



**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 1 Y SU ASOCIACIÓN CON TGF- β EN UN MODELO
MURINO DE ASMA CON DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIOLÓGICO**

**PRESENTA:
GUADALUPE DÍAZ ELIZONDO**

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.



**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 1 Y SU
ASOCIACIÓN CON TGF- β EN UN MODELO MURINO DE ASMA CON
DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIOLÓGICO**

PRESENTA:

GUADALUPE DÍAZ ELIZONDO

Directora: Dra. Sara Huerta Yopez

Asesora: Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez

Lugar donde se realizó el proyecto:

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 por parte del IMSS (09B5 61 2800) y por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (48020).

Con agradecimiento...

Primeramente a Dios por haberme guiado en mi camino y haberme puesto en el lugar en donde estoy y por permitirme conocer a las personas que hasta el momento he tratado.

Con toda mi alma y corazón a mis padres y a mi hermanita, que gracias a Dios los tengo y les da la fuerza para apoyarme, comprenderme y tenerme paciencia, y que todavía continúan apoyándome en mis decisiones.

De corazón a la Dra. Sara por todo su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo; así como a la Dra. Martha Sánchez por su apoyo en la presentación de esta Tesis y quien fue el medio por el que conocí a mi directora de Tesis; y a mis asesoras que revisaron este trabajo.

INDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCION	6
MARCO TEORICO	
1. Historia	8
2. Epidemiología	9
3. Etiología	9
4. Patogenia	10
4.1 Linfocito T	11
4.1.1 Función del linfocito Th2 en la inducción y persistencia de la inflamación alérgica	11
4.2 Citocinas	12
4.2.1 Citocinas proinflamatorias	13
4.2.2 Citocinas antiinflamatorias	14
4.2.1 IL-10	14
4.2.2 TGF- β	14
4.3 Respuesta de fase temprana	15
4.4 Respuesta de fase tardía	16
5. Factor de transcripción YY1	20
5.1 Regulación de la transcripción mediada por YY1	22
5.2 Co activadores de YY1	25
5.3 Co represores de YY1	25
8. Relación entre TGF- β y YY1	26
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
HIPOTESIS	29
METODOLOGÍA	
1. Parte experimental con modelos de ratones Balb/c	30
2. Deshidratación y corte de tejidos	32
3. Inclusión del tejido en parafina	32
4. Corte en el microtomo	33

5. Preparación, estirado y confección de tejidos	33
6. Tinción con Hematoxilina-Eosina	33
7. Punteado de laminillas	33
8. Microarreglo de tejidos	34
9. Técnica de Inmunohistoquímica	35
10. Análisis morfométrico	36
11. Análisis estadístico	36
RESULTADOS	37
DISCUSION DE RESULTADOS	47
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO	53
ANEXO	
BIBLIOGRAFIA	

RESUMEN

El asma es un padecimiento que se caracteriza principalmente por la dificultad del paso de aire a través de las vías aéreas. La etiología no es clara aún, sin embargo se ha encontrado que los factores ambientales y genéticos influyen en su incidencia. Durante el proceso de esta enfermedad intervienen proteínas inflamatorias (quimiocinas) así como antiinflamatorias (la citocina TGF- β principalmente). En recientes estudios se ha encontrado que el promotor del gen de TGF- β posee sitios de unión para el factor de transcripción YY1, y en otros estudios se ha demostrado que el promotor de TGF- β al tener un polimorfismo en la posición C-509T, YY1 induce la sobreactivación de TGF- β . El propósito del presente trabajo fue informar los hallazgos encontrados en los ratones de la cepa BALB/c, como modelo de asma con diferentes grados de severidad de la enfermedad. Los ratones BALB/c con ovoalbúmina desarrollan respuesta alérgica, con ayuda además del adyuvante hidroxido de aluminio (alum). El grado de respuesta alérgica que presentan se observa mediante la preparación y tinción de los tejidos pulmonares obtenidos de esos animales. Los resultados del análisis de las tinciones en los microarreglos de tejidos mediante inmunohistoquímica muestran que, el factor de transcripción YY1 se encuentra elevado de manera significativa en el tejido pulmonar de los ratones que recibieron OVA como alérgeno, en comparación con los grupos control que solo recibieron SS; además de que la citocina TGF- β también está presente, mostrando que la relación entre la expresión de ambas proteínas es directa y sugiere que tienen influencia en la patogenia del asma.

INTRODUCCION

El asma es una compleja entidad caracterizada fisiológicamente por una obstrucción variable al flujo aéreo y patológicamente por múltiples anomalías 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.

En México es una de las 10 primeras causas de utilización de los servicios de salud, especialmente los de urgencias y de consulta externa ⁽²⁾.

Aún sin conocer con certeza la magnitud del problema, se puede decir que el asma representa una importante pérdida económica y de calidad de vida para los millones de pacientes que la sufren y para el sistema de salud. El asma se presenta en cualquier sexo, edad, o nivel socioeconómico, pero afecta mayormente a los niños con antecedentes de atopía (predisposición genética hacia algún alérgeno presente de forma inocua en el ambiente). La investigación biomédica ha facilitado avances importantes en el conocimiento de los mecanismos patogénicos del asma y ha dado lugar a avances terapéuticos que han tenido un impacto significativo en el manejo y control de la enfermedad. Sin embargo, el número de asmáticos continúa aumentando y no se ha eliminado una proporción de la incidencia y prevalencia de asma que corresponde a enfermedad grave y de difícil manejo.

La etiología del asma es compleja y multifactorial. Están involucradas interacciones entre los factores genéticos y los estímulos ambientales. 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, ocupación 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.

El asma es en su mejor definición un síndrome, con una vía común de daño y remodelación, cuya etiopatogenia incluye múltiples mecanismos. Durante el proceso de esta enfermedad intervienen proteínas inflamatorias (quimiocinas) así como antiinflamatorias (la citocina TGF- β principalmente). En recientes estudios se ha encontrado que el promotor del gen de TGF- β posee sitios de unión para el factor de transcripción YY1, y en otros, se ha demostrado que el promotor de TGF- β al tener un polimorfismo en la posición C-509T, YY1 induce la sobreactivación de TGF- β . Por lo tanto, es importante considerar si el factor de transcripción YY1 se encuentra en relación directa con el grado de severidad del asma y además, si existe alguna relación entre la expresión de la citocina TGF- β y el factor de transcripción YY1.

MARCO TEORICO

1. Historia

El conocimiento de los factores que podían explicar las manifestaciones asmáticas se fue acumulando gracias a las experiencias de varios autores. Friedrich Hoffmann, quien habló de los “miasmas” o rarefacciones del aire presentes en el momento en el cual los pacientes sufrían sus crisis asmáticas. Armand Trousseau (1801-1867) describió crisis asmáticas en pacientes después de estar expuestos a animales domésticos, acompañadas de otros síntomas como renorrea y lagrimeo, y su posterior alivio al emplear sustancias como el estramonio y la inhalación de diversos vapores de éter o nitrato de potasio. Charles Blackley (1820-1900) realizó experimentos con diferentes sustancias aromáticas orgánicas como el benceno y con diversos pólenes con los cuales consiguió provocar crisis asmáticas y rinitis alérgica. En muchos casos, observó que esta sintomatología ocurría frecuentemente en personas que vivían en ambientes rurales y de bajo nivel socioeconómicos, frecuentemente expuestas a estos estímulos. El término alergia fue acuñado por primera vez por el austriaco Clements von Pirquet, como un estado de hipersensibilidad que se desencadena por la exposición a una sustancia en particular y que las subsecuentes exposiciones a la misma sustancia podían suscitar sintomatología de una crisis asmática. El estudio de la gravedad de dichas exposiciones se reflejó en los experimentos de Charles Robert Richet y de Paul Portier, quienes reportaron reacciones alérgicas letales después de exponer animales de laboratorio a extractos de anémonas marinas ⁽³⁾. Estas reacciones las conocemos hoy en día como anafilácticas.

La estructura de la histamina fue descubierta en 1907 por Adolf Windaus y Kart Vogt y se develó su papel en la permeabilidad vascular y a la respuesta inflamatoria. Henry Hyde Salter (1823-1871) pudo describir las características microscópicas de las expectoraciones de los asmáticos, al encontrar numerosas células inflamatorias: los eosinófilos ⁽³⁾.

Posteriormente, sus características de coloración microscópicas y su papel en el sujeto asmático fueron estudiados por Paul Eherlich y Heinrich Curshmann, quien describió sus famosas espirales o “moldes” frecuentemente expectorados por los sujetos asmáticos los cuales, durante un tiempo, tuvieron importancia en el diagnóstico del asma bronquial.

2. Epidemiología

Los estudios epidemiológicos del asma demuestran una gran variabilidad geográfica entre diferentes países, con independencia de su nivel de desarrollo, y entre distintas poblaciones de un mismo país. Este aumento de la prevalencia ha sido más importante en los últimos 20 años, en especial en la población infantil, pero hasta ahora no hay suficientes datos que expliquen las posibles causas de este incremento, el porqué de las variaciones en las diferentes poblaciones, ni el impacto de los diferentes consensos y guía de manejo ⁽⁴⁾. Sin embargo, los datos disponibles orientan a una mayor prevalencia en zonas industrializadas, probablemente por los cambios en los hábitos de vida y por factores ambientales como contaminantes y exposición a alérgenos, pero aún existen muchas diferencias entre poblaciones que no pueden ser explicadas⁽⁵⁾. Así pues, durante la década pasada se ha visto un alarmante incremento en la prevalencia, morbilidad y mortalidad por asma, especialmente en la población infantil y en adultos jóvenes. Se calcula que hay una población mundial cercana a los 150.000.000 individuos que presentan la enfermedad; la misma que con frecuencia puede ser severa e incapacitante y a veces fatal (150.000 muertes por año), por lo que constituye un serio problema de salud pública ⁽¹⁾.

3. Etiología

La etiología del asma es multifactorial. Uno de los principales aspectos es la atopia, la cual se define como la predisposición genética del individuo ^(6;7) 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 ⁽⁸⁾ Esta respuesta se ve exacerbada por la

contribución de factores de tipo no alergenillos como la dieta materno-infantil, infecciones respiratorias, contaminación ambiental y estado ocupacional⁽⁹⁾. El desarrollo clínico del asma es un proceso complejo, tomando en cuenta la existencia de una predisposición genética del individuo a la sensibilidad al alergeno y el desequilibrio entre la inmunidad celular (Th1) y la inmunidad humoral (Th2).

Factores de crecimiento fibrogénicos

En los últimos años se han adelantado muchas investigaciones sobre los factores de crecimiento fibrogénicos en el asma; en numerosos trabajos se ha encontrado expresión aumentada de Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y Factor transformante de crecimiento (TGF- β) tanto en especímenes de biopsia bronquial como en BAL (Lavado Bronquio Alveolar)^(10;11). La expresión de TGF β guarda correlación con el grado de fibrosis subepitelial ⁽¹¹⁾ y está significativamente aumentada en los pacientes con asma severa o grave y los infiltrados eosinofílicos prominentes.

4. Patogenia

En la década pasada se realizaron grandes desarrollos en la percepción del asma como una enfermedad inflamatoria del bronquio. Un gran avance tecnológico se presentó cuando se pudieron obtener muestras de vías aéreas de pacientes con asma de intensidad variable, por medio de la aplicación de la fibrobroncoscopia. El análisis de células y de mediadores en el lavado broncoalveolar y la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas y de microscopia electrónica a los especímenes de biopsia confirmaron que el mastocito y el eosinófilo parecen ser las principales células efectoras de la inflamación, tanto en la enfermedad alérgica como en la no alérgica ^(12;13). La aplicación de la metodología basada en ARN y los métodos mejorados de detección de mediadores han proporcionado evidencias de que la sensibilización inicial y la subsiguiente expansión de las poblaciones de mastocitos y de eosinófilos resultan de la liberación de citocinas específicas

codificadas en el cromosoma 5q ⁽¹⁴⁾ que son liberadas por linfocitos Th2 activados en la forma alérgica del asma, la no alérgica o intrínseca ⁽¹⁵⁾. Éstas incluyen IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF e IL-13.

