



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE EN HIPOXIA
(HIF-1) PROMUEVE LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

GUILLERMINA JULIANA BAAY GUZMAN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SARA HUERTA YEPEZ



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

México D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Annie Pardo Cemo

VOCAL: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

SECRETARIO: Dra. Sara Huerta Yopez

1^{er} SUPLENTE: Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez

2^o SUPLENTE: Dra. Yolanda López Vidal

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Sara Huerta Yopez

SUSTENTANTE: Q.F.B. Guillermina Juliana Baay Guzmán

Este trabajo fue realizado en:

- Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.
- Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del CMN "La Raza" IMSS.
- Department of Pathology and Laboratory Medicine, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA.
- Department of Clinical Immunology and Allergy, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA.
- Pulmonary and Critical Care Medicine, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA.

El proyecto fue financiado por CONACYT (No de proyecto 48020), Fondos Federales (No proyecto HIM/2008/018), UC-MEXUS CONACYT (No de proyecto CN08-178). La alumna recibió beca de CONACYT (195431).

La alumna pertenece al Posgrado en ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

A ti mami, por formar a la mujer que ahora soy, por apoyarme siempre incondicionalmente y ser esa guía y pilar en mi vida, dándome seguridad y confianza para lograr lo que sea siempre y cuando uno se lo proponga ayudados del esfuerzo y dedicación. Te quiero mucho mami.

A mi papá y abuelos que nos cuidan desde el cielo, a mi tía Nelly y a toda mi familia por su gran apoyo.

A ti Salvador por ser ese gran hombre que me apoya y es el pilar que me alienta a seguir adelante y ser una mejor persona día a día, y por darnos el gran regalo de ser padres. Gracias mi amor.

A ti mi pequeño amor, mi hija que aun sin nacer me has cambiado la vida y eres la razón para seguir adelante.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, Gaby, Belén, Jesús (los muéganos), Karla, Erandi, Norma, Marco, Dany, Ricardo, Dr. Aquino, Dra. Carmen y en especial a Rosendo, por compartir más que un lugar de trabajo ya que pasamos más tiempo juntos que con cualquier otra persona, compartiendo no solo experiencias laborales sino de vida y al final formamos una gran familia.

A todas las personas que han estado involucradas en mi formación y que me han dado un buen jalón de orejas siempre que ha sido necesario, en particular gracias al Dr. Rogelio, Dr. Eduardo y a Mario.

A ti Sara no solo por ser mi madre científica guiándome y batallando conmigo durante todo este tiempo, sino por ser algo más que una tutora, una amiga y confidente escuchándome, dándome palabras de aliento y un buen regaño siempre que ha sido necesario, además de formar parte de tu familia. Gracias por todo.

A todos los ratones que han dado su vida para la ciencia haciendo posible este trabajo.

A Dios por darme el gran regalo de la vida y permitirme que esta sea maravillosa.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	1
Abreviaturas	3
Resumen	4
Abstract	5
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	19
Objetivo general	20
Objetivos particulares o específicos	21
Materiales y Métodos	22
Reactivos y anticuerpos	22
Animales	25
Diseño experimental	25
1) <i>Evaluación de la expresión de HIF-1 durante una cinética de inflamación alérgica pulmonar.</i>	25
2) <i>Evaluación de la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizando un fármaco inhibidor de su actividad.</i>	26
3) <i>Evaluación de la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizando ratones en los que se indujo la eliminación del gen HIF-1 β (Cre+loxP-ARNT).</i>	26
4) <i>Evaluación de la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizando un fármaco que aumenta su expresión.</i>	26
5) <i>Evaluación de la expresión de HIF-1 en pacientes asmáticos antes y después del reto alérgico.</i>	27
Histología pulmonar y análisis morfométrico en los modelos murinos	28
Inmunohistoquímica y análisis morfométrico.	29
Cuenta diferencial de lavados bronquioalveolares (LBA)	30

Determinación en suero de IgE OVA-especifica	30
Análisis estadístico	31
Resultados	32
Sección 1. Aumento de la expresión de HIF-1 α en el modelo experimental de inflamación alérgica pulmonar.	32
Sección 2. La inhibición de la actividad de HIF-1 induce disminución de la inflamación alérgica pulmonar, mediante la modulación farmacológica con 2ME2.	38
Sección 3. La inhibición de la expresión de HIF-1 induce disminución de la inflamación alérgica pulmonar: Mediante Ensayos empleando ratones “knock out” inducibles de HIF-1.	47
Sección 4. La inducción de la expresión de HIF-1- α incrementa la inflamación alérgica pulmonar: Ensayos con el fármaco EDHB.	57
Sección 5. El reto alérgico induce la expresión de HIF-1 en pacientes asmáticos.	64
Discusión	68
Conclusiones	72
Referencias	73
Anexo	80

Hypoxia Inducible Factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. Allergy. 2011 Jul;66(7):909-918. Epub 2011 Apr 26.

