinar cuál es perfil de diferenciación de linfocitos T CD4 en las etapas tardías de la enfermedad.

Por lo tanto, en este trabajo exploramos el perfil de diferenciación de linfocitos Th1 o Th2, a través de las citocinas IFN γ e IL-4 en biopsias de pacientes con MF en diferentes etapas de la enfermedad. También estudiamos la expresión del factor de transcripción YY1 como posible candidato en la regulación de esta diferenciación, ya que es importante determinar el perfil de diferenciación que se da en las diferentes etapas de la enfermedad y también es importante poder determinar el mecanismo por el que se está llevando a cabo dicha diferenciación, para así entender la fisiopatología de la enfermedad y poder utilizar alguna estrategia terapéutica específica.

3. JUSTIFICACIÓN

La micosis fungoide es una neoplasia de linfocitos T CD4+ que se localizan principalmente en la epidermis. En esta enfermedad se presentan lesiones cutáneas que progresan lentamente por lo que es probable que el sistema inmune tenga un papel importante en el control de la neoplasia. Los linfocitos T cooperadores tienen un rol esencial en la respuesta contra tumores. Sin embargo, en la actualidad no existe un consenso sobre el tipo de respuesta de los linfocitos T cooperadores en las lesiones de pacientes con MF. Antecedentes directos del laboratorio demostraron la presencia en epidermis de linfocitos grandes atípicos, probablemente transformados, que producen IL-4 en etapas tempranas de MF. Estas células podrían ser las responsables del cambio en la respuesta propuesto en MF.

Por otro lado se ha demostrado el factor de transcripción YY1 se sobre-expresa en algunos tipos de neoplasias y media diversas funciones carcinogénicas; así como también YY1 es necesario para la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia un perfil Th2.

Por lo que es importante conocer el tipo de respuesta inmunitaria en las lesiones de pacientes con MF durante la progresión de la neoplasia, así como también es necesario conocer que moléculas podrían estar modulando los cambios en la respuesta inmune en las diferentes etapas de la enfermedad. Por lo tanto, nosotros exploramos la expresión de IFN γ , IL-4 y YY1 en biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con micosis fungoide en las diferentes etapas de la enfermedad para demostrar el perfil de respuesta dominante en las diferentes

etapas de la enfermedad y si YY1 se encuentra regulando el perfil de los linfocitos en MF.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de diferenciación dominante de los linfocitos T cooperadores durante la progresión de micosis fungoide y la posible relación de esta diferenciación con la expresión del factor de transcripción Yin Yang-1 (YY1).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la expresión de las citocinas IL-4, IFN γ en cortes histológicos de biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con MF en las diferentes etapas de la enfermedad.
- Determinar la expresión del factor de transcripción YY1 en cortes histológicos de biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con MF y su relación con la progresión de la enfermedad.
- Evaluar la relación en la expresión del factor YY1 con la expresión de las citocinas IL-4 e IFN γ .

5. HIPÓTESIS

La respuesta dominante en las lesiones cutáneas de micosis fungoide durante la progresión será de tipo Th2 y esta respuesta estará regulada por la expresión de YY1

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron cortes histológicos de biopsias de piel de pacientes con MF en diferentes etapas de la enfermedad; placa, eritrodermia y tumor. Los pacientes que fueron provenientes del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua se encontraban en la etapa inicial de la enfermedad, del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI se obtuvieron los tejidos incluidos en bloques de parafina de la etapa de tumor, y piel remanente de cirugía de individuos sin patología cutánea del servicio de gastrocirugía del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que fueron utilizados como controles en los experimentos realizados. Es importante mencionar que a cada uno de los individuos que participaron en el estudio se les informó acerca de todas las cuestiones referentes a la utilización de sus biopsias de piel y ellos dieron su consentimiento para participar en dicho estudio y firmaron una carta de consentimiento.

Previo a realizar el ensayo inmunohistoquímico en los cortes histológicos de tejido cutáneo, se realizaron ensayos para estandarizar los anticuerpos anti-YY1, anti-IL4 y anti-IFN γ , y conocer la concentración de anticuerpo a la cual se iba a trabajar.

6.1. Técnica de inmunohistoquímica

Los cortes histológicos se desparafinaron en un horno a 60 °C durante 30 minutos; después se procedió a hidratar la muestra con 2 baños en xilol, 1 baño en etanol a 100%, un baño en etanol a 90%, un baño en etanol a 70% y un baño en agua

destilada. Posteriormente se realizó la recuperación de epítopes colocando las laminillas en vasos coplin con citrato de sodio; previamente calentado, en ebullición por 20 min. Concluida la recuperación de epítopes las laminillas se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar el exceso de citrato. Después se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno en metanol a 3% por 15 min y nuevamente se lavaron con PBS. Se bloqueó la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido incubándolo 40 minutos en suero normal de cerdo a 2% utilizando una cámara húmeda. Posteriormente, los tejidos se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-YY1 (1:750), anti-IL-4 (1:250) y anti-IFN γ (1:250) (anticuerpo primario). Al día siguiente se lavaron los tejidos con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (link universal; coctel de anticuerpos biotinilados anti-ratón, anti-conejo) en cámara húmeda durante 30 minutos y en seguida se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano, en cámara húmeda por 30 minutos. Posterior a esto, se procedió a revelar mediante la adición del cromógeno diamino-benzidina (DAB); la reacción se detuvo con agua de la llave y, para el contraste, fue teñida con hematoxilina. Finalmente, el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xilol en baños de 2 minutos cada uno. Las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

6.2. Análisis de imágenes

Se capturaron microfotografías de cada uno de los pacientes y sujetos control, utilizando un microscopio (Olympus, BX-40) y se analizó la IOD en un área

determinada de varias microfotografías de cada paciente y controles utilizando un analizador de imágenes con el programa Image-Pro Plus.

6.3. Análisis estadístico

Los datos de IOD se procesaron utilizando el programa estadístico Prisma 5. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas del análisis de las microfotografías de cada paciente. El comportamiento de los datos se analizó con una prueba de D'Agostino y Pearson para verificar la distribución normal de los datos. La evaluación de la diferencia en la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas entre los grupos de pacientes pertenecientes a las diferentes etapas de la enfermedad se realizó mediante una prueba de Mann-Whitney. Para establecer la correlación de los diversos parámetros estudiados se realizó el análisis de Pearson. Un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado significativo.

7. RESULTADOS

Tabla 1. Resumen de las características demográficas de los pacientes.

Total de pacientes	Sexo	Edad	Tiempo de evolución (años)	Superficie corporal afectada (%)	Frecuencia del tipo de lesiones (%)	
N=39	M= 19 (49%)	(9 – 85 años) Promedio 46.3 años	(2 meses – 60 años) Promedio 9.2 años	(8.5 – 100%) Promedio 59.7 %	Placa	74.3 % (29)
	F= 20 (51%)				Eritrodermia	12.8 % (5)
					Tumor	12.8 % (5)