A continuación se describirá inicialmente conceptos básicos para entender la patogenia de la enfermedad:

4.1 Linfocito T

El linfocito T proviene de las células progenitoras CD34 de la médula ósea, migra al timo en donde completa su maduración bajo la acción de hormonas tímicas y, luego, sale a la circulación ya preparado para reaccionar en forma adecuada a la presentación de antígenos y con su receptor CD3 de membrana que lo caracteriza, para convertirse en linfocito CD4 ayudador (cooperador) o linfocito CD8 supresor/citotóxico.

Existen dos tipos de linfocito T CD4 que se diferencian por el patrón de citocinas que producen:

- ♣ TH1: cuyo inductor más importante es la IL-12; estos linfocitos son capaces de liberar IL-2 e IFN γ .
- ♣ TH2: inducido por concentraciones titulares elevadas de IL-4 liberada por otros linfocitos CD4, mastocitos y basófilos. Sintetizan citocinas claves en la respuesta alérgica como la IL-4 y la IL-13 que inducen la síntesis de IgE por los linfocitos B y es responsable de los niveles aumentados de esta inmunoglobulina ^(16;17). La IL-5 juega un papel muy importante en el asma bronquial a inducir la proliferación y la activación de los eosinófilos, disminuyendo su apoptosis y facilitando su migración hacia el tejido bronquial. El linfocito TH2 también produce otras citocinas como IL-9, IL-11, GM-CSF e IL-10, así como quimiocinas como RANTES, MIP-1 y MCP3 ^(18;19).

4.1.1 Función del linfocito TH2 en la iniciación y persistencia de la inflamación alérgica

La función del TH2 no se limita a la inducción de la producción de IgE y a la activación de los eosinófilos, sino que involucra muchas otras células como

mastocitos, basófilos, células epiteliales, endoteliales, musculares y glandulares. La interacción de un alérgeno con la IgE específica en la membrana del mastocito conlleva a su degranulación, con liberación de histamina y leucotrienos. Esto da lugar a la fase aguda del espasmo bronquial que ocurre minutos después del contacto alérgico. Las células presentadoras de antígenos, particularmente las células dendríticas, procesan y presentan los péptidos alérgicos a los linfocitos CD4-TH2 en el contexto de moléculas clase II de histocompatibilidad.

Los TH2, así estimulados, sintetizan y libran IL-4, IL-13, IL-5, IL-9, IL-11 y el factor transformador del crecimiento TGF β , sumado a otros factores de crecimiento, leucotrienos y proteínas básicas del eosinófilo, ejerciendo un efecto directo sobre las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y células musculares, los cuales producen más citocinas y factores de crecimiento que conducen a la fase crónica del asma con hiperreactividad bronquial y remodelación tisular ^(16;20).

4.2 Las citocinas

Las citocinas son moléculas solubles, constituyen un grupo de proteínas, redundantes en su origen y pleiotrópicas en sus efectos. Esto es, son producidas por una variedad de células tanto linfoides como no linfoides, y tienen varios efectos, también sobre muchas células. Constituyen un grupo variado entre las cuales están incluidas monocinas, interleucinas, linfocinas, factores de crecimiento de colonias e interferones; desde un punto de vista práctico, se engloban bajo el nombre de citocinas.

Las fuentes celulares de las citocinas incluyen a los monocitos-macrófagos y a las células dendríticas, además de las células T, B, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliales, células cebadas y eosinófilos.

Los blancos celulares de las diversas citocinas incluyen a los monocitos y macrófagos, a las células T, a las células B, neutrófilos, células

hematopoyéticas de las series linfoides y mieloide, a los fibroblastos, a las células cebadas y a los eosinófilos.

Los efectos de las citocinas incluyen la diferenciación, proliferación y activación de las células blancas, la expresión de receptores celulares para un sinnúmero de ligandos y la inducción y secreción de una gran diversidad de otros mediadores que incluyen prostaglandinas, interleucinas, factores de crecimiento y de diferenciación, factores estimulantes de colonias, inmunoglobulinas y otros, así como la liberación de los mismos receptores solubles.

En conjunto, las citocinas participan en la inducción, expresión y modulación de las respuestas inmunitarias y en el desarrollo y regulación de las respuestas inflamatorias. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Grupos de citocinas en función de su actividad predominante.

Actividad	Citocinas
I. Proinflamatorias	IL-1, IL-6, TNF α , IFN α , IFN β
II. Promotoras del crecimiento y diferenciación	IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13
III. Factores de crecimiento hematopoyético	IL-3, GM-CSF, IL-9, IL-11
IV. Quimiocinas	IL-8, RANTES, linfotactina, fractalquina
V. Reguladoras de la actividad de los linfocitos	EGF, IFN γ , TGF β

TNF= factor de necrosis tumoral, IFN= interferon, GM-CSF= factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, EGF= factor de crecimiento epidérmico, TGF β = factor de crecimiento transformante beta⁽²¹⁾

4.2.1 Citocinas proinflamatorias

La IL-1 β /TNF α es el complejo de citocinas más importante en la inmunidad innata, en la cual sus funciones principales son estimular el reclutamiento y la activación de los neutrófilos y los monocitos en los sitios de infección; además, aumenta la expresión de las moléculas de adhesión y estimula a las células endoteliales y a los macrófagos para que produzcan citocinas y quimiocinas ⁽²²⁾.

Se sabe que TNF α produce los siguientes efectos en el asma:

- ◆ Potenciación de la sensibilización a alérgenos
- ◆ Activación de las células inflamatorias
- ◆ Aumentos de la expresión de las moléculas de adhesión
- ◆ Aumentos de la expresión de los factores de crecimiento
- ◆ Estímulo y activación de las células epiteliales y musculares
- ◆ Aumento de la producción de quimiocinas
- ◆ Papel en la hiperreactividad bronquial
- ◆ Estímulo de la proliferación de fibroblastos
- ◆ Aumento de la producción de colágeno

4.2.2 Citocinas antiinflamatorias

4.2.2.1 IL-10

Es producida por diferentes células como linfocitos TH1 y TH2 ⁽²³⁾, linfocitos citotóxicos, mastocitos y mononucleares.

4.2.2.2 TGF- β

Representa una familia de péptidos que regulan el crecimiento celular y el proceso de reparación y que puede tener efectos estimuladores o inhibidores en diferentes células. Es una citocina multifuncional que ha sido implicada en la patogénesis del asma. Los niveles de TGF- β se encuentran elevados en los fluidos de los lavados bronco alveolares. TGF- β es expresado por las células aéreas epiteliales, eosinófilos, linfocitos Th2, macrófagos, fibroblastos y podría estar unida y almacenada en la matriz subepitelial extracelular de las vías aéreas ⁽²⁴⁾. TGF- β es importante en el desarrollo crecimiento, transformación,

reparación de tejido, fibrosis y la modulación de la respuesta inmune inflamatoria ⁽²⁵⁾.

Se sintetiza como un precursor inactivo que requiere de rompimiento proteolítico para activarse; es un gran estimulante de la reparación y cicatrización por daño tisular y, además, frena la respuesta inmune inflamatoria de las mucosas, proceso que en el asma está fuera de control. Los ratones knock-out del gen de TGF- β mueren a los pocos días del nacimiento por un cuadro de inflamación difusa.

Genera reparación por fibrosis al inducir el aumento de la matriz extracelular, producir un aumento en el depósito de proteoglicanos, además, en estudios en BAL de asmáticos, la fibronectina aumentada guarda correlación con los niveles de TGF- β , que estimulan la activación de fibroblastos y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular ⁽²⁶⁾.

TGF- β actúa en forma sinérgica con PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) al amplificar la activación de células mesenquimatosas y el paso de fibroblastos a miofibroblastos, e inducir la remodelación bronquial y la hipertrofia del músculo liso bronquial.

Pero, en asma leve y en niveles bajos podría jugar un papel protector por su capacidad de inhibir la producción de IgE y la proliferación de mastocitos ⁽²⁷⁾. Estudios en modelos de roedores con asma indican que TGF- β podría tener efectos antiinflamatorios y profibróticos ⁽²⁸⁻³⁰⁾.

De tal manera, todos los estudios llevan a la conclusión de que la respuesta se presenta en dos fases: fase temprana y fase tardía. (Figura 1)

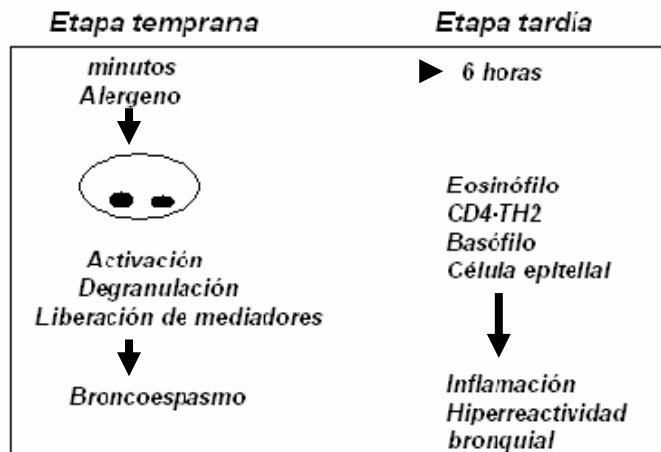


Figura 1. Fases en que se lleva a cabo el proceso del asma ⁽¹⁾

4.3 Respuesta de fase temprana

Aparece dentro de los 30 minutos siguientes a los estímulos desencadenante y en la cual la principal célula involucrada es el mastocito (células abundantes en la mucosa de las vías aéreas). La respuesta asmática temprana resulta de la activación dependiente de IgE de los mastocitos de la vía aérea, con liberación de mediadores específicos como la histamina, la prostaglandina D2 (PD2) y el leucotrieno C4, entre los más importantes ⁽³¹⁾. En estudios de provocación secuencial por antígenos colocados en distintos segmentos del bronquio, los líquidos del lavado bronquial mostraron notable incrementos de los tres mediadores más importantes del mastocito: la histamina, la triptasa y el leucotrieno C4 ⁽¹⁴⁾.

4.4 Respuesta de fase tardía

Comienza a las 6 horas y se prolonga hasta 48 o 72 horas después del estímulo y se puede convertir posteriormente en una inflamación crónica. En esta fase se involucran varios tipos de células inflamatorias, principalmente neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T activados y macrófagos.

De tal manera, el asma resulta de una interacción biológica compleja entre los productos de múltiples genes (uno o más contienen variaciones genéticas que

aumenta la susceptibilidad) y al menos una toxina del medio ambiente ⁽³²⁾. Un individuo puede ser susceptible al efecto de alérgeno mediante cualquiera de los siguientes mecanismos:

2. 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.
3. El tipo de receptor específico de linfocitos T puede permitir una respuesta más eficiente de éstas.
4. Mayor actividad de IL-4 puede causar una exagerada producción de IgE.
5. 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, y a su vez aumenta los niveles de IgE.
6. 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 β_2 adrenérgicos.
7. Debido a los cambios en los receptores específicos el individuo puede responder mas eficientemente a toxinas inhaladas.

La inmunidad adquirida es particularmente importante en el asma alérgica. 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 ⁽³³⁾. Los linfocitos llamados Th-1 producen principalmente interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN γ), y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). En contraste, los Th-2 producen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13 ⁽³⁴⁾.

Las citocinas producidas por cada una de estos subtipos funciona de manera autocrina y promueve el crecimiento de su propio fenotipo. Existe una regulación positiva de células Th-2 por IL-4 y por IFN- γ , estas citocinas pueden a su vez disminuir la actividad de células T de tipo opuesto. La IL-2 y el IFN- γ que son producidos por células Th-1 pueden amplificar la respuesta Th-1, lo cual inhibe una respuesta de Th-2.

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 sin haber sido estimulada antes, en presencia de IL-12, dicha célula se diferenciará hacia Th-1 ⁽³⁵⁾. El desarrollo de las células Th-2 está regulado por IL-4 ⁽³⁶⁾.

El mecanismo por el cual 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. 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 ⁽³⁴⁾.