What is hypoxia-inducible factor-1 doing in the allergic lung? Allergy. 2011 Jul;66(7):815-7.

2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. Clin Immunol. 2008 Nov;129(2):313-24. Epub 2008 Sep 14.

Contribution of hypoxia in pulmonary tissue remodeling in asthmatic processes. Rev Alerg Mex. 2008 Jan-Feb;55(1):18-32

ÍNDICE DE FIGURAS

Sección 1

Figura 1A. Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar a OVA.	34
Figura 1B. Caracterización del modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.	35
Figura 1C. Incremento de la remodelación pulmonar generado por la inflamación alérgica.	36
Figura 1D. Incremento de la expresión de HIF-1 α durante la inflamación alérgica pulmonar.	37

Sección 2.

Figura 2A. Modelo de inhibición de inflamación alérgica pulmonar mediante el tratamiento con 2ME2. Tratamiento con 2ME2 en el modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.	40
Figura 2B. El tratamiento con 2ME2 reduce el infiltrado inflamatorio en el modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.	41
Figura 2C. El tratamiento con 2ME2 disminuye la producción de moco.	42
Figura 2D. El tratamiento con 2ME2 disminuye la remodelación pulmonar.	43
Figura 2E. El tratamiento con 2ME2 induce disminución de las células inflamatorias en LBA.	44
Figura 2F. El tratamiento con 2ME2 disminuye la expresión de la proteína VEGF.	45
Figura 2G. El tratamiento con 2ME2 disminuye la IgE OVA específica.	46

Sección 3.

Figura 3A. Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar a OVA.	50
Figura 3B. Incremento de la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α durante la inflamación alérgica pulmonar en ratones C57BL/6.	51
Figura 3C. Inhibición de la expresión de HIF-1 β en el modelo murino de inflamación alérgica pulmonar, en ratones KO inducibles por el sistema Cre-loxP.	52

Figura 3D. La delección de HIF-1 β disminuye la inflamación alérgica pulmonar.	53
Figura 3E. La expresión de la proteína VEGF disminuye en los ratones alérgicos con la delección de HIF-1 β .	54
Figura 3F. La delección de HIF-1 β induce la disminución de las células inflamatorias en LBA.	55
Figura 3G. La delección de HIF-1 β disminuye la IgE e IgG1 OVA específica.	56

Sección 4

Figura 4A. Potenciación de la expresión de HIF-1 α en el modelo experimental.	59
Figura 4B. La sobreexpresión de HIF-1 incrementa el infiltrado inflamatorio inducido por OVA.	60
Figura 4C. Inducción de inflamación pulmonar por la simulación de hipoxia.	61
Figura 4D. El tratamiento con EDBH induce la sobreexpresión de HIF-1 α en el modelo de inflamación alérgica pulmonar.	62
Figura 4E. El tratamiento con EDBH induce la sobreexpresión de VEGF en el modelo de inflamación alérgica pulmonar.	63

Sección 5

Figura 5A. Exposición alérgica de pacientes con asma.	65
Figura 5B. La exposición al reto alérgico induce el incremento de las proteínas HIF-1 α y VEGF en LBA de pacientes.	66
Figura 5C. La exposición al reto alérgico induce el incremento de las proteínas HIF-1 α y VEGF en tejido pulmonar de pacientes.	67

ABREVIATURAS

2ME2	2-Metoxiestradiol
2OG	2-oxoglutarato
ALUM	Hidróxido de aluminio
EDHB	Etil-3,4 dihidroxibenzoato
Fel d1	1 ^{er} alérgeno presente en los gatos
FEV1	volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FIH-1	Factor inhibidor de HIF-1
FVC	Capacidad vital forzada
GINA	Iniciativa global para el asma (Global Initiative for Asthma)
HE	Hematoxilina y Eosina
HER	Elementos respondedores en hipoxia
HIF-1	Factor Inducible en hipoxia 1
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratraqueal
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IOD	Intensidad de la densidad óptica
ISSAC	Estudio Internacional de asma y alergia en niños (International Study of Asthma and Allergy in Childhood)
LBA	Lavado bronquioalveolar
ng/m²	Nanogramos por metro cuadrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVA	Ovoalbumina de huevo
PBS	Solución buffer de fosfatos
PHD	Prolilhidroxilasa
pIpC	Ácido polinosin-policitidílico
SFB	Suero fetal bovino
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VHL	Von Hippel-Lindau