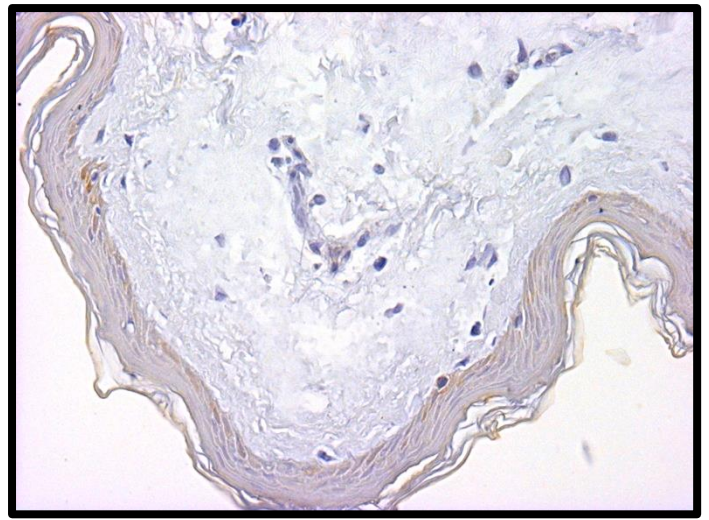
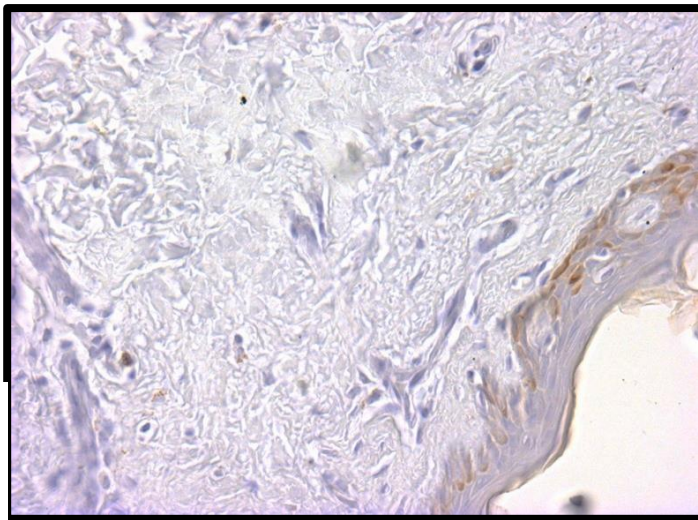
En la tabla 1 se puede observar que en los pacientes reclutados con MF la incidencia de la enfermedad entre hombres y mujeres es similar. Esto coincide con lo reportado en otros países. También se puede observar que la edad de los pacientes es muy variable y existen pacientes menores de edad. La edad promedio de MF en Estados Unidos es de 65 años, lo que sugiere la edad predominante en México puede ser diferente de otros países²⁶. También se puede observar que la MF es una enfermedad de progresión lenta en la cual los pacientes tienen tiempos de evolución muy largos, con un promedio de 9.2 años, aunque se puede observar que hay pacientes con una evolución de 60 años.

Para determinar el tipo de respuesta inmune en las lesiones cutáneas de pacientes con MF decidimos determinar la expresión por inmunohistoquímica de las citocinas dominantes del perfil: para Th1; IFN γ y la IL-4 para el perfil Th2, en biopsias de piel lesionada de pacientes.

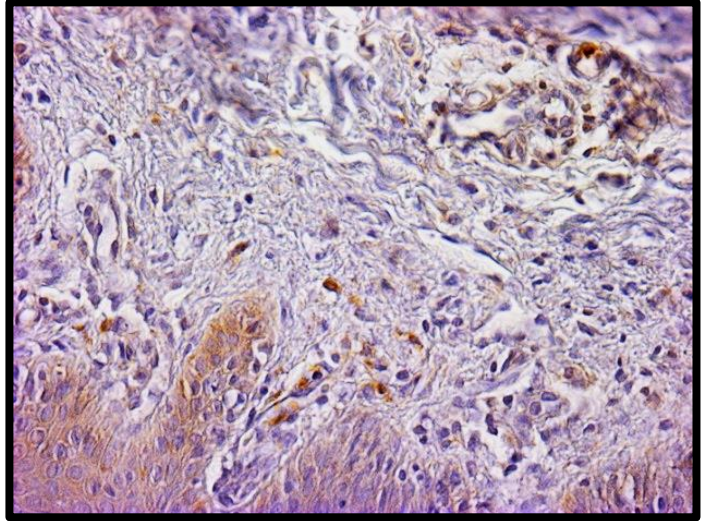
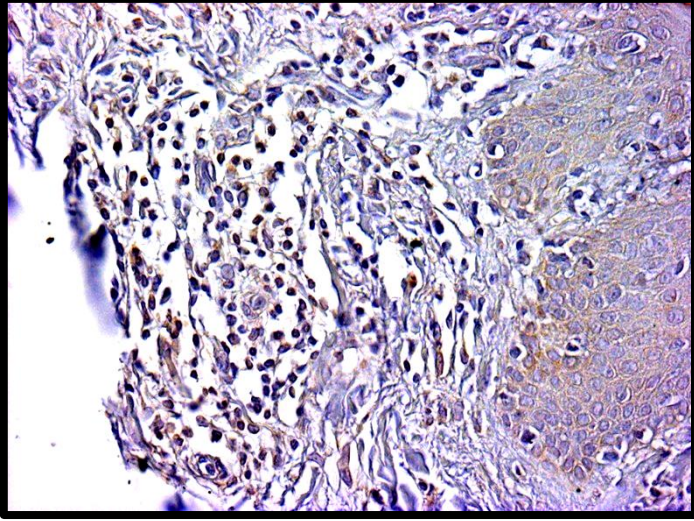
7.1. Expresión de IFN γ en lesiones cutáneas y tejidos de piel control

En primer lugar, se decidió analizar la expresión de citocinas en las biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con MF. En la figura 2 se muestran microfotografías representativas de la tinción para IFN γ en tejidos cutáneos de pacientes en las etapas de placa, eritrodermia y tumor, y en piel de individuos sin patología cutánea que fue tomada como control. Se puede observar que la expresión de esta citocina se localiza predominantemente en los infiltrados inflamatorios de las lesiones. También, se puede apreciar una disminución de la expresión de IFN γ conforme progresa la enfermedad, observando una mayor cantidad de células IFN γ + en la etapa de placa y en la etapa de tumor una menor cantidad de células positivas para esta citocina. En la figura 3 se observan los resultados de la cuantificación de la densidad de expresión de IFN γ en los tejidos de pacientes en las diferentes etapas de la enfermedad y de individuos sin patología cutánea. El resultado del análisis estadístico muestra menor expresión de IFN γ en la etapa de tumor y tejido control con respecto a la fase de placa.

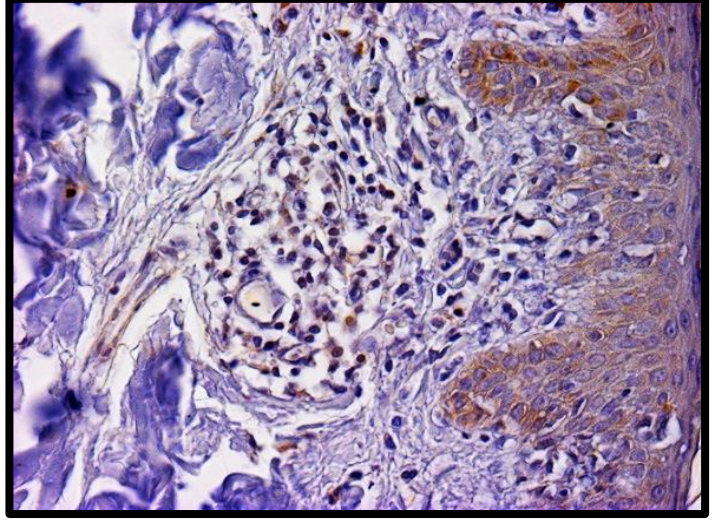
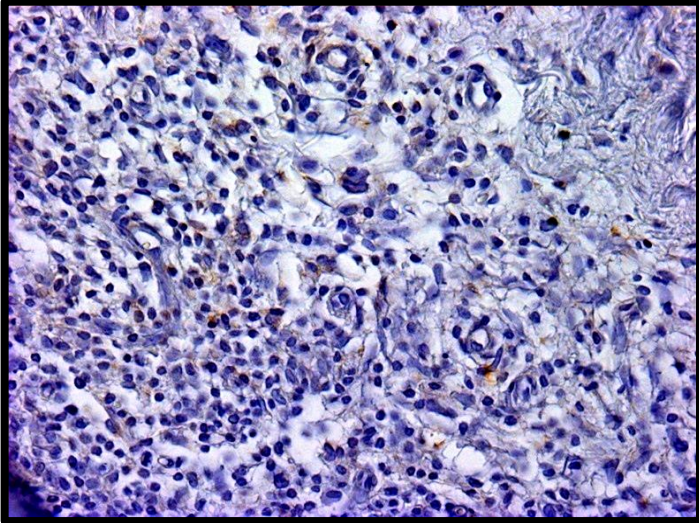
Control