Aunque la mayor parte de los datos que se tienen hasta la actualidad han sido derivados de modelos de ratones, 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 contienen una alta cantidad de células productoras de IL-4, IL-5 y GM-CSF, comparadas con células obtenidas de pacientes sanos ⁽³⁷⁾. En biopsias bronquiales de pacientes con asma, los niveles del ARNm para IL-4 e IL-5 se encuentran elevados ⁽³⁸⁾. 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 ⁽³⁹⁾

La principal manifestación del asma es la inflamación. La inflamación bronquial y AHR inicia con la inhalación de un antígeno del medio ambiente. La inhalación del antígeno evita la eliminación del mismo y penetra hasta epitelios

subyacentes, en donde es captado por células dendríticas. La superficie alveolar está protegida por los macrófagos alveolares y también por células dendríticas que se encuentran en los espacios subepiteliales ⁽⁴⁰⁾

Las células dendríticas posteriormente se trasladan a los nódulos linfáticos regionales, donde actúan como células presentadoras de antígeno a las células B y T. En presencia de IL-4 e IL-13, las células B, producen IgE ⁽⁴¹⁾. La IL-4 e IL-13 son las citocinas responsables de la iniciación de la respuesta Th-2. En ensayos *in vitro*, la IL-4 y la IL-13 pueden inducir la liberación de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión ⁽⁴²⁾

La inhalación de IL-4 causa AHR en respuesta a la metacolina e incrementa la cantidad de eosinófilos en esputo de pacientes asmáticos ⁽⁴³⁾, por otro lado, los ratones transgénicos que sobre-expresan la IL-13 desarrollan una AHR aumentada y una eosinofilia en vías aéreas ⁽⁴⁴⁾

Además, tejido pulmonar de pacientes con asma alérgica, presentan abundantes células Th2 activadas productoras de IL-4 ⁽⁴⁵⁾. Si se bloquea la IL-4 durante la sensibilización antigénica se suprime el desarrollo del asma alérgica. Sin embargo, si se bloquea la IL-4 antes o durante el reto antigénico no se inhibe la inflamación o el AHR ⁽⁴⁶⁾.

La IL-13 se une a la cadena alfa del receptor de la IL-4. Si se bloquea la IL-13 da como resultado una reversión completa de la AHR y la producción de moco, inducidas por el alérgeno. La administración de IL-13 recombinante induce un incremento en la producción de moco en vías aéreas ⁽⁴⁷⁾.

Después de la activación primaria de las células T por las células presentadoras de antígeno, las células B producen IgE específicas para el alérgeno. Esta IgE es liberada a torrente sanguíneo y rápidamente se unen a receptores IgE de alta afinidad (FcεRI) que se encuentran en la superficie de células cebadas y basófilos de sangre periférica y a los receptores de IgE de baja afinidad (FcεRII o CD23) que se encuentran en la superficie los linfocitos, eosinófilos, plaquetas y macrófagos ⁽⁴¹⁾.

Una vez que las IgE específicas para el antígeno se encuentran unidas a las células cebadas, futuras exposiciones con el antígeno puede inducir una rápida activación.

Las células cebadas expresan el receptor $Fc\epsilon RI$. 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 histamina, triptasan, ecosanoides, radicales libres y citocinas de tipo Th-2⁽⁴¹⁾.

Esta exocitosis de mediadores preformados constituye la reacción de fase temprana. Estas sustancias son toxinas rápidas y las responsables de los síntomas del asma crónica. La histamina induce la contracción del músculo liso de las vías aéreas, la secreción de moco, y la vasodilatación. La pérdida de la integridad de microvasculatura, y el paso de las proteínas del plasma a las paredes de las vías aéreas causa el estrechamiento del lumen⁽⁴⁸⁾.

La triptasa potencia el efecto de la histamina, causando contracción del músculo liso⁽⁴⁸⁾.

La liberación de leucotrienos también induce inflamación y son los causantes de la reacción de fase tardía, en la cual principalmente está involucrado en el reclutamiento y activación de los eosinófilos, células T CD4+ de tipo Th2, macrófagos, y neutrófilos⁽⁴⁹⁾. Una vez que la reacción de fase tardía inicia, los eosinófilos son los principales mediadores de la inflamación crónica en los pacientes con asma.

La IL-5 es la principal citocina responsable de la selección diferencial de los eosinófilos. La sobreproducción de IL-5 mediante un transgen en ratones induce una eosinofilia muy marcada, cuando por el contrario el gen de la IL-5 es eliminado, se reduce de manera muy significativa la eosinofilia después del reto antigénico. Los eosinófilos son reclutados al pulmón por quimiocinas

(eotaxina 1 y 2) liberadas principalmente por células cebadas y células T. Cuando los eosinófilos llegan a las vías aéreas, liberan sus gránulos tóxicos y causa daño directo a tejido, contracción de músculo liso, e incremento de la permeabilidad vascular⁽⁴⁹⁾. Una vez que se establece el ciclo repetitivo de daño tisular y reclutamiento de células inflamatorias se inicia la cronicidad.

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

YY1 es una proteína de 68-kDa que contiene dedos de zinc, que posee la propiedad inusual de regular la transcripción en diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción⁽⁵⁰⁾. 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).

YY1 es un factor de transcripción el cual participa en la regulación positiva y negativa de diversos genes en mamíferos⁽⁴¹⁾. Es una proteína que contiene cuatro dedos de zinc y cuya actividad es regulada por nitrosilación, acetilación y fosforilación⁽⁵¹⁾.

Se ha encontrado que YY1 regula positivamente la expresión de ligando de quimiocinas como CCL13, en linfocitos de pacientes con asma⁽⁵²⁾, y que regula negativamente la expresión de los receptores para quimiocinas, CCR5 y CXCR4 en linfocitos de pacientes con SIDA, la sobre-expresión de YY1 reduce la expresión de CCR5 y CXCR4 en su superficie celular, reduciendo así la infección por HIV-1^(53;54).

Diversos estudios muestran que va en aumento el número de genes celulares y virales en los cuales se han encontrado sitios de unión para YY1 en sus

regiones promotoras, lo que refleja la importancia de este factor como regulador en la transcripción.

Como ya se había comentado, la proteína YY1 contiene cuatro dedos de zinc tipo C_2H_2 incluidos 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. La evidencia de que los dedos de zinc y regiones ricas en glicina de YY1 son instrumentos en la represión de YY1 ha sido provista por experimentos en la delección de ambas regiones. Los mecanismos que han sido propuestos para explicar este fenómeno incluyen la posibilidad de un cambio en la conformación de YY1 por modificaciones en sus enlaces covalentes ⁽⁵⁵⁾.

La presencia de YY1 en todas las células sugiere que juega un papel importante para la estabilidad celular y funcionamiento normal de ellas. YY1 ha sido encontrado recientemente en la activación del reparador de ADN. Estudios han mostrado un aumento en la estimulación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1)⁽⁵⁵⁾.

La localización de los factores de transcripción en la matriz nuclear es esencial para la regulación y control transcripcional. Estudios han revelado que el dominio C-terminal está como constituyente de la envoltura con alta afinidad eficiente a YY1 a la matriz nuclear. El dominio N-terminal de la proteína permite una baja afinidad de asociación dentro del núcleo, pero no es necesario lo que sugiere la significancia del dominio C-terminal en el núcleo como un buen represor de la transcripción. El progreso a través del ciclo celular también induce una replicación-asociada a ADN que enciende en la localización subcelular de YY1. Como una unión proteína-ADN. YY1 funciona en la replicación y regulación de los complejos histonas vitales para la

proliferación celular. La localización de YY1 nuclear y la actividad está significativamente incrementada durante el inicio de la fase G1/S, siguiendo aumentada en el citoplasma en la última parte de la fase S con incremento en la actividad de unión a ADN de YY1 y YY1 dependiente a las histonas de los genes. ⁽⁵⁵⁾.

5.1 Regulación de la transcripción mediada por YY1⁽⁵⁵⁾

Los mecanismos en que YY1 funciona como represor de la transcripción son varios. Estos mecanismos involucran la competición de YY1 con factores activadores que se traslapan en los sitios de unión, por lo que disminuye la actividad del promotor resultando una represión de la transcripción. Otras hipótesis incluyen la regulación negativa de YY1 sobre los activadores promotores unidos cercanos. En general, los modelos que explican a YY1 como un represor o activador de la transcripción son:

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

-Mecanismos de represión de transcripción mediada por YY1 ⁽⁵⁵⁾

Estos mecanismos involucran la competición de YY1 con factores activantes en los sitios de unión que se traslapan, así, 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.

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 subsecuente desplazamiento del activador.

-Interferencia con la función de los activadores transcripcionales ⁽⁵⁵⁾.

a) directamente YY1 reprime la activación transcripcional debido a la presencia de una unión del activador transcripcional a un sitio promotor del gene. YY1 puede adherirse a distancia con el activador resultando en represión de la acción del promotor

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

c) YY1 actúan en la activación transcripcional, inhibición por interacción. El modelo ADN-binding (unión al ADN) 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 ADN y el sitio promotor del gene.

Interacción con co-represores. La habilidad de YY1 para unirse a co-represores que directamente actúa para facilitar la represión transcripcional. El dedo de zinc y las regiones ricas en glicina de YY1 son conocidos por ser instrumentos en la actividad represora de YY1. la represión mediada por YY1 de activadores vía complejos co-represores YY1 modula la represión del activador transcripcional por complejos que forma con co-represores, YY1 podría reclutar los co-represores 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 INF incluye: 1) una competencia de similar 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 a distancia 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.

Inhibición cofactor inducida de la represión de YY1. Se propone un mecanismo que induce al enmascaramiento y no enmascaramiento de los dominios de represión (C - terminal) y de la activación (N – Terminal) respectivamente. Es posible que YY1 interactúe con otros factores celulares para no enmascarar el dominio activador N-terminal, esperado por alteraciones estructurales influyentes incluyendo cambios en la región C-terminal, en consecuencia inhibiendo para parte de represión constitutiva de YY1. La región C-terminal, podría jugar un papel importante en la ocultación de la región N-terminal (región de activación), estudios en los cuales el dominio C – terminal de YY1 eliminado resulto en la expresión de las secuencias N – Terminal y un significativo aumento en la activación de la transcripción de YY1. el resultado total de separar o combinar la inducción del dominio C – Terminal cubierto o el no cubrimiento del dominio N – Terminal de represión es activación transcripcional

Es posible que YY1 pudiera interactuar con factores celulares para llevar a una alteración estructural, por lo que hay una inhibición constitutiva de la parte represora de YY1.

Reclutamiento de co-activadores. YY1 puede actuar como un activador indirecto de la transcripción por unión o rearreglo con otros activadores de transcripción principalmente se induce los cofactores para una unión directamente al promotor tarjeta e iniciar la activación. YY1 puede unirse a

p300, provocando la expresión de la cromatina para proveer una mejor interacción con el DNA. Este mecanismo explica de manera más fácil como YY1 puede contribuir con activación transcripcional. YY1 puede actuar como un activador indirecto de la transcripción por inducción de cofactores a una unión indirecta a la tarjeta promotora e iniciar la activación.

5.2 Coactivadores de YY1⁽⁵⁵⁾

YY1 puede actuar independientemente. Algunos de los efectos de YY1 sobre el gene de transcripción son ejecutados via cofactores. La proteína AAV de E1A es un ejemplo de un co-activador 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.

5.3 Correpresores de YY1⁽⁵⁵⁾

YY1 fue utilizado para el aislamiento e identificación mRPD3 revelando un dominio idéntico rico en glicina con componente necesario para la represión transcripcional; dominio idéntico que el que tiene YY1. La sobre expresión de mRPD3 incrementa significativamente la habilidad de Gal4-YY1 (proteínas fusionadas) para reprimir la transcripción sugiriendo el posible papel de mRPD3 como un co-represor de YY1.

SAP30 es también requerido para el funcionamiento normal de RPD3, un co-represor alternativo de YY1. SAP30 solo, no es suficiente para la represión transcripcional y es dependiente sobre factores de transcripción como YY1 para atarlo al promotor.

La presencia in vivo de este sugiere uno de varios mecanismos diferentes dependientes de YY1 de represión transcripcional. La función de YY1 en la transcripción es contexto específico y requiere de la interacción con algunos

factores celulares. Como resultado, YY1 trabajo intracelular que lo motiva a inducir múltiples funciones en la transcripción inicial, activación y represión últimamente pesando a la regulación del desarrollo normal y sobrevivencia. Como nota previa, es aparente que la expresión de YY1 y localización pueden estar coordinados con fases del ciclo celular. Esta vía de estudio de las interacciones existentes entre YY1 y reguladores del ciclo celular, muerte de genes y factores de transcripción y cofactores que evidencia el mecanismo superficial para soportar el papel de este ubicuo factor de transcripción en la supresión o progresión de varios males. Los promotores humanos y productos génicos regulados por YY1.