RESUMEN

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, que afecta a 300 millones de personas a nivel mundial. La prevalencia en México en niños de entre 6-7 años es de 8.6%, en tanto que en niños de 13-14 años varía de 6.6 a 11.6%. El asma genera altos costos de atención y una mala calidad de vida de los sujetos que la padecen, además de que los tratamientos existentes son paliativos por lo que el asma continúa siendo un problema de salud mundial. Por ello entender mejor la fisiopatogenia del asma ayudara a desarrollar nuevos y mejores tratamientos. Ejemplo de ello es el factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1), el cual ha sido ampliamente estudiado en patologías como el cáncer, sin embargo se ha reportado que HIF-1 se encuentra elevado en sujetos asmáticos y que este correlaciona con el incremento del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) uno de sus genes blanco. Este factor es regulado principalmente en condiciones de hipoxia pero en los últimos años se le ha asociado en procesos inflamatorios.

Por ello, fue de nuestro interés evaluar la participación de HIF-1 α , en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar (IAP), encontrando que la expresión de HIF-1 α correlacionaba con el grado de daño pulmonar. También evaluamos en nuestro modelo las consecuencias de la modulación farmacológica de la actividad de HIF-1 α , utilizando 2-Metoxiestradiol (2ME2) para inhibir o Etil-3,4 dihidroxibenzoato (EDHB) para inducir su actividad. Los resultados mostraron que el 2ME2 reduce los cambios característicos de la IAP, en tanto que el EDHB los potencia. Estos hallazgos fueron consistentes con los obtenidos al utilizar ratones “knock out” inducibles para HIF-1 β , en los que examinamos su capacidad para desarrollar IAP y observamos que al estar inhibida la actividad de HIF-1, la IAP disminuye en comparación con los ratones que tienen normal la actividad de este factor, disminuyendo también la expresión de VEGF y la producción de IgE e IgG1 OVA específica. Finalmente, evaluamos la expresión de HIF-1 y VEGF, en pacientes alérgicos antes y después de ser expuestos al alérgeno, encontrando un incremento de ambas proteínas ante la exposición al alérgeno.

Con estos resultados concluimos que el factor de transcripción HIF-1 tiene un papel importante en el desarrollo de la IAP, además de demostrar por primera vez que HIF-1 α incrementa en pacientes asmáticos post reto.

Por lo que proponemos que HIF-1 participa en la fisiopatogenia del asma y podría ser un potencial blanco terapéutico en esta enfermedad.

ABSTRACT

Asthma is a chronic airway inflammation disease and represents a global health problem. A better understand the pathophysiology of asthma will help to develop new and better treatments against this disease. A candidate for study is the transcription hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which increases in asthmatic subjects compared with healthy subjects and correlates with increased vascular endothelial growth factor (VEGF) of its target genes. This factor is mainly regulated under hypoxic conditions but in recent years has been associated with inflammatory processes.

In this study we evaluated the role of HIF-1 alpha using a murine model of allergic airway inflammation (AAI), our findings shown that the expression of HIF-1 alpha correlated with the degree of lung damage. Accordingly a significant reduction of AAI was observed when the mice were treated with 2-methoxyestradiol (2ME2) a compound that down-regulate HIF-1 alpha, and enhanced AAI was observed when was used ethyl-3,4-dihydroxybenzoate (EDHB) a compound that up-regulate HIF-1 alpha. Studies using mice with inducible knockdown of HIF-1 beta, analyzed in their ability to induce a lung allergic inflammatory response after intratracheal exposure to ovalbumin, showed that inhibition of the HIF-1 activity decreased the AAI compared with wild type mice, and also decreased the expression of VEGF, IgE and IgG1 OVA specific. Finally, a patient studies showed that the expression of both HIF-1 and VEGF were increased in allergic patients after exposure to the allergen.

Our results support the notion that HIF-1 is directly involved in the development of AAI. Most importantly, we demonstrate for the first time that HIF-1 alpha is increased after challenge in patients with asthma.