Placa



Eritrodermia



Tumor

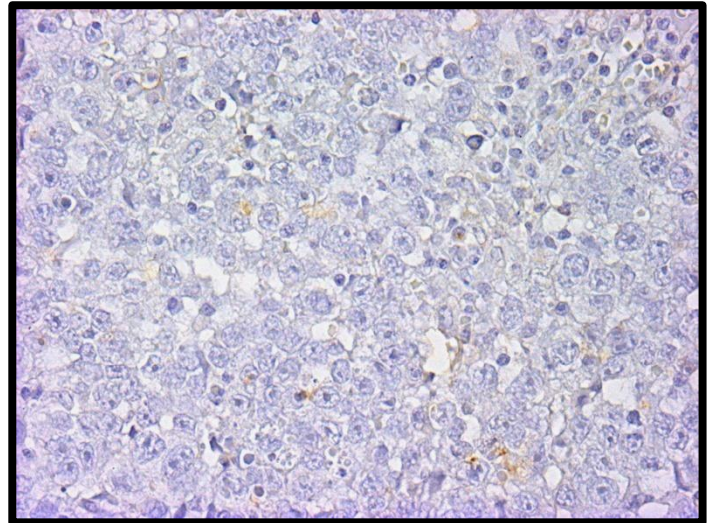
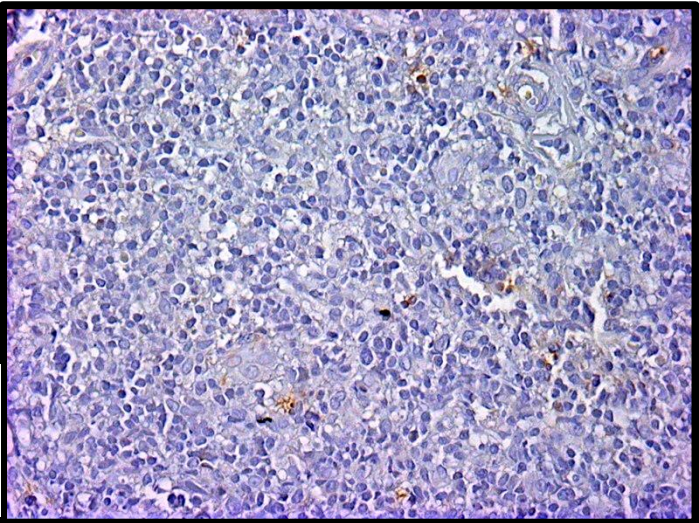


Figura 2. **Expresión de IFN γ en lesiones cutáneas de pacientes con MF en diferentes etapas.** Se muestran microfotografías representativas de la tinción para IFN γ en pacientes con MF y tejidos cutáneos control. Imágenes observadas a un aumento de 40X.

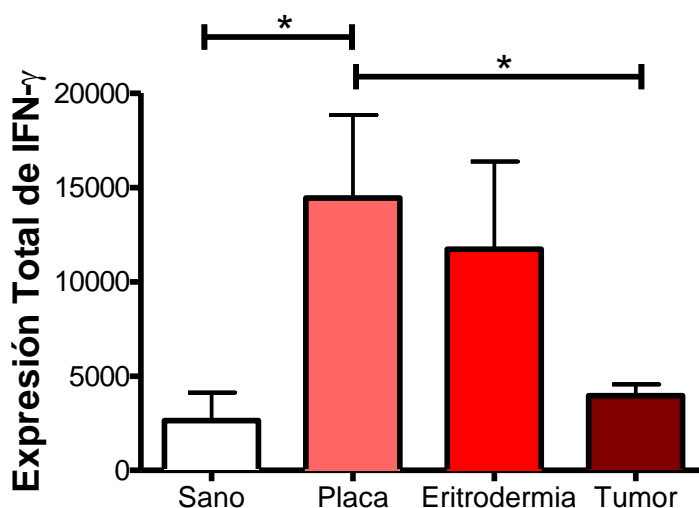


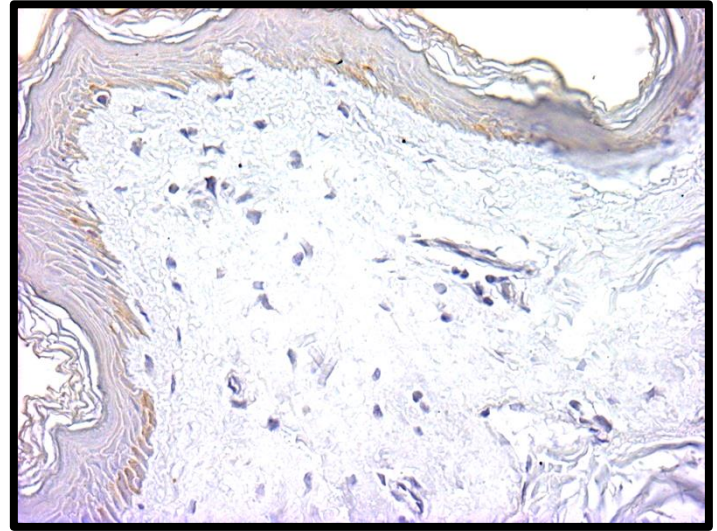
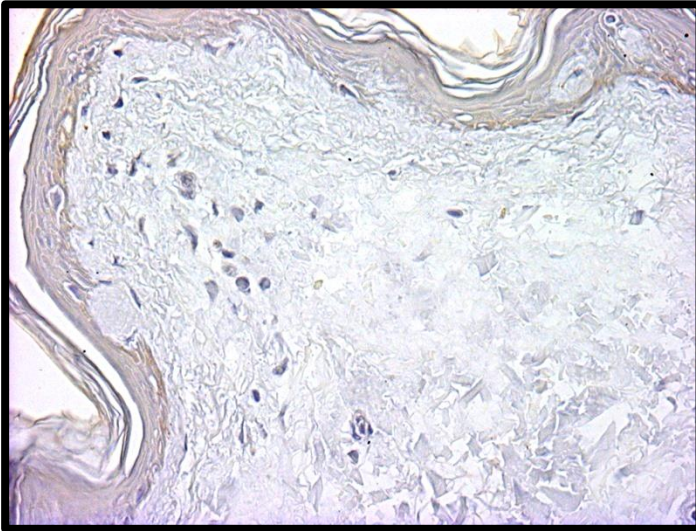
Figura 3. Cuantificación de la expresión total de IFN- γ en la epidermis y dermis de las microfotografías de tejidos de piel control (blanco, n=10) y lesiones de MF (rojo) en etapa de placa (n=27), eritrodermia (n=7) y tumor (n=5).