6. Relación entre TGF- β y YY1

La expresión de TGF- β está influida por polimorfismos en su promotor, y algunos de esos polimorfismos podrían estar asociados con asma y otros padecimientos ⁽⁵⁶⁾.

En particular, se ha descrito un polimorfismo en el promotor de TGF- β , se trata de un cambio de una citosina (C) por una 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 ⁽⁵⁷⁾. 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 ⁽⁵⁸⁾.

Sin embargo, ésto todavía no ha sido demostrado 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 ⁽⁵⁹⁾. TGF- β es secretada como un complejo constitutivo y puede ser procesado vía proteasas, ácidos o especies reactivas de oxígeno para ser activadas ⁽⁵⁸⁾.

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 esta citocina, éste podría tener importantes efectos sobre 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 de YY1 al promotor ⁽⁶⁰⁾. Sin embargo no existe hasta el momento un estudio que muestre la asociación entre la expresión del factor de transcripción YY1 y la expresión de TGF- β , y si esta asociación puede contribuir en la fisiopatogenesis del asma, de ahí la finalidad del presente trabajo.

OBJETIVO GENERAL

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar las técnicas de microarreglos de tejidos e inmunohistoquímica.
2. Evaluar la expresión de YY1 en tejido pulmonar de modelos murinos de asma con diferentes grados de severidad.
3. Evaluar la expresión de TGF- β en tejido pulmonar de modelos murinos de asma con diferentes grados de severidad.

HIPOTESIS

El promotor del gene de TGF- β posee sitios de unión para el factor de transcripción YY1 y se ha encontrado que la presencia de un polimorfismo en dicho promotor, incrementa la activación de TGF- β por YY1, por lo que la asociación que existe entre la expresión de YY1 y TGF- β en tejido pulmonar de ratones asmáticos es directa y esto a su vez se relaciona con el grado de severidad del asma.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio experimental con 180 ratones machos en edad adulta (6 a 8 semanas), clasificados en 3 modelos: asma leve, moderada y severa. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones convencionales de bioterio, con acceso al alimento y agua, temperatura de 21-24°C hasta el momento en el que fueron sacrificados.

1. Parte experimental.

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones convencionales de bioterio, con acceso al alimento y agua, temperatura de 21-24°C, hasta el momento en el que fueron sacrificados. Se estudiaron 180 ratones machos en edad adulta (6 a 8 semanas). Para su estudio se clasificaron en tres modelos:

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

Modelo 2 (Asma moderada). El día 1 y el día 5 los ratones recibieron 100 µl de una suspensión que contenía 10µg de OVA en 1 mg de alum (SUPERFOS, Denmark), por vía intraperitoneal. En los días 12 y 24 recibieron OVA al 0.75% directamente en la traquea. En los días 28, 32, 34, 44 y 64 se evaluó la respuesta alérgica inducida.

Modelo 3 (Asma severa). El días 1 y el día 5 los ratones recibieron 100 µl de una suspensión que contenía 10µg de OVA en 1 mg de alum (SUPERFOS, Denmark), por vía intraperitoneal. En los días 12, 22 y 32 recibieron OVA al 0.75% directamente en la traquea. En los días 42,52 y 72 se evaluó la respuesta alérgica inducida.

Controles. Cada grupo control recibió solo SS (solucion salina) en lugar de OVA, de la misma manera que se describe en cada uno de los diferentes modelos.

Cuadro 2. Esquema de trabajo con ratones Balb/c problema (retos con OVA)

Grupo	Sensibilización con:	Marcaje	Esquema	Núm. de Retos	Día de sacrificio
Problema	OVA más Alum	D	leve	1	16
		F	moderada	2	28
		H	moderada	2	32
		J	moderada	2	34
		N	moderada	2	44
		Q	moderada	2	64
		L	severa	3	42
		O	Severa	3	52
		S	Severa	3	72

Cuadro 3. Esquema de trabajo con ratones Balb/c controles (solución salina)

Grupo	Administración de:	Marcaje	Esquema de estudio	Núm. de retos con solución salina (SS)	Días de sacrificio
Control	Solución Salina	C	Leve	1	16
		E	Moderada	2	28
		G	Moderada	2	32
		I	Moderada	2	34
		M	Moderada	2	44
		P	Moderada	2	64
		K	Severa	3	42
		Ñ	Severa	3	52

		R	Severa	3	72
--	--	---	--------	---	----

Por último se procedió a sacrificar a los ratones de acuerdo a los días especificados en los cuadros 2 y 3. Los ratones se anestesiaron en una cámara de éter y se colectó la sangre por incisión axilar seguida de su sacrificio para la obtención de los pulmones que fueron perfundidos con etanol absoluto utilizando una jeringa de 5 mL. La perfusión se realizó introduciendo la aguja en la tráquea con mucho cuidado e introduciendo el etanol hasta observar que los pulmones se inflaran, una vez listos, los pulmones fueron colocados en tubos Falcon con 10 mL de etanol absoluto hasta su utilización para inclusión en parafina y corte de tejido. La sangre se dejó coagular, se extrajo el coágulo y centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para obtener el plasma. El corte se realizó con tijeras de disección abriendo de la parte inferior (comenzando del estómago) hasta la tráquea procurando no cortarla.

2. Deshidratación y corte del tejido.

Se realizó el corte del pulmón con una navaja abarcando los vértices del tejido, el corte fue de vértice a vértice sin aplastar el pulmón de manera que se abarcaran tanto alvéolos como bazos. El tejido cortado se colocó en unos moldes tipo "casette". Luego se colocaron en etanol al 70% por 30 minutos. Después se pasaron a etanol al 96% por otros 30 minutos. Luego se pasaron los casettes a etanol absoluto por 30 minutos dentro de la estufa. A continuación se pasaron a parafina-xilol por 30 minutos dentro de la estufa y por último se pasó a parafina por una hora. Al final el tejido quedó deshidratado.

3. Inclusión del tejido en parafina.

Los moldes de acero inoxidable se calentaron previamente con mechero. Después se colocó parafina dentro de los moldes, se sacó el tejido del casette con la parte

plana hacia abajo y se acomodó en el centro del molde. Sobre el molde se colocó el cassette y se agregó más parafina. Cuando se observó que la parafina estaba fría, se colocó dentro de hielo por unos 5 minutos y luego se retiró del molde.

4. Corte en el microtomo.

Técnica de corte: Se realizaron cortes de 4 μ utilizando un micrótomo, realizando 2 cortes para cada una de las laminilla, las cuales fueron previamente etiquetadas.

5. Preparación, estirado y confección de tejidos

Cuando ya se tuvieron listas las laminillas (etiquetadas), se preparó todo para la pesca del corte del tejido en el portaobjetos. Se utilizó agua destilada y se calentó en un baño. Cuando se fueron cortando los tejidos, se colocaron sobre el agua previamente calentada con mucho cuidado y se atrapó ese corte con el portaobjetos tratando de que el tejido quedara centrado y se dejó secar a temperatura ambiente.

6. Tinción de H/E (Hematoxilina-Eosina)

Los portaobjetos en que se montaron los cortes del tejido para la tinción de rutina H/E, fueron desparafinados en un horno a 60° C e hidratados 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 xilol e inmediatamente fueron cubiertos con resina sintética. Las muestras fueron analizadas mediante microscopia de luz convencional.

7. Punteado de laminillas

Se observaron las laminillas teñidas con H-E para puntear o marcarlas en los sitios en donde el tejido mostró características propias a los que se buscaba con la finalidad de realizar el microarreglo de tejidos.

8. 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 4 μ para la tinción de hematoxilina y eosina con el fin de identificar la región de interés, es decir, una región que presentara exactamente la lesión que se pretende analizar. Posteriormente, se procedió a la construcción del arreglo utilizando el *CHEMICON's Advanced Tissue Arrayer* (ATA 100 Chemicon) en colaboración con la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, en donde una aguja calibre 0.5 mm marca 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 denominará como bloque receptor. Una vez elaborada la matriz, con una aguja de calibre 0.4mm se extraen cilindros de tejido de cada una de las muestras impregnadas en parafina del bloque donador y como guía se utilizó el corte teñido con hematoxilina y eosina. Cada uno de estos cilindros de tejido fue implantado en el bloque receptor y una vez completa la matriz de 168 tejidos, se rellenó 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 realizaron cortes de 4 μ m con un microtomo rotatorio como lo muestra la siguiente figura. (Figura 2)

MAPA

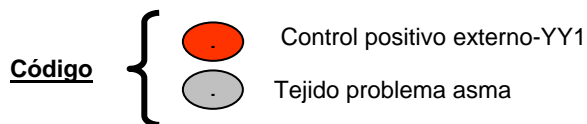
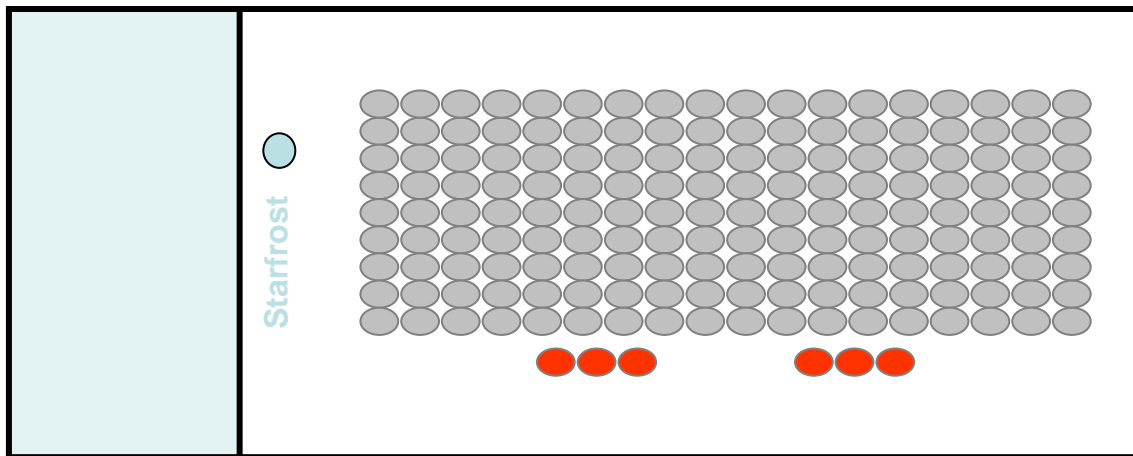


Figura 2. Mapa del microarreglo en donde se encuentran los “spot” que contienen el tejido de pulmón de cada raton control y tratado con OVA de las tablas 1 y 2.

9. Técnica de Inmunohistoquímica.

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un sólo tiempo en los diferentes microarreglos. Los cortes se montaron en laminillas especiales con pegamento. Se mantuvieron en una estufa bacteriológica toda la noche para desparafinar, con el siguiente procedimiento: se procedió a hidratar la muestra: 3 baños en xilol, 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 del 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 tres veces. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 4 horas en suero normal de cerdo al 2%. Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-YY1 1:1000 y anti- TGF β 1:2000. Después se incubó con el segundo anticuerpo anti-rabbit IgG conjugado, con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR), por último el color se produjo mediante la adición del substrato DAB (diamino benzidina) durante 3 minutos; la reacción se detuvo con agua de la llave y fue contrateñida con hematoxilina 10 seg. Después el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xilol en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

10. 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.

11. Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Los datos se presentaron 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 (comparación entre las varianzas) y t de Student (comparación entre las medias). Se hizo un análisis de comparación múltiple de Tukey para

identificar las diferencias entre los grupos. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

Con la finalidad de conocer la expresión de YY1 y TGF- β en el tejido pulmonar de ratones BALB/c tratados con diferentes retos de OVA (como alérgeno) y SS (como grupos control), se construyeron dos microarreglos (como se muestra en la figura 2), en el primero se incluyeron bronquios de todos los grupos experimentales descritos en los cuadros 2 y 3. Se incluyeron los ratones con asma (OVA) y los controles (SS). El segundo microarreglo incluyó los vasos sanguíneos de tejido pulmonar de los grupos ya descritos. Se realizó la evaluación de la respuesta alérgica inducida por el reto con OVA, en donde se observa que en el asma leve, el infiltrado inflamatorio es muy discreto alrededor de vasos y bronquios; así como una leve producción de moco. Tanto el infiltrado inflamatorio como la producción de moco aumentan de manera importante en asma moderada. Sin embargo en asma severa existe un infiltrado inflamatorio mucho mayor y una marcada producción de moco (Figura 3).

Después de construir el microarreglo, se procedió a realizar los cortes, en donde mediante la técnica de inmunohistoquímica se procedió a la identificación de la proteína YY1, la intensidad de la coloración café muestra la presencia de la proteína. Fue necesario incluir un control de isotipo, el cual consiste en IgG's normales de conejo adicionadas a la misma concentración de los anticuerpos anti-YY1 y anti-TGF-b, ambos producidos en conejo, y así comprobar la especificidad del anticuerpo utilizado. Como se muestra en las figuras 4 a la 9, el control de isotipo no presenta coloración café lo cual indica que no existe un reconocimiento inespecífico de las IgG's normales de conejo.

Se obtuvieron imágenes representativas en donde se observa la expresión de YY1 en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma leve (un solo reto con OVA), asma moderada (dos retos) y asma severa (tres retos); en donde se puede ver el aumento en la expresión de YY1 en los ratones que recibieron OVA en comparación con el grupo control. La expresión de YY1 se observa en células del

epitelio bronquial, macrófagos y linfocitos, predominantemente a nivel citoplásmico y región perinuclear (Figuras 4 a la 6).

Así mismo, se obtuvieron fotografías representativas de la expresión de YY1 en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma leve (un reto con OVA), asma moderada (dos retos) y asma severa (tres retos), en donde se observa aumento en la expresión de YY1 en los ratones que recibieron OVA en comparación con el grupo control. La expresión de YY1 se observa en células de la pared basal, macrófagos y linfocitos, predominantemente a nivel citoplásmico (Figuras 7 y 8) así como mayor infiltración celular (Figura 9).

Para TGF- β se embebieron en parafina los tejidos pulmonares de los ratones que presentaron cuadro severo de asma (tres retos con OVA) y se realizaron cortes del tejido para posteriormente realizar la tinción de inmunohistoquímica con anticuerpo anti- TGF- β , incluyéndose también los controles de isotipo y los tejidos pulmonares de ratones tratados solamente con solución salina. Así, se obtuvieron fotografías representativas de la expresión de TGF- β en bronquios y en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma severa (tres retos con OVA), observándose el aumento en la expresión de TGF- β en los ratones que recibieron OVA en comparación con el grupo control. La expresión de TGF- β se observa principalmente en los macrófagos y linfocitos, a nivel citoplásmico. También se observa una mayor infiltración celular (Figuras 10 y 11).

Al realizar el análisis densitométrico, comparando de manera general, entre los grupos control de SS y los grupos tratados con OVA, se observa la densidad de la expresión de YY1 en bronquios y en vasos que muestra un aumento significativo de la expresión de YY1 en los grupos que recibieron OVA si se compara con los grupos control (** $p=0.0001$, t de Student) (Figura 12).

Así mismo, el análisis densitométrico donde se muestra una comparación de la expresión de YY1 en vasos y en bronquios entre los diferentes grupos de ratones estratificados en respuesta leve, moderada y severa, se observa un aumento significativo de la expresión de YY1 en los grupos que corresponde a asma severa

cuando se compara con los grupos de asma leve y moderada obteniendo el valor de $**p= 0.05$ (Figura 13) y de $**p< 0.01$ (Figura 14). La expresión de YY1 entre el grupo de asma leve y moderado mostró diferencia significativa.

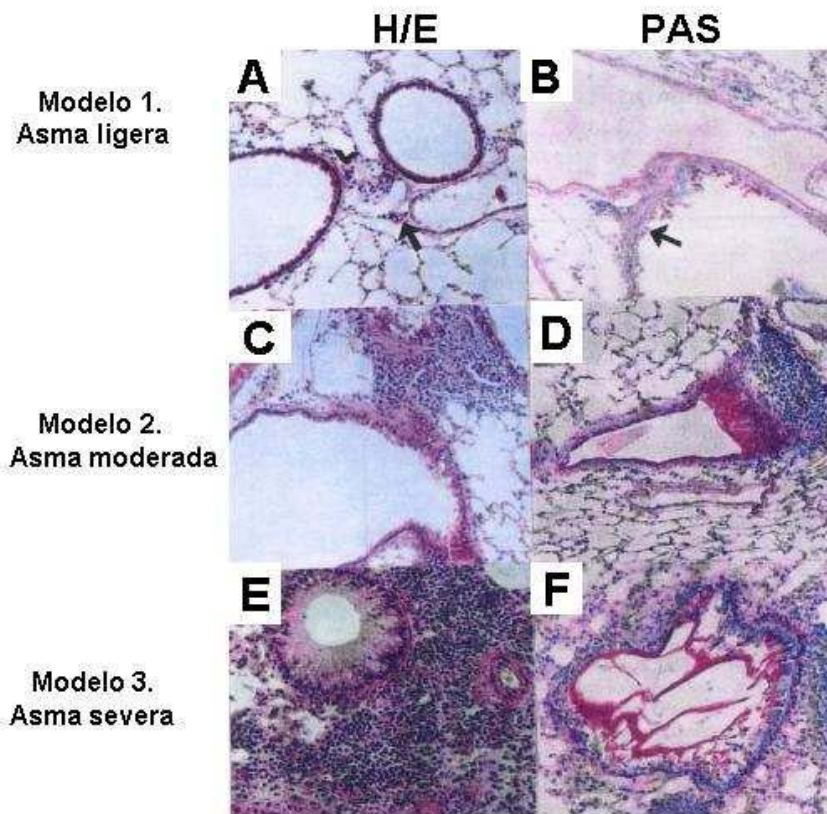
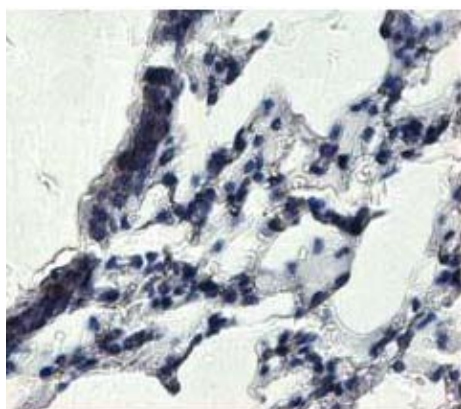
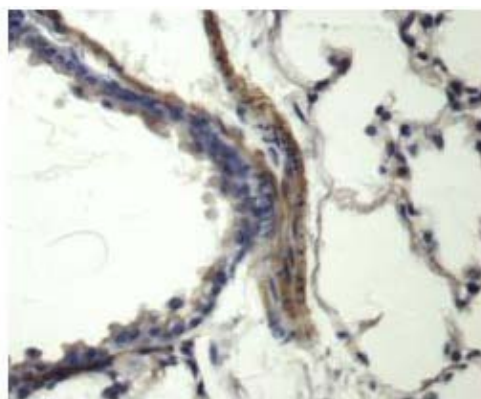


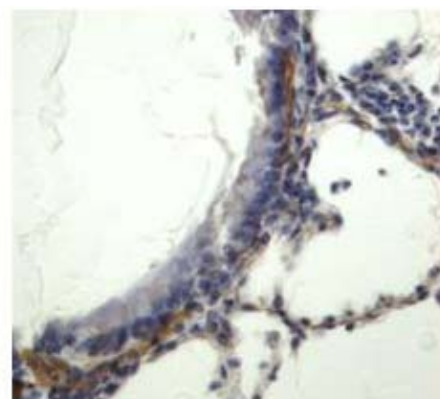
Figura 3. Evaluación de la respuesta alérgica inducida por el reto con OVA. Fotografías representativas de la tinción de H/E y PAS (periodic-acid-shift), para la evolución del infiltrado inflamatorio y la producción de moco respectivamente. 40X



Control de Isotipo

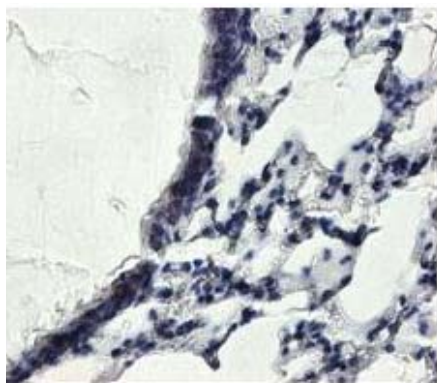


SS

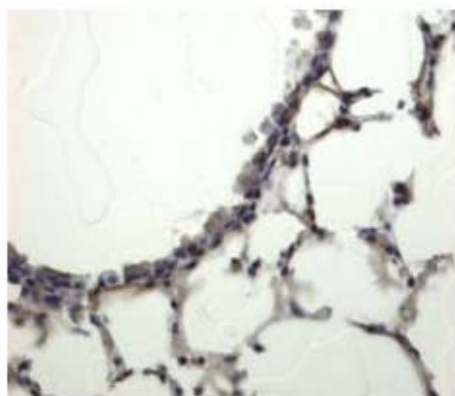


OVA

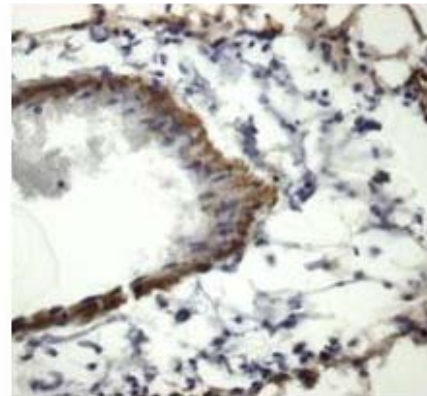
Figura 4. Fotografías representativas de la expresión de YY1 en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma leve (un solo reto con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X



Control de Isotipo



SS



OVA

Figura 5. Fotografías representativas de la expresión de YY1 en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma moderada (dos retos con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X

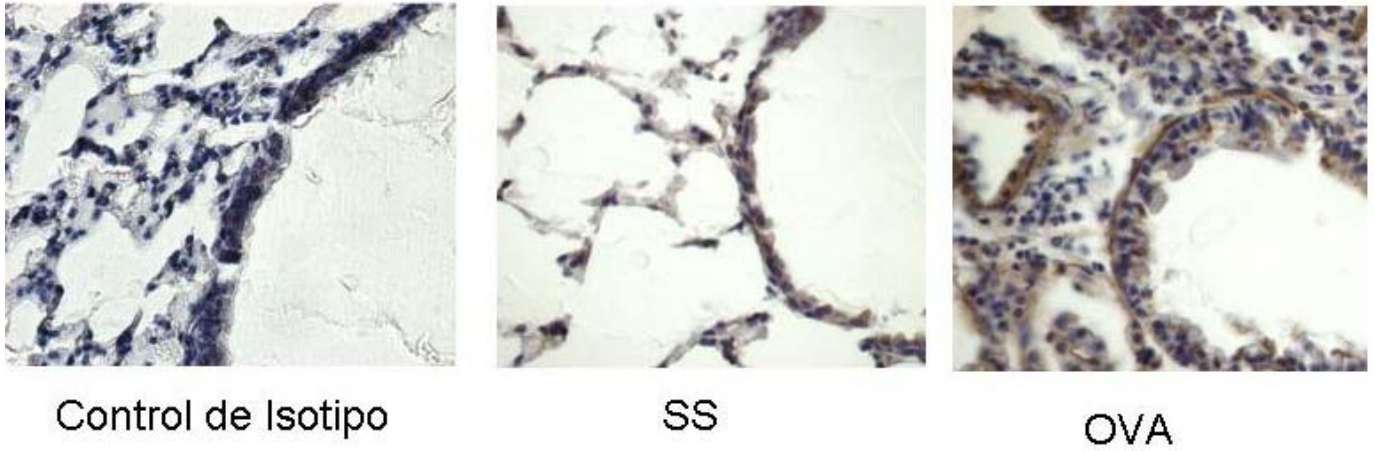


Figura 6. Fotografías representativas de la expresión de YY1 en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma severa (tres retos con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X