7.2. Expresión de IL-4 en lesiones cutáneas y tejidos control

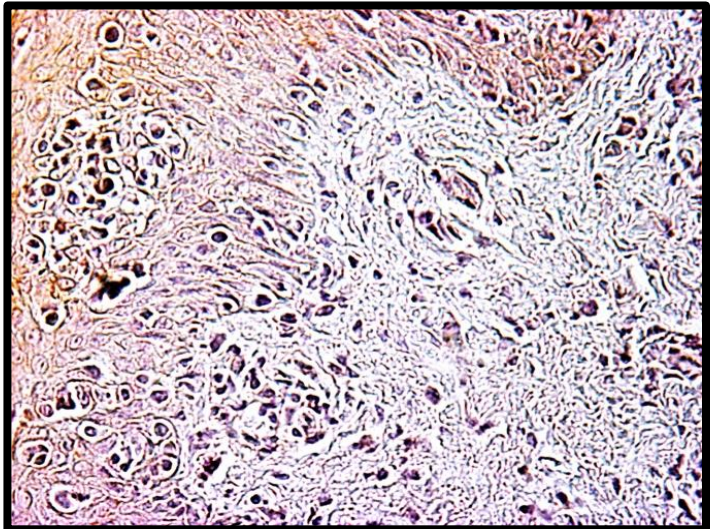
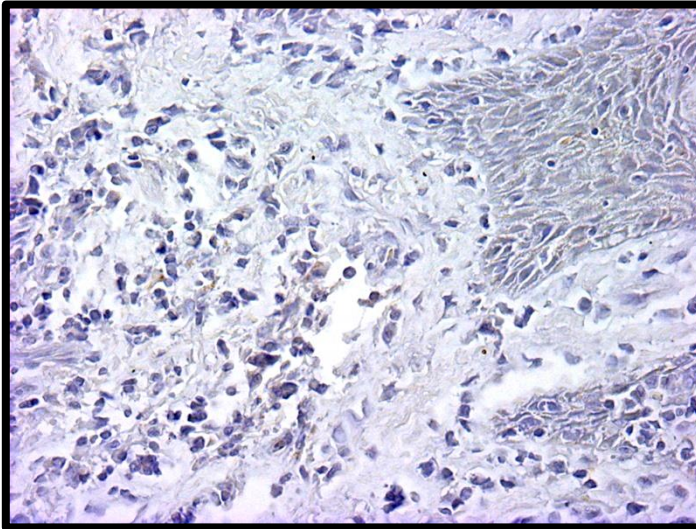
Para evaluar la respuesta de tipo Th2 en las diferentes etapas de MF, se cuantificó la expresión de IL-4. La figura 4 muestra las microfotografías representativas de la evaluación de la expresión de IL-4. En la tinción para IL-4 se puede observar que la expresión de IL-4 aumenta conforme progresa la enfermedad, pudiendo observar una mayor cantidad de células IL-4+ tanto en la dermis como en la epidermis y siendo menor la cantidad de células positivas para dicha molécula en la etapa de placa. También se puede observar que la expresión de IL-4, se da en las células que tienen una morfología neoplásica, grandes y de núcleos

irregulares. En la figura 5 se muestran los resultados del análisis estadístico que resultado de la tinción para IL-4 y donde se observa un aumento significativo en la expresión de dicha citocina en la etapa de tumor con respecto a la fase de placa y con respecto a los tejidos control.

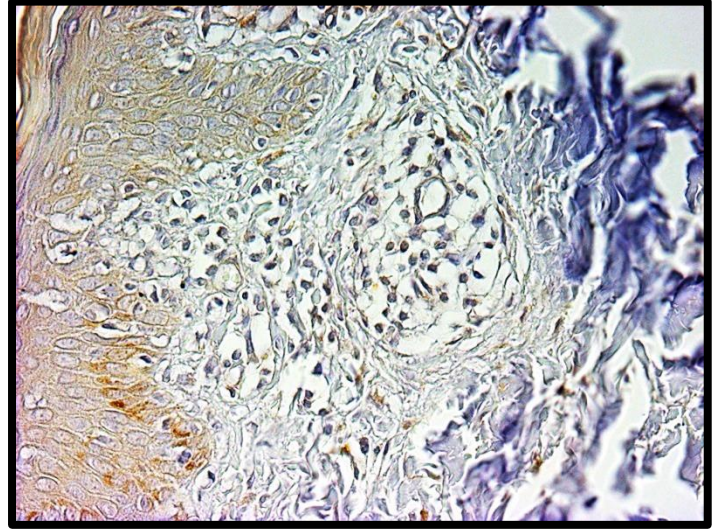
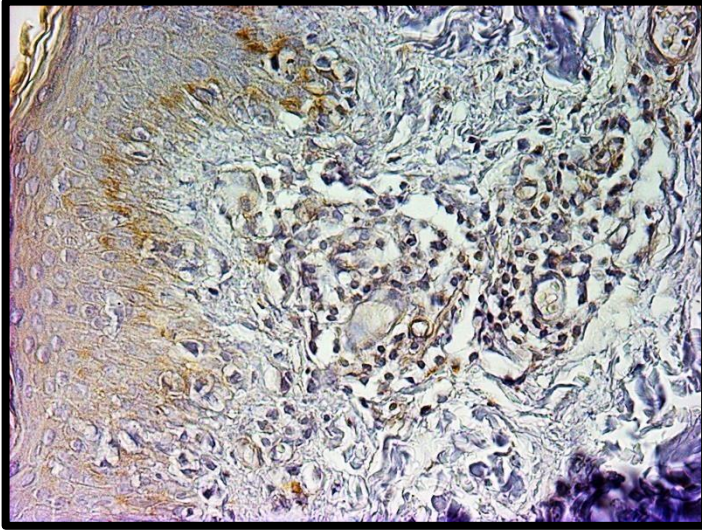
Control



Placa



Eritrodermia



Tumor

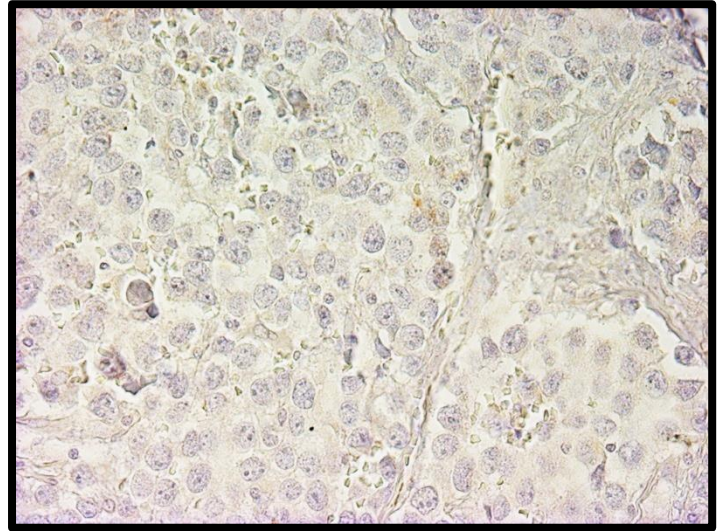
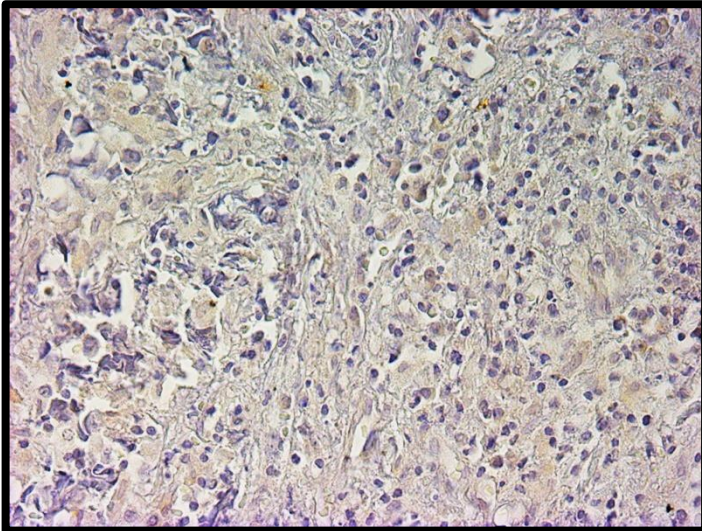


Figura 4. Expresión de IL-4 en lesiones cutáneas de pacientes con MF en diferentes etapas. Se muestran microfotografías representativas de la tinción para IL-4 en pacientes con MF y tejidos cutáneos control. Imágenes observadas a un aumento de 40X.