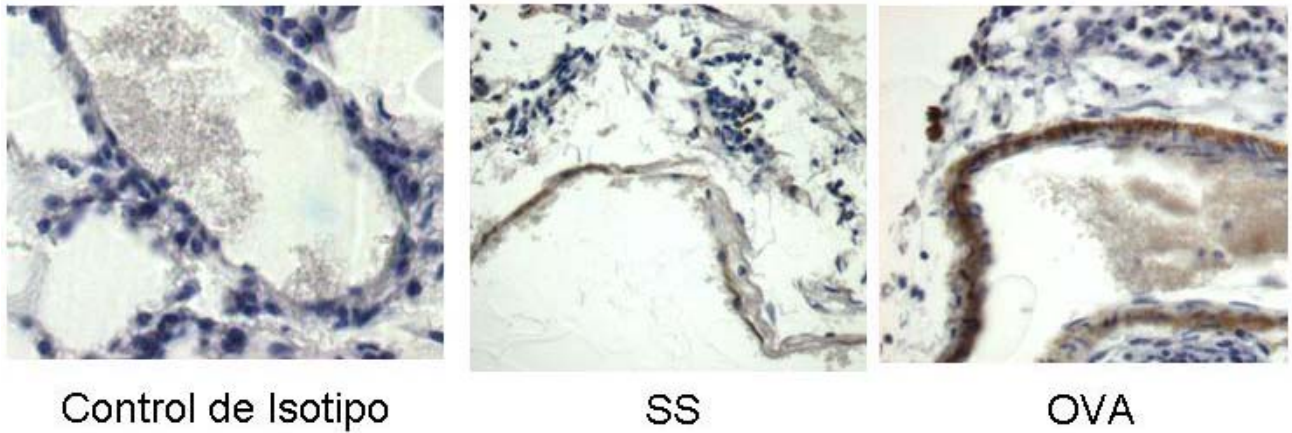
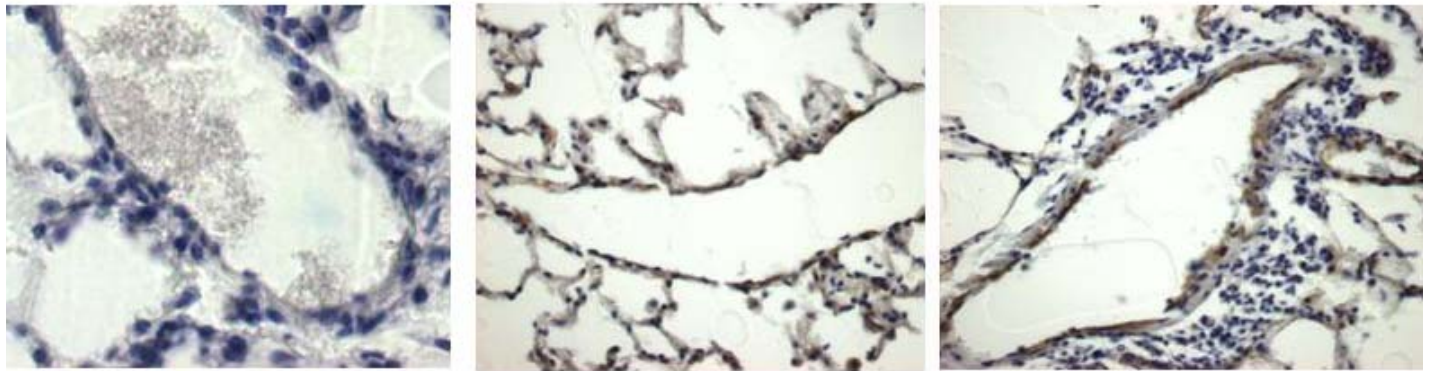


Figura 7. Fotografías representativas de la expresión de YY1 en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma leve (un reto con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X

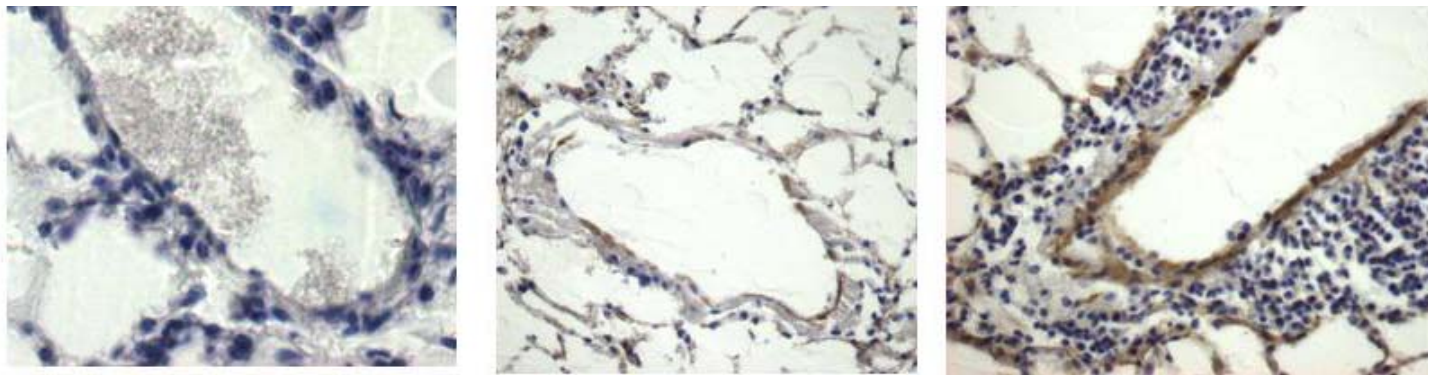


Control de Isotipo

SS

OVA

Figura 8. Fotografías representativas de la expresión de YY1 en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma moderada (dos retos con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X

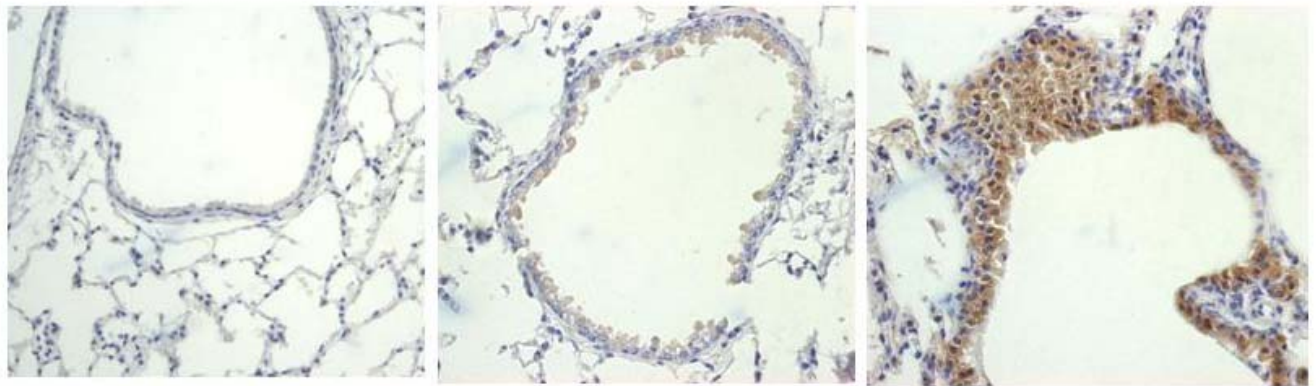


Control de Isotipo

SS

OVA

Figura 9. Fotografías representativas de la expresión de YY1 en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma severa (tres retos con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X

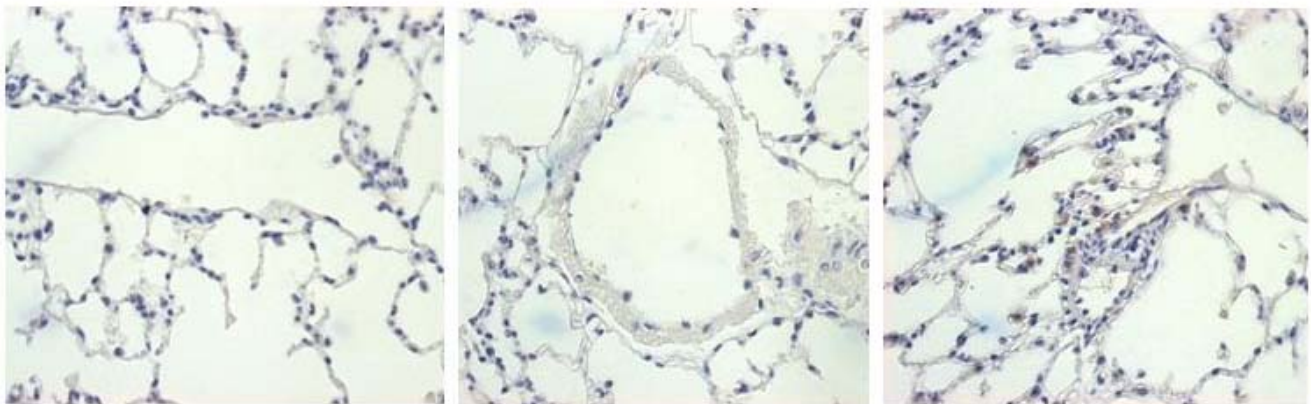


Control de Isotipo

SS

OVA

Figura 10. Fotografías representativas de la expresión de TGF- β en bronquios de tejido pulmonar de ratones con asma severa (tres retos con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X



Control de Isotipo

SS

OVA

Figura 11. Fotografías representativas de la expresión de TGF- β en vasos de tejido pulmonar de ratones con asma severa (tres retos con OVA). Se muestran el control de isotipo; grupo control que solo recibió solución salina (SS) y el grupo que recibió OVA. 40X

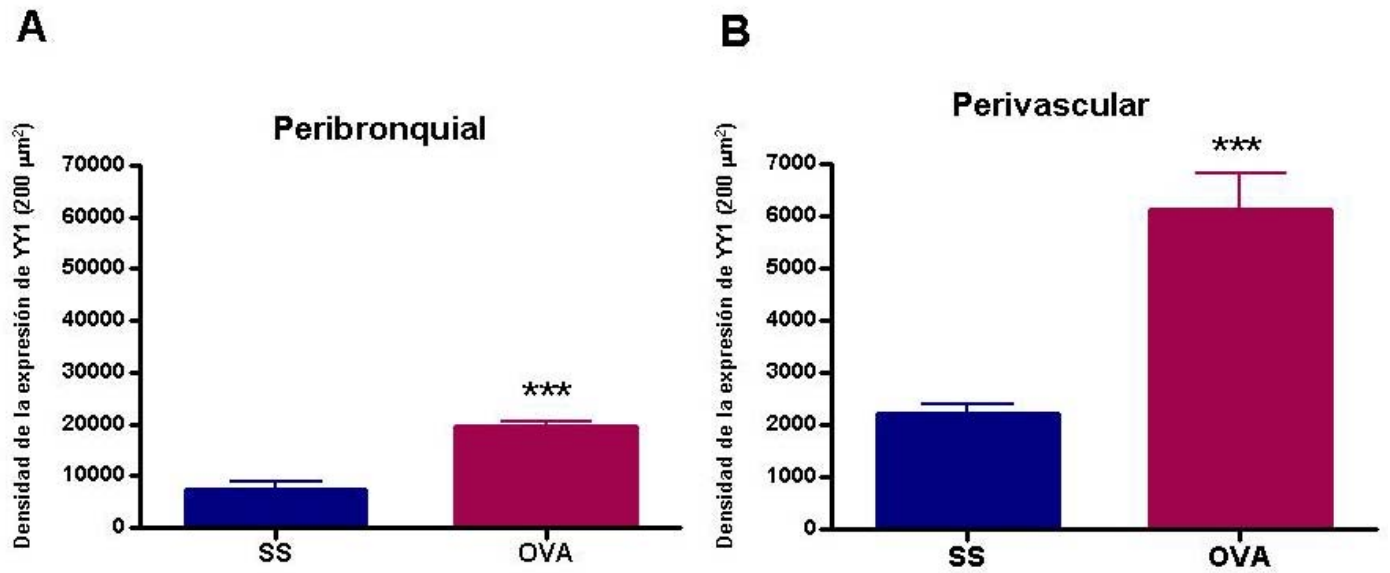


Figura 12. Análisis densitométrico donde se muestra una comparación general entre los grupos control de SS y los grupos tratados con OVA. En A se observa la densidad de la expresión de YY1 en bronquios. En B la densidad de la expresión de YY1 en vasos. (***) $p=0.0001$, t de Student).