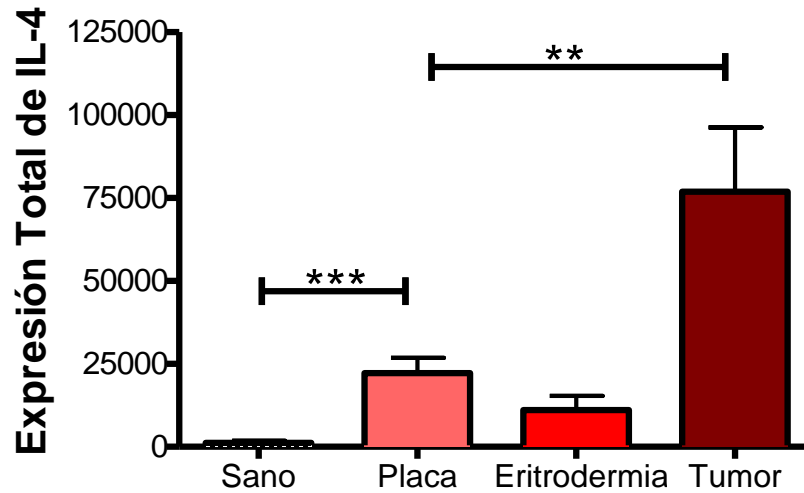


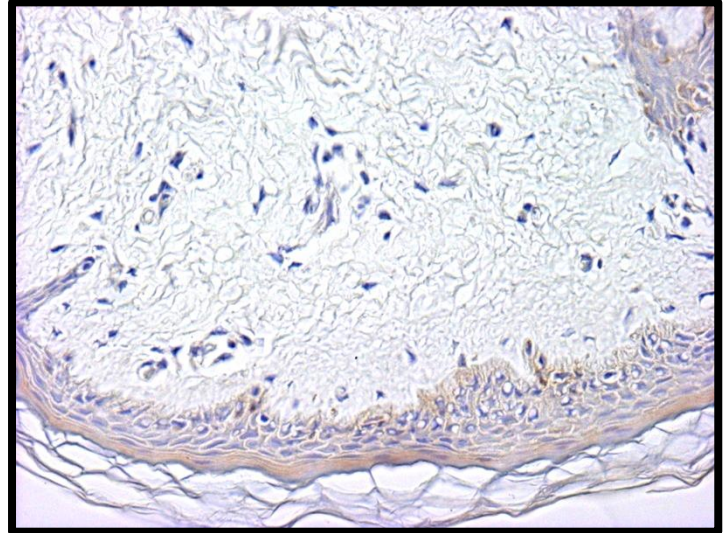
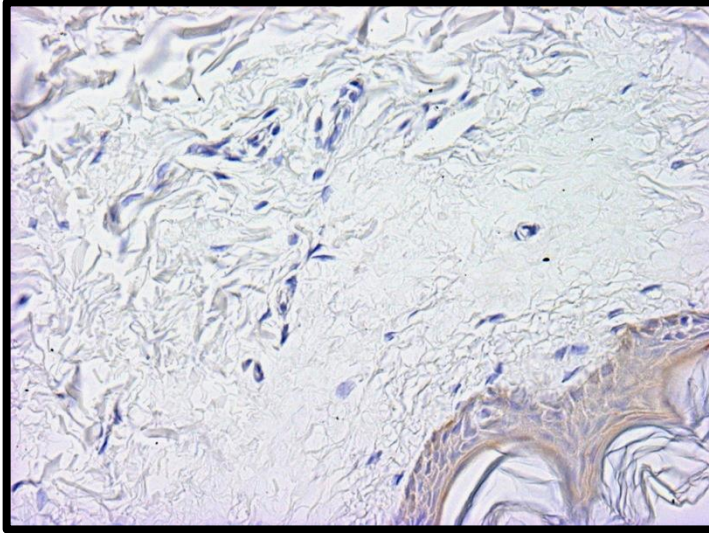
Figura 5. Cuantificación la expresión total de IL-4 en la epidermis y dermis de las microfotografías de tejidos de piel control (blanco, n=10) y lesiones de MF (rojo) en etapa de placa (n=27), eritrodermia (n=7) y tumor (n=5).

7.3. Expresión del factor de transcripción Yin Yang-1 en lesiones cutáneas y tejidos de piel control

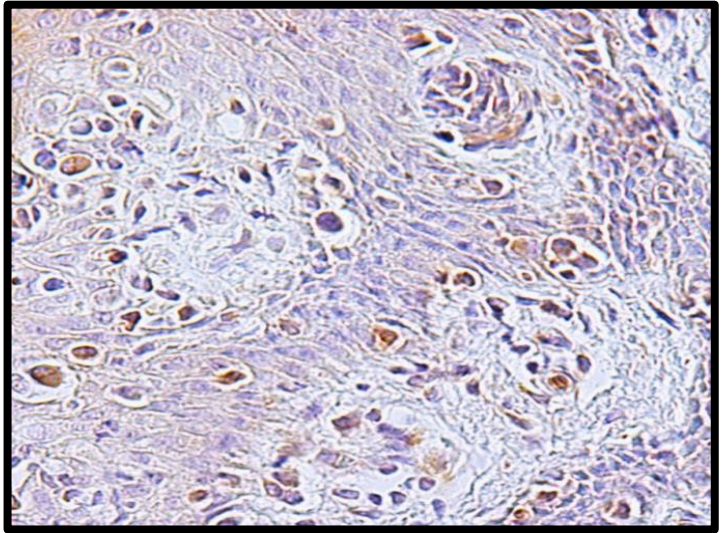
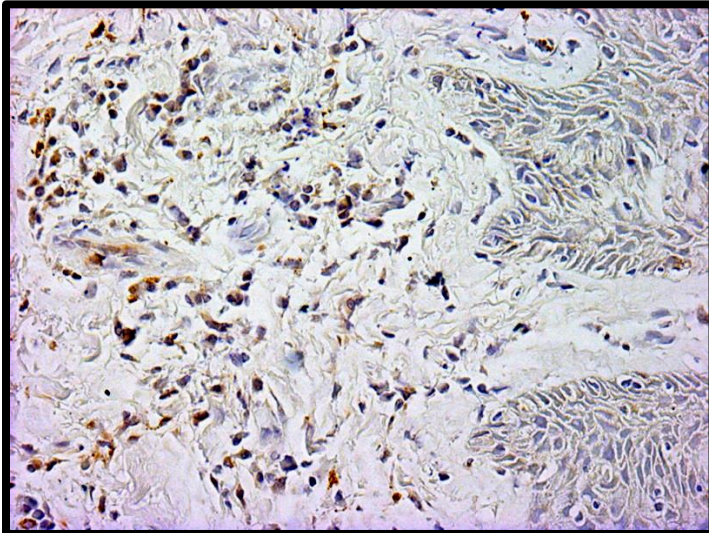
Después de que se observó que había un cambio de perfil dominante en la expresión de citocinas, de un perfil Th1 en etapas tempranas a un perfil Th2 en etapas tardías, se analizó la expresión de YY1 debido a que es un factor que se sobre-expresa en neoplasias y media diferentes funciones carcinogénicas, así como también porque es necesario para la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia un perfil Th2. La figura 6 muestra las microfotografías representativas de la evaluación de la expresión de YY1. Se puede observar que la expresión de dicho factor aumenta conforme progresa la enfermedad, pudiendo observar una mayor cantidad de células YY1+ en la dermis y en la epidermis y siendo menor la cantidad de células positivas en la etapa de placa. En la figura 7 se muestra el resultado de la cuantificación de la densidad de expresión de YY1 y el análisis estadístico nos indica que existe una diferencia significativa en la expresión de

YY1, hubo mayor expresión de dicho factor en las lesiones de tumor con respecto a la fase de placa de la enfermedad.

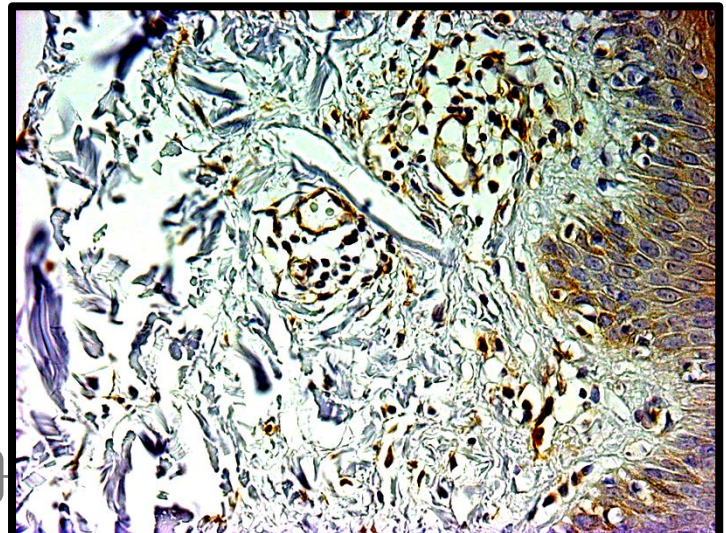
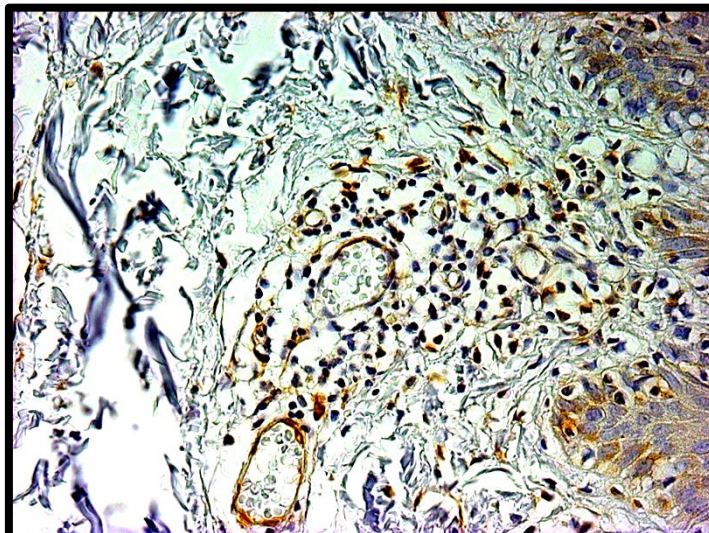
Control



Placa



Eritrodermia



Tumor

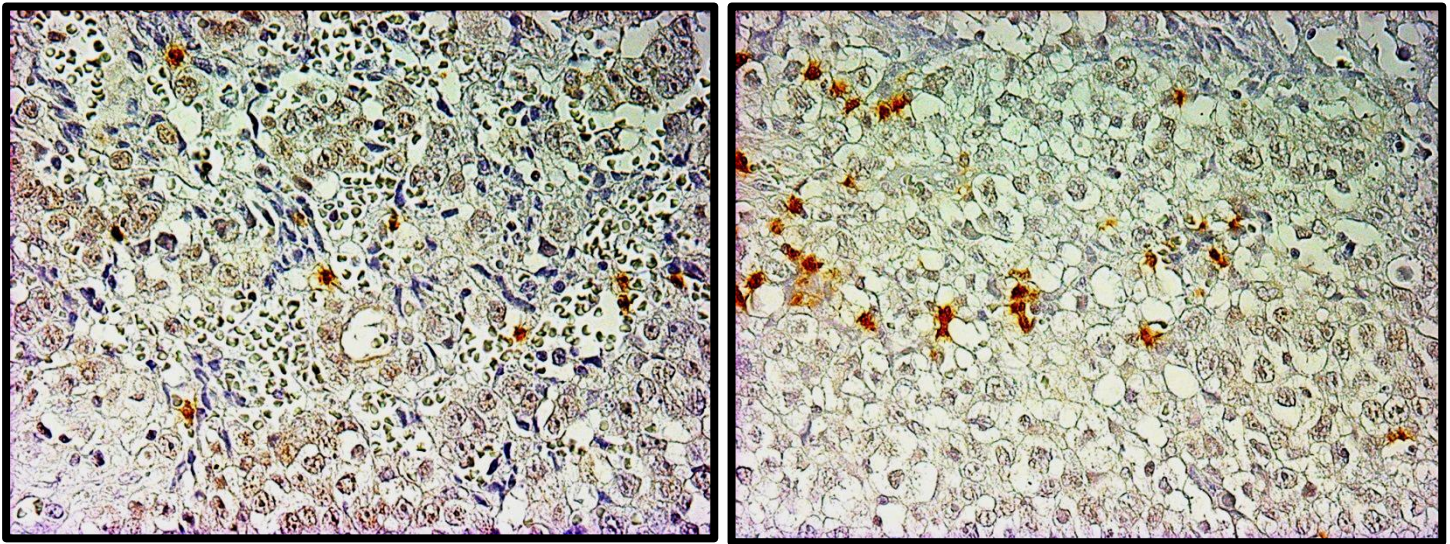


Figura 6. **Expresión de YY1 en lesiones cutáneas de pacientes con MF en diferentes etapas.** Se muestran microfotografías representativas de la tinción para YY1 en pacientes con MF y tejidos cutáneos control. Imágenes observadas a un aumento de 40X.

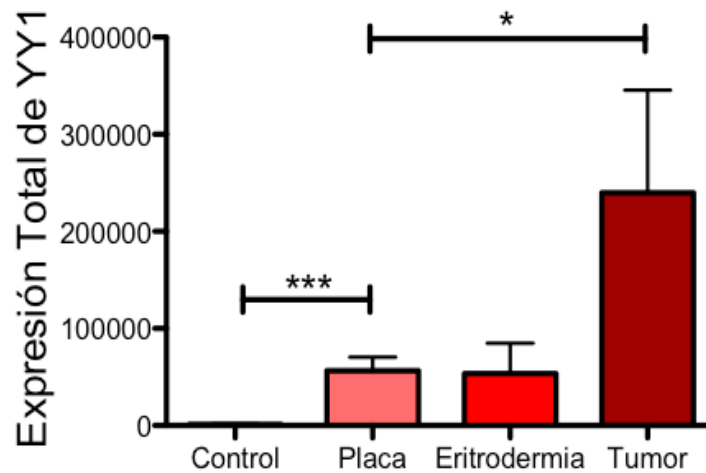


Figura 7. Cuantificación de la expresión total de YY1 en la epidermis y dermis en las microfotografías de tejidos de piel control (blanco, n=10) y lesiones de MF (rojo) en etapa de placa (n=27), eritrodermia (n=7) y tumor (n=5).

7.4. Expresión de YY1 e IL-4 por la misma célula

Los resultados anteriores señalan que la expresión tanto de IL-4 como de YY1 aumenta conforme progresa la enfermedad, siendo mayor en la etapa tumoral. Anteriormente se había mencionado que YY1 puede favorecer la respuesta Th2, promoviendo la transcripción de citocinas como IL-4. Como primer acercamiento para determinar si éste factor podría estar regulando la expresión de IL-4 en las lesiones de pacientes con MF, determinamos la expresión de ambas moléculas por medio de inmunohistoquímica doble. La figura 8 muestra una microfotografía representativa de la tinción doble para YY1 e IL-4, en pacientes en la fase de tumor de la enfermedad. Se puede observar que las células presentan una morfología atípica lo cual indica que se pueden tratar de linfocitos T neoplásicos. También se pueden observar células atípicas dobles positivas, que expresan YY1 (café) y también expresan IL-4 (rojo), por lo cual, dichas células se ven en color marrón.