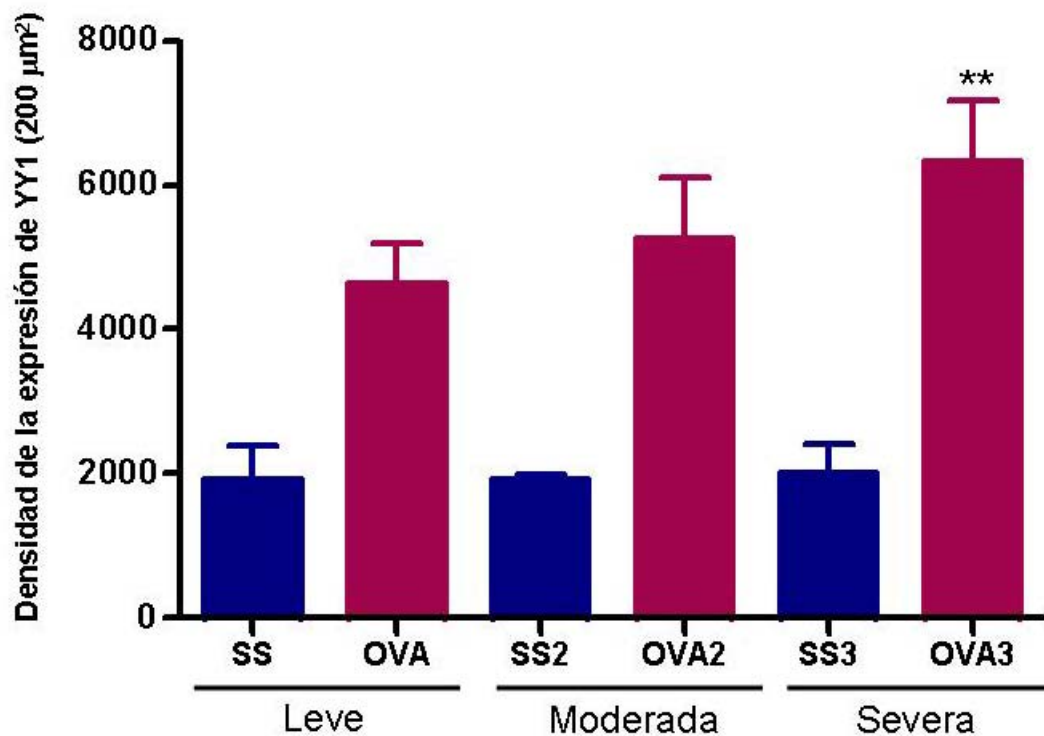


Figura 13. Análisis densitométrico donde se muestra una comparación de la expresión de YY1 en vasos entre los diferentes grupos de ratones estratificados en respuesta leve, moderada y severa. (** $p= 0.05$, ANOVA). La expresión de YY1 entre el grupo de asma leve y moderado no mostró diferencia significativa. Cada barra representa la media de la densidad de la expresión de por lo menos 5 campos analizados de los tejidos pulmonares de cada ratón. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

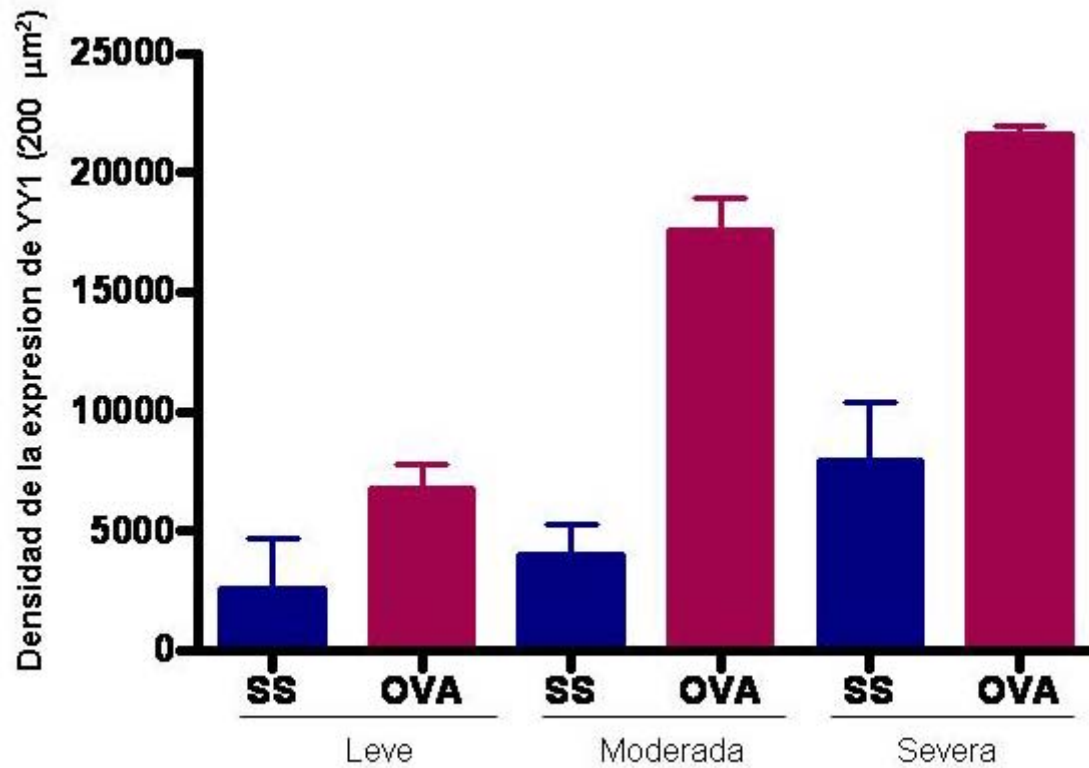


Figura 14. Análisis densitométrico donde se muestra una comparación de la expresión de YY1 en bronquios entre los diferentes grupos de ratones estratificados en respuesta leve, moderada y severa, (** $p= 0.05$, ANOVA). Cada barra representa la media de la densidad de la expresión de por lo menos 5 campos analizados de los tejidos pulmonares de cada ratón. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

DISCUSION DE RESULTADOS

Estudios recientes han demostrado que el factor de transcripción YY1 regula de manera positiva la expresión de TGF- β , esto en células provenientes de lavados bronqueoalveolares y tejido pulmonar de pacientes con asma. Además de que el polimorfismo C-509T en el promotor de TGF- β está asociado con un mal pronóstico de esta enfermedad, debido a que en el sitio donde se encuentra dicho polimorfismo es una secuencia de reconocimiento del unión ADN para YY1, el cual al presentar C en vez de T induce que YY1 tenga mayor afinidad por esta secuencia, produciendo una elevada expresión de TGF- β ⁽⁶⁰⁾.

Por otro lado se sabe que TGF-beta está asociada estrechamente con la patogénesis del asma debido a que los pacientes con asma severa, presentan alta expresión de TGF- β , mientras que los pacientes con asma leve o moderada presentan menor expresión de esta citocina ⁽⁵⁹⁾.

Por lo anterior, es razonable pensar que existe una asociación directa entre la expresión de YY1 y la expresión de TGF- β , y que esta asociación a su vez se relaciona con la severidad del asma, lo cual no ha sido descrito hasta la fecha.

En el presente trabajo describimos por primera vez una asociación directa entre la expresión de YY1 y TGF- β en un modelo murino de asma con diferentes grados de severidad.

Utilizando la técnica de microarreglo de tejidos, la cual desde hace algunos años, ha sido ampliamente utilizada para el estudio de expresión de proteínas, tiene la ventaja de que en un solo bloque de parafina se pueden arreglar de manera ordenada de 100 a 300 diferentes tejidos, de tal manera que al realizar el corte de este bloque y colocarse en una laminilla, es posible analizar la expresión de determinada proteína a un mismo tiempo y con la ventaja de disminuir la variabilidad inter-ensayo, así como también disminuir costos y tiempo en la realización del experimento. Esto hace que el resultado sea más

confiable y significativo ya que se escogen porciones del tejido más representativo de los que se desea estudiar.

Para la realización de la inmunohistoquímica fue necesario estandarizar la técnica con la finalidad de establecer las mejores condiciones a las cuales se podía obtener una mejor tinción. Se encontró que fue necesario disminuir la concentración del anticuerpo para evitar unión inespecífica por parte de éste logrando que el complejo antígeno-anticuerpo llegara al punto de equivalencia. También se bloqueó con suero normal de cerdo por mayor tiempo (aproximadamente 5 horas) para evitar, principalmente, que el anticuerpo se uniera inespecíficamente por las regiones Fc y además porque cada muestra posee una cantidad de tejido que puede provocar el ocultamiento de sitios, necesitando mayor tiempo para dejar que el suero normal de cerdo penetre a esas posible regiones. El tiempo de revelado fue muy importante, se procuró no obtener fondo (coloración café diseminada en todo el tejido), ésta fue de 5 minutos. En conjunto estas condiciones ayudaron a obtener una tinción lo más limpia posible.

Con el anticuerpo anti-TGF- β , las condiciones fueron diferentes. Para su uso fue necesario bloquear el tejido con suero normal de cerdo toda la noche para bloquear lo mejor posible las regiones de unión inespecífica, también se dejó actuar al anticuerpo por 3 horas 30 minutos ya que si se dejaba por mayor tiempo de incubación se producía una unión inespecífica que daba una fuerte coloración café den todo el tejido.

Para la técnica de microarreglos se observó que las concentraciones de los anticuerpos que se utilizaron deben ser muy bajas, es decir, la dilución tanto para TGF- β como para YY1 fueron elevadas (1:2000 y 1:1500 respectivamente) ya que la cantidad de tejido contenida en cada muestra es muy pequeña y altas concentraciones de anticuerpo produce unión inespecífica (exceso de anticuerpo) perdiéndose la equivalencia.

Las figuras 3 a la 9 muestran que existe una discreta expresión de YY1 en los grupos de ratones control, es decir que solo recibieron solución salina. Esto

puede ser explicado por el hecho de que YY1 es una proteína que se expresa de manera constitutiva. Otra explicación puede deber ser que al momento de realizar la inoculación directa en la traquea se crea un efecto mecánico que induce estrés en el tejido, lo cual genera cierta respuesta celular, induciendo la expresión de YY1. Para descartar o afirmar estas posibles explicaciones sería necesario incluir un grupo de ratones, los cuales no fueran sometidos a la administración intratraqueal.

Se observó que hay una mayor presencia de YY1 en los vasos (figura 7 a 9 y figura 13) que en los bronquios (figura 4-6 y figura 14), esto se puede deber a que la región perivascular es la zona que se encuentra en mayor contacto con células inflamatorias como eosinófilos y linfocitos Th2, principalmente, que secretan las citocinas, induciendo un aumento de la inflamación. En cambio, en los bronquios también influyen las citocinas, pero principalmente existe la intención de tratar que haya remodelación pulmonar, induciendo la proliferación celular, en donde YY1 puede participar de manera importante.

De acuerdo a los resultados observados en las figuras 12-14, se puede ver que existe una diferencia significativa entre los tejidos de pulmón de ratones tratados únicamente con solución salina y los tratados con OVA ($p < 0.05$). En el modelo severo de asma, se observa que existe una mayor presencia de YY1 si se compara con los modelos leve y moderado, esto se puede deber a que durante el proceso de inflamación, hay en el medio la presencia de varias citocinas proinflamatorias que pudieran estimular a que YY1 se sobreexpresara. De acuerdo a estudios realizados, se ha encontrado que la expresión del factor nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{-B}$) puede ser regulada por citocinas proinflamatorias, por otro lado estudios realizados recientemente demuestran que el promotor de YY1 presenta sitios de unión al factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{-B}$ ⁽⁶¹⁾, por lo que es razonable pensar que las citocinas proinflamatorias induzcan la expresión de $\text{NF-}\kappa\text{-B}$ y éste a su vez regula positivamente la transcripción de YY1. Por lo que al haber mayor cantidad de citocinas proinflamatorias, se induce la expresión de YY1. Sin embargo, se deben realizar más estudios para descartar o afirmar esta posible explicación.