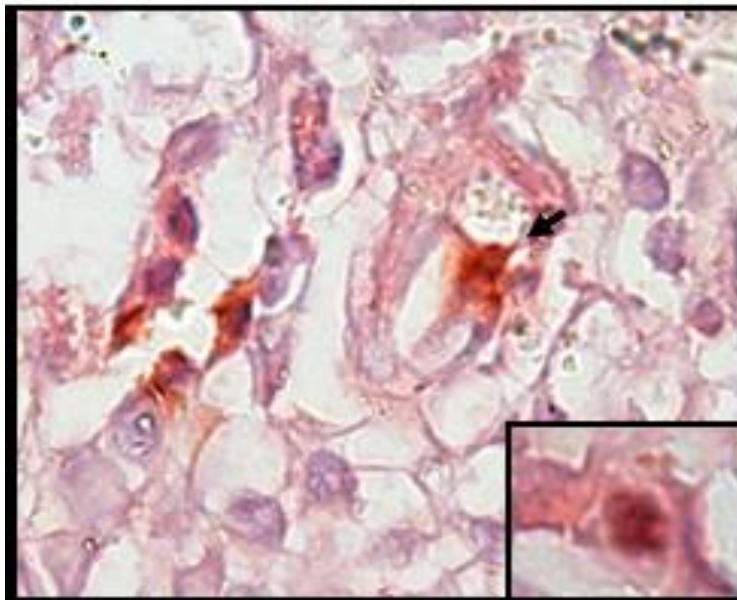


Figura 8. Microfotografía representativa de la tinción doble para YY1 (café) e IL-4 (rojo). La flecha indica células doble positivas. Imágenes observadas a un aumento de 100X.

7.5. Correlación entre la expresión de YY1 y la expresión de IL-4.

Ya que YY1 e IL-4 se expresan en la misma célula, dicho factor de transcripción podría estar favoreciendo la expresión de IL-4. Para fortalecer este hallazgo, determinamos la relación entre estas dos moléculas en los pacientes con MF en las diferentes etapas. La figura 9 muestra el análisis de correlación entre la expresión total de YY1 y la expresión total de IL-4, pudiendo observar que hay una correlación positiva, estadísticamente significativa, lo cual nos indica que al incrementar la expresión del factor YY1, también incrementa la expresión de IL-4.

Los resultados anteriores confirman una dominancia de IFN γ y la presencia de células que presentan una morfología tumoral típica y las cuales producen predominantemente IL-4, en la etapa de tumor estas células predominan en las lesiones. Por otro lado YY1 se sobre-expresa en las lesiones de MF, siendo mayor su expresión en la etapa tumoral y dicha expresión correlaciona con la expresión de IL-4; lo que indica que el factor de transcripción YY1 podría estar regulando la expresión de estas citocinas y favoreciendo la respuesta Th2 en MF.

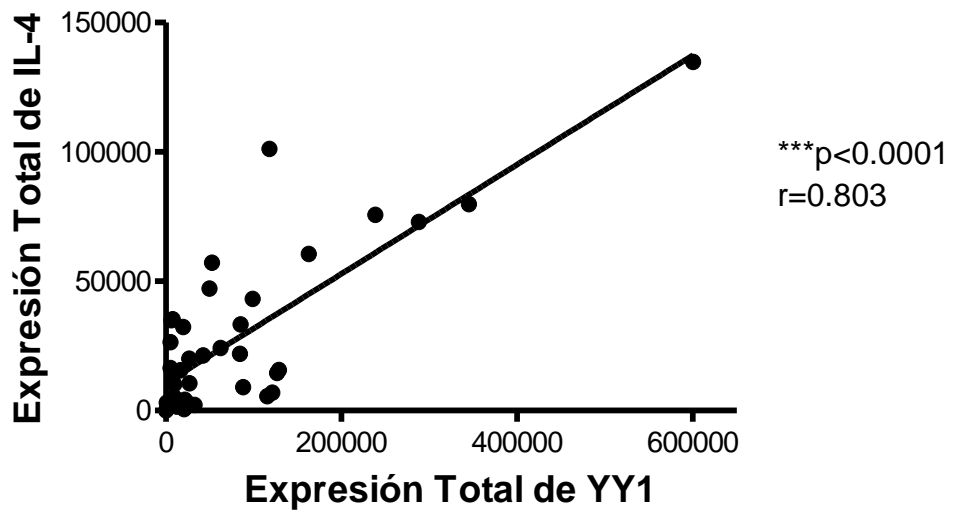


Figura 9. Análisis de la dispersión y correlación entre la expresión de YY1 y la IL-4 en la dermis de los pacientes con MF.

8. DISCUSIÓN

La micosis fungoide es una neoplasia de progresión lenta, ya que los pacientes pueden permanecer con lesiones en forma de placa de bajo grado durante meses o años antes de progresar a formas más avanzadas (tumores cutáneos). Esto indica fuertemente que existen mecanismos del sistema inmunitario que se encuentran controlando la progresión de la enfermedad. Una de las células efectoras inmunitarias que participan de manera importante en la inmunovigilancia contra tumores son los linfocitos T CD4+. En este trabajo se estudió la respuesta inmunitaria dominante durante las diferentes etapas de progresión de la enfermedad. Observamos una disminución en la expresión de IFN γ conforme progresa la enfermedad. Por otro lado observamos que tanto la expresión de IL-4 como del factor de transcripción YY1 aumenta con la progresión de la enfermedad. De manera destacada se encontró una correlación positiva entre YY1 e IL-4, lo que indica fuertemente que YY1 podría estar regulando la expresión de esta citocina.

Para el presente estudio se utilizaron tejidos parafinados de biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con MF en etapa de placa, eritrodermias generalizadas y tumores cutáneos. Encontramos que la expresión de IFN γ es mayor en la etapa de placa y disminuye en las etapas más progresivas de MF, y esto nos indica que en etapas iniciales de la enfermedad hay una dominancia del perfil Th1. Sin embargo, cabe mencionar que en el tejido puede haber otras células que pueden estar produciendo IFN γ . Esto coincide con los estudios de mRNA realizados por Vowels et al, en los cuales en etapas tempranas de la enfermedad hay un aumento en la

expresión de IFN γ y por lo tanto una dominancia de linfocitos Th1; es importante decir que el estudio antes mencionado se realizó en biopsias de piel lesionada de pacientes con MF. Y por otro lado, los resultados antes descritos contrastan con lo que se había reportado por análisis por ELISA, en donde no hay un perfil dominante de células T y se puede detectar tanto IFN γ como IL-4. (Harwix, *et al*). Dicha expresión de IFN γ se da en los infiltrados linfocíticos lo que apoya que podría ser una respuesta reactiva a la neoplasia. También es posible que la dominancia de este tipo de respuesta sea responsable de que los pacientes que se encuentran en la fase de placa puedan permanecer por años sin progresar a las etapas más avanzadas de la enfermedad.

Los resultados coinciden también con resultados previos de la UIMIQ en los que se obtuvieron células de la piel de pacientes en etapas tempranas y se activaron *ex vivo*. Al activar se observó una mayor frecuencia de linfocitos T CD4+ que producen IFN γ en la dermis. El IFN γ que nosotros detectamos en las lesiones puede provenir de estos linfocitos, sin embargo es probable que también otras células, como CD8 o NK, se encuentren produciendo esta citocina. Por otro lado, en la epidermis se detectaron linfocitos neoplásicos que producen IL-4 constitutivamente. Estos resultados sostienen que el perfil dominante en etapa temprana es Th1. Sin embargo aún no se había realizado un estudio robusto en el que se estudiaran estas citocinas en etapas avanzadas de MF y se compararan con las etapas tempranas.

En este trabajo se encontró que hay un aumento en la expresión de IL-4 conforme progresa la enfermedad. Lo anterior descrito, concuerda con lo que está reportado

en la literatura, en dónde se detecta IL-4 en tumores, (Vowels, *et al*); cabe mencionar que estos estudios se hicieron por análisis de mRNA.

Es importante mencionar que las células productoras de IL-4, son células neoplásicas con morfología atípica, lo que concuerda con los antecedentes del laboratorio donde se observó en etapas tempranas de la enfermedad la producción de IL-4 en linfocitos T CD4+. Por lo que es posible que en la etapa de tumor, estas células sean las predominantes en las lesiones y provoque que la respuesta dominante sea Th2.

Además se observó que la expresión de YY1 aumenta conforme progresa la enfermedad. Esto puede estar relacionado con lo que se ha reportado en otras neoplasias donde YY1 media funciones carcinogénicas, lo que permite que las células tumorales proliferen de manera descontrolada, sean resistentes a estímulos apoptóticos, entre otras características (Gordon, *et al*). Por lo tanto, la sobre-expresión de YY1 en MF podría estar regulando funciones que favorecen la neoplasia, como se ha reportado en un linfoma de células B, en el cual la sobre-expresión de YY1 se ha asociado con la transformación de las células B y la progresión de la enfermedad en dicho linfoma²³.

También se demostró por medio de inmunohistoquímicas dobles, que en la célula que se expresa YY1 también se detecta la expresión de IL-4 y dichas células son de morfología anormal, de gran tamaño y con núcleos irregulares. Está reportado que YY1 se sobre-expresa en neoplasias y está asociado con la progresión de la enfermedad y la transformación celular. Por otro lado, se ha demostrado que YY1

es un factor de transcripción importante para la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia un perfil Th2, debido a que genera interacciones intracromosomales y remodelación de la cromatina en el locus de citocinas Th2, así como también por el reclutamiento del factor de transcripción GATA-3 en el locus Th2¹². Por lo tanto, este resultado indicaría que YY1 podría estar regulando la diferenciación hacia un perfil Th2 que se observa al progresar la enfermedad.

Un resultado contundente que indica que YY1 pudiera estar mediando dicho cambio de perfil, es en donde la expresión total de YY1 correlaciona de manera positiva y significativamente con la expresión de IL-4 al progresar la enfermedad. Además se ha reportado que YY1 suprime la expresión de IFN γ al inhibir la unión de AP-1 al promotor de IFN γ ²⁴. Esto apoya la evidencia encontrada de que al aumentar la expresión de YY1, aumenta la de IL-4 pero no así la de IFN γ . Sin embargo en este trabajo no se encontró relación entre la expresión de YY1 e IFN γ . Esto se puede deber a que como se había mencionado, es posible que otras células se encuentren expresando esta citocina en etapas tempranas. Además, el aumento en la producción de IL-4 en etapas avanzadas podría estar inhibiendo directamente la respuesta Th1, como parte de los mecanismos de evasión tumoral⁸.

Con los resultados anteriores se confirma que en las lesiones cutáneas de pacientes con MF hay un cambio de respuesta de Th1 a Th2 al progresar la enfermedad y se propone que el factor de transcripción YY1 pudiera ser el responsable de dicho cambio de perfil. Lo cual es importante porque la producción deficiente de IFN γ y la dominancia de citocinas Th2 pudiera ser la responsable de

la pérdida de la inmunovigilancia en lesiones de MF, permitiendo la progresión del tumor.

Estos hallazgos podrían ser útiles para que en un futuro se pueda desarrollar una estrategia dirigida hacia el factor YY1 como un marcador de progresión de la enfermedad o como blanco terapéutico.

9. CONCLUSIONES

- En etapas tempranas de MF se detectó un perfil mixto de citosinas, mediante la expresión de IFN γ y de IL-4. La expresión de IFN γ se observó principalmente en los infiltrados linfocitarios y la expresión de IL-4 se observó en las células grandes atípicas con morfología anormal. Por lo que la respuesta Th1 se encuentra controlando la progresión de la enfermedad, ya que favorece la respuesta inmunitaria antitumoral y la respuesta Th2 provoca una pérdida de la inmunovigilancia, debido a que se inhibe la respuesta Th1, lo que provoca que la enfermedad progrese a etapas avanzadas y se asocie con un mal pronóstico.
- Hay un aumento en la expresión de YY1 conforme progresa la enfermedad y esta expresión correlaciona de manera positiva con la expresión de IL-4, por lo que YY1 podría estar favoreciendo la expresión de esta citocina en las células neoplásicas.
- En lesiones cutáneas de MF, las células productoras de IL-4 predominan en la progresión a la fase tumoral de la enfermedad, dicho predominio está favorecido por la expresión de YY1, por lo tanto proponemos al factor YY1 como posible responsable del cambio de respuesta en la progresión de pacientes con MF.
- Proponemos a YY1 como potencial marcador de progresión y/o blanco terapéutico para este linfoma

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Nestle, F. O., Paola D. M., Jian, Z. Q., Brian, J. N. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 679-90. 2009

3. Di Meglio, P., Perera, G., & Nestle, F. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity*, 35(6), 857-69. 2011

4. Book, Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier Saunders. 7ª edición. 203-24. 2012

6. Dunn, G. P., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*. 6(11), 836-48. 2006

8. Visser, K., E., Eichten, A., Coussens, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*. 6(1), 24-37. 2006

10. Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H., Bonavida, B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*. 25(8), 1125-42. 2006

11. Zhang, Q., Stovall, D. B., Inoue, K., Sui, G. The oncogenic role of YY1. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 16 (3-4), 163-97. 2011

12. Hwang, S., Kim, Y., Lee, S., Jang, S. Transcription factor YY1 is essential for regulation of the Th2 cytokine locus and for Th2 cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110 (1), 276-81. 2013

13. Girardi, M., Heald, P., Wilson, L. The pathogenesis of mycosis fungoides. *New England Journal of Medicine*. 350 (19), 1978-88. 2004
14. Neish, C., Charlry, M., Jegasothy, B., Tharp, M., Deng, J. S. Proliferation cell nuclear antigen and soluble interleukin 2 receptor levels in cutaneous T cell lymphoma: correlation with advanced clinical diseases. *Journal of Dermatology Science*. 8 (1), 11-7. 1994
15. Brender, C., Nielsen, M., Kaltoft, K., Mikkelsen, G., Zhang, Q., Wasik, M., Billestrup, N., Odum, N. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 97 (4), 1056-62. 2001
16. Papadavid, E., Economidou, J., Psarra, A., Kapsimali, V., Mantzana, V., Antoniou, C., Limas, K., Avgerinou, G., Katsambas, A. The relevance of peripheral blood T-helper 1 and 2 cytokine pattern in the evaluation of patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *British Journal of Dermatology*. 148 (4), 709-18. 2003.
17. Bagot, M., Nikolova, M., Schirm-Chabanette, F., Wechsler, J., Bousmell, L., Bensussan, A. Crosstalk between tumor T lymphocytes and reactive T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas. *Ann N Y Acad Sci*. 941, 31-8. 2001
18. Harwix, S., Zachmann, K., Neumann, C. T-cell clones from early stage cutaneous T-cell lymphoma show no polarized Th-1 or Th-2 cytokine profile. *Archives of Dermatology Research*. 292 (1), 1-8. 2000
19. Saed, G., Fivenson, D. P., Naidu, Y., Nickoloff, B. J. Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. *Journal of Investigative Dermatology*. 103 (1), 29-33. 1994

20. Hahtola, S., Tuomela, S., Elo, L., Häkkinen, T., Karenko, L., Nedoszytko, B., Ranki, A. Th1 response and cytotoxicity genes are down-regulated in cutaneous T-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 12 (16), 4812-21. 2006
21. Vowels, B. R., Lessin, S. R., Cassin, M., Jaworsky, C., Benoit, B., Wolfe, J. T., Rook, A. H. Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 103 (5), 669-73. 1994
23. Castellano, G., Torrisi, E., Ligresti, G., Nicoletti, F., Malaponte, G., Traval, S., McCubrey, J. A., Canevari, S., Libra, M. Yin Yang 1 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with B-cell transformation and tumor progression. *Cell cycle*. 9 (3), 557-63. 2010.
24. Ye, J., Cippitelli, M., Dorman, L., Ortaldo, J. R., Young, H. A. The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP1 binding and activation of a silencer element. *Molecular and cellular biology*. 16 (9), 4744-53. 1996.
25. Li, J. R., Li, J. G., Deng, G. H., Zhao, W. L., Dan, Y. J., Wang, Y. M., Chen, S. A common promoter variant of TBX21 is associated with allele specific binding to Yin-Yang 1 and reduced gene expression. *Scandinavian Journal of Immunology*. 73 (5). 449-58. 2011
26. Weinstock, M. A., Horm, J. W. Mycosis fungoides in the United States. Increasing incidence and descriptive epidemiology. *Journal of the American Medical Association*. 260 (1). 42-6. 1988