En las gráficas (figuras 12 a 14) se muestra efectivamente que existe una diferencia en la expresión de YY1 entre los diferentes grupos y entre las regiones de vasos y bronquios. Así mismo, en los grupos de asma moderada se observa una presencia de YY1 similar a la del cuadro severo, mientras que la comparación con el cuadro leve es notable. El que haya una similitud entre el cuadro severo y el cuadro moderado puede deberse al tiempo en que comienza a darse la respuesta inflamatoria, ya que en el cuadro leve existe apenas la presencia de una inflamación discreta, es decir, una respuesta temprana en la que no hay una presencia significativa de citocina que pudieran inducir a más inflamación. Sin embargo, en el modelo moderado y severo existe una mayor inflamación, lo cual se refleja en una mayor expresión de citocinas de forma constante que a su vez inducen a una mayor expresión de YY1.

Con respecto a TGF- β , las imágenes en las figuras 10 y 11 muestran que existe una diferencia importante entre los controles y los grupos tratados con OVA. Esto es consistente con los diversos reportes que muestran que TGF- β juega un papel muy importante en la fisiopatogenesis del asma y que a mayor expresión de esta citocina mayor grado de severidad de esta enfermedad ⁽⁵⁹⁾. TGF- β es una citocina antiinflamatoria, sin embargo, en ambientes en donde hay elevada cantidad de linfocitos Th2, esta citocina actúa principalmente en el desarrollo, crecimiento, transformación y reparación de tejido y fibrosis así como la modulación de la respuesta inmune inflamatoria ⁽²⁵⁾. En solución salina se logra observar una expresión discreta de esta citocina, lo cual puede ser explicado, con el hecho de que TGF- β es una proteína que se expresa de manera constitutiva.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se muestra por primera vez que YY1 se expresan de manera significativa en el tejido pulmonar de ratones con asma, y esta expresión aumenta de manera directamente proporcional con el grado de severidad. Lo cual sugiere la participación de este factor de transcripción en la fisiopatogenesis de esta enfermedad. Además demostramos también por primera vez que existe una asociación entre la expresión de YY1 y TGF- β , lo

cual apoya los trabajos reportados por Silverman y cols. ⁽⁶⁰⁾ en donde demuestran que YY1 regula de manera transcripcional TGF- β .

Recientes reportes muestran que el promotor del gen que codifica para TGF- β presenta un polimorfismo en el locus C-509T ⁽⁶⁰⁾, lo que hace que exista una unión con mayor afinidad de YY1 al promotor del gen de TGF- β , activando la sobreexpresión de esta citocina. Hasta este momento no se ha realizado un estudio en el cual se asocie a YY1 con la expresión de TGF- β de forma directa, es decir, si la regulación de TGF- β por YY1 tiene una implicación clínica importante, entonces se debe encontrar una asociación directa entre la expresión de YY1 y TGF- β , y a su vez expresión de estas proteína se deben asociar con la severidad de la enfermedad. Comprobar lo anterior fue el objetivo principal de este trabajo.

Los resultados de este trabajo muestran que existe una sobreexpresión de YY1 y de la citocina TGF- β en los cuadros severos de asma, observándose de forma cuantitativa, por lo que entonces se encuentra una asociación directa entre el factor de transcripción YY1 y la citocina TGF- β .

Cabe mencionar que sería necesario realizar un análisis cuantitativo para la citocina de TGF- β , para así poder correlacionar a YY1 con TGF- β . Sin embargo, con los datos obtenidos se puede decir que YY1 y TGF- β presentan una asociación directa.

CONCLUSIONES

Los microarreglos de tejidos resultó un método eficaz para analizar múltiples muestras de tejido con la menor cantidad de reactivo y en menor tiempo, disminuyendo la variabilidad entre los resultados. Se estandarizó la técnica de microarreglos, siendo en este momento el único grupo de investigación en México en utilizar la técnica semi-automatizada.

Se establecieron las condiciones óptimas para la tinción de inmunohistoquímicas en los microrreglos de tejidos, lo cual es muy importante para obtener una buena detección de las proteínas que nos interesa estudiar.

Se demostró por primera vez que el factor de transcripción YY1 se encuentra principalmente expresado en la región citoplasmática y nuclear de las células epiteliales, linfocitos y macrófagos, células que se sabe participan en el proceso inflamatorio alérgico.

Además, se demostró que el factor de transcripción YY1 presenta una relación directamente proporcional con el grado de severidad del asma; a mayor gravedad, mayor expresión de YY1.

Existe una relación directa entre el grado de severidad del asma con la expresión de la citocina TGF- β . Y que el promotor del gen de TGF- β posee sitios de unión para YY1.

Se mostró que YY1 se encuentra sobreexpresado al igual que la citocina TGF- β en los cuadros graves de asma, cuando se compara con asma leve o moderada por lo que es razonable pensar que la asociación directa sugiere que YY1 regula la expresión de TGF- β y que esto tiene una implicación importante en la patogénesis de esta enfermedad. Los resultados sugieren fuertemente que YY1 participa en la patogénesis del asma.

PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

1. Realizar el análisis densitométrico para TGF- β y así poder correlacionar la expresión de YY1 con la expresión de TGF- β .
2. Realizar una RT-PCR (retrotranscripción reversa y PCR) en tiempo real para evaluar la expresión a nivel ARNm de YY1 y TGF- β
3. Inhibir la actividad de YY1 con donadores de óxido nítrico, como DETANONOate que se ha reportado que nitrosila los dedos de zinc de YY1 disminuyendo su actividad ⁽⁶²⁾, y evaluar por medio de inmunohistoquímica ensayos de RT-PCR en tiempo real, si como consecuencia de esta inhibición disminuye la expresión de TGF- β en tejidos pulmonar en nuestro modelo murino de asma y a su vez la gravedad de la enfermedad.

ANEXO

Lista de reactivos.

Nombre	Marca	Grado
Acetona	Sigma	Analitico
Alcohol etílico absoluto	Sigma	Analitico
Bloqueador de suero de cerdo	Vector	-
Citrato de Sodio	Chemicon	Analitico
Eosina	Sigma	-
Cristales de Hematoxilina	Sigma	Analitico
Parafina	Chemicon	-
Peróxido de Hidrógeno	Sigma	Analitico
Resina	Vector	-
Silane	Sigma	-
Sustrato DAB (diamino benzidina)	Dako-Citomation	-
Xilol	Sigma	Analitico

Lista de soluciones.

Nombre
Etanol al 70%
Etanol al 96%
Buffer Salino de Fosfatos (PBS)

Equipo

Nombre	Descripción
Microtomo	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	81
Ratones Balb/c leve	14
Ratones Balb/c con asma moderada	40
Ratones Balb/c con asma severa	27

Lista de anticuerpos

Anticuerpo	Proveedor
Anti-YY-1	Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA. USA
Anti-TGF- β	Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA. USA
Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR)	DAKO LSAB + kit, DAKO corporation

BIBLIOGRAFÍA

- (1) De Zúbiria Consuegra E DZSE. Asma bronquial. 2a. ed. Colombia: Editorial Panamericana, 2004.
- (2) Huerta Lopez JG. Asma bronquial infantil. *Allergy, Asthma e Immunol Ped* 2001; 10(3):72-76.
- (3) Telles F. História da Asma. *Asthma* 1992. Disponible en: <http://www.historiadelaasma.org/AS/1992/april/rtp>
- (4) Burney PG, Laitinen LA, Perdrizet S, Huckauf H, Tattersfield AE, Chinn S et al. Validity and repeatability of the IUATLD (1984) Bronchial Symptoms Questionnaire: an international comparison. *Eur Respir J* 1989; 2(10):940-945.
- (5) Burney P. Why study the epidemiology of asthma? *Thorax* 1988; 43(6):425-428.
- (6) Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B5-11.
- (7) 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(10):4730-4737.
- (8) 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(2):564-570.
- (9) Venables KM, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *Lancet* 1997; 349(9063):1465-1469.
- (10) Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y, Sato A, Takahashi T, Homma Y et al. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(6 Pt 1):1907-1912.
- (11) Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A et al. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(2 Pt 1):591-599.
- (12) Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990; 323(15):1033-1039.
- (13) Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR et al. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa

of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(4):863-871.

- (14) Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(3):806-817.
- (15) Bentley AM, Maestrelli P, Saetta M, Fabbri LM, Robinson DS, Bradley BL et al. Activated T-lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89(4):821-829.
- (16) Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 1992; 176(6):1489-1495.
- (17) Lee NA, Gelfand EW, Lee JJ. Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology? *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(6):945-957.
- (18) Rankin JA, Harris P, Ackerman SJ. The effects of eosinophil-granule major basic protein on lung-macrophage superoxide anion generation. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89(3):746-752.
- (19) Rohrbach MS, Wheatley CL, Slifman NR, Gleich GJ. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *J Exp Med* 1990; 172(4):1271-1274.
- (20) Coffey P KLSPMM. Immune functions of eosinophil. In: Lambrecht B HMDZ, editor. *The immunological bases of asthma*. New York-Basel: Ed. Dekker, 2003: 147-188.
- (21) Bellanti JA. Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc* 1998; 19(6):337-341.
- (22) Abbas AK LAPJ. Cytokines. In: Ed.Saunders, editor. *Cellular and molecular Immunology*. Philadelphia: 2000: 235-269.
- (23) Del Prete G, de Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993; 150(2):353-360.
- (24) Redington AE, Roche WR, Holgate ST, Howarth PH. Co-localization of immunoreactive transforming growth factor-beta 1 and decorin in bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *J Pathol* 1998; 186(4):410-415.
- (25) Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342(18):1350-1358.

- (26) Bignola A BJ. Airway remodelling as the outcome of a chronic immune response to an inhaled antigen. In: Lambrecht BN HHDZ, editor. The immunological basis of asthma. Dekker: New Cork-Basel, 2003: 543-569.
- (27) Fishman S HKBL. Molecular biology of cytokines in allergic diseases and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 16:613-635.
- (28) 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(1):61-70.
- (29) Nakao A. Is TGF-beta1 the key to suppression of human asthma? *Trends Immunol* 2001; 22(3):115-118.
- (30) 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(4):768-776.
- (31) Britt EJ, Cohen B, Menkes H, Bleecker E, Permitt S, Rosenthal R et al. Airways reactivity and functional deterioration in relatives of COPD patients. *Chest* 1980; 77(2 Suppl):260-261.
- (32) Los H, Koppelman GH, Postma DS. The importance of genetic influences in asthma. *Eur Respir J* 1999; 14(5):1210-1227.
- (33) 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. 1986. *J Immunol* 2005; 175(1):5-14.
- (34) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603):787-793.
- (35) Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103(2):175-183.
- (36) Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994; 265(5179):1701-1706.
- (37) Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326(5):298-304.
- (38) Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a

- distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(5):1497-1504.
- (39) Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH et al. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(2 Pt 1):215-222.
- (40) Holt PG. Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S151-S156.
- (41) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344(5):350-362.
- (42) Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol* 1998; 10(10):1421-1433.
- (43) Shi HZ, Deng JM, Xu H, Nong ZX, Xiao CQ, Liu ZM et al. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(6 Pt 1):1818-1821.
- (44) Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103(6):779-788.
- (45) Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G et al. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(6 Pt 1):1407-1413.
- (46) Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M et al. Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13(1):54-59.
- (47) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282(5397):2258-2261.
- (48) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5):1720-1745.
- (49) Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1592-1600.
- (50) 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(1):128-136.

- (51) Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 2006; 25(8):1125-1142.
- (52) 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(6):750-756.
- (53) 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(10):5986-5992.
- (54) Moriuchi M, Moriuchi H. YY1 transcription factor down-regulates expression of CCR5, a major coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* 2003; 278(15):13003-13007.
- (55) Gordon S AGGHBB. Transcription factor YY1: structure, function and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 2005;1-18.
- (56) 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(4):431-435.
- (57) 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(1):93-97.
- (58) Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 1999; 65(1):220-228.
- (59) 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(1):128-136.
- (60) 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(2):214-219.
- (61) Sepulveda MA, Emelyanov AV, Birshtein BK. NF-kappa B and Oct-2 synergize to activate the human 3' Igh hs4 enhancer in B cells. *J Immunol* 2004; 172(2):1054-1064.
- (62) Hongo F, Garban H, Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi AR, Mizutani Y et al. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(2):692-701.