ANTECEDENTES

Definición

El asma alérgica es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, en donde se encuentran involucradas múltiples células y productos celulares: en particular mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T, macrófagos y células epiteliales. La etiología del asma es multifactorial. Uno de los principales aspectos es la atopia, la cual se define como la predisposición genética del individuo (1;2) a inducir una respuesta de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE a factores ambientales como los alérgenos que son antígenos no parasitarios inocuos para la mayoría de la población (3). Por lo que, en individuos susceptibles, esta inflamación causa episodios recurrentes de tos (particularmente en las noches o temprano por las mañanas), sibilancias, disnea y opresión torácica. Estos episodios están usualmente asociados con obstrucción de flujo aéreo variable, que es siempre reversible ya sea espontáneamente o con tratamiento (4). Esta respuesta se ve exacerbada por la contribución de factores de tipo no alérgicos como la dieta materno-infantil, infecciones respiratorias, contaminación ambiental y estado ocupacional (5).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye el asma entre las principales enfermedades crónicas que representan prioridades de salud pública en todo el mundo. Afectando a más de 300 millones de personas en el mundo (6-8). En la década de los 90`s a partir de una iniciativa en Nueva Zelanda, se estableció una herramienta para medir y comparar la prevalencia de asma y otras enfermedades alérgicas. Se trata del estudio internacional del asma y enfermedades alérgicas en niños (ISAAC, International Study of Asthma and Allergy in Childhood), que por medio de un cuestionario, identifica la presencia de la enfermedad y factores relacionados con el estilo y calidad de vida (9). A través de este instrumento se ha establecido que la frecuencia mundial de asma varía entre países y regiones. A nivel mundial, la prevalencia actual del asma es de 13.7% en el grupo de 13-14 años y de 11.6% para los escolares entre 6-7 años (10;11).

En Estados Unidos se ha reportado una prevalencia de 115/1000 personas, afectando a 23 millones de personas en USA (8 de cada 100). Aproximadamente 1/350 afro-americanos, 1/32,000 hispano-americanos (estados del oeste), 1/1000 hispano-americanos (estados del este) (12).

En México la prevalencia en el grupo de 6-7 años se mantuvo estable con una variación mínima de 8.6% para la fase inicial y 8.4% en la última reportada. El grupo de 13-14 años tuvo una variación importante de 6.6 a 11.6% (10;11). El ISAAC se ha aplicado en varias ciudades de nuestro país, que corresponden a la zona norte, centro y sur, siendo esta última la más afectada. Las ciudades de Mérida, Tabasco y Ciudad Victoria reportan un 12%, mientras que en el Distrito Federal se reporta un 9.9% en adolescentes y 8.5% en escolares (13). Es importante enfatizar que aunque México no se encuentra dentro de los primeros lugares a nivel mundial en asma, si contamos con mayor frecuencia de síntomas de asma grave (10).

Fisiopatología

La inflamación de la vía aérea mediada por IgE (14) es un proceso complejo en el que hay una respuesta de tipo Th2 produciendo citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, respuesta que se inicia al tener una exposición por primera vez con un alérgeno, provocando la síntesis y secreción de anticuerpos IgE por las células plasmáticas (15). Estos se unen a sus receptores Fc en los mastocitos en tejido y en basófilos circulantes, así como en los eosinófilos que son activados vía IL-5 (14;16).

En subsecuentes exposiciones al mismo alérgeno, este entrecruza con las inmunoglobulinas en la superficie de las células, lo que provoca la liberación de mediadores inflamatorios preformados como son la histamina, heparina, serotonina, triptasa, citocinas Th2 (IL-3, IL-5, IL-9 e IL-13) (17), estableciendo así la fase temprana en minutos. Esta fase se caracteriza por contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular (vasodilatación) e hipersecreción de moco (18).

La fase tardía de la reacción (4 a 6 horas después) está dada por la producción de derivados del ácido araquidónico como leucotrienos y prostaglandinas, que provocan contracción sostenida del músculo liso, vasodilatación y agregación plaquetaria. Aunado a lo anterior hay secreción de citocinas IFN γ y TNF α y quimiocinas como CCL2, CCL5, CCL11 y CXCL12 entre otras, que son responsables de la obstrucción de las vías aéreas por reclutamiento de eosinófilos mediadores de la inflamación crónica alérgica, linfocitos Th2 CD4, macrófagos y neutrófilos (19). Con esto se produce una reacción inflamatoria sostenida (20). Los eosinófilos por su parte contribuyen al mantenimiento de la respuesta alérgica y del daño al tejido; en su interior contiene gránulos con enzimas proteolíticas, como la proteína básica mayor, la proteína catiónica eosinofílica, neurotóxina derivada del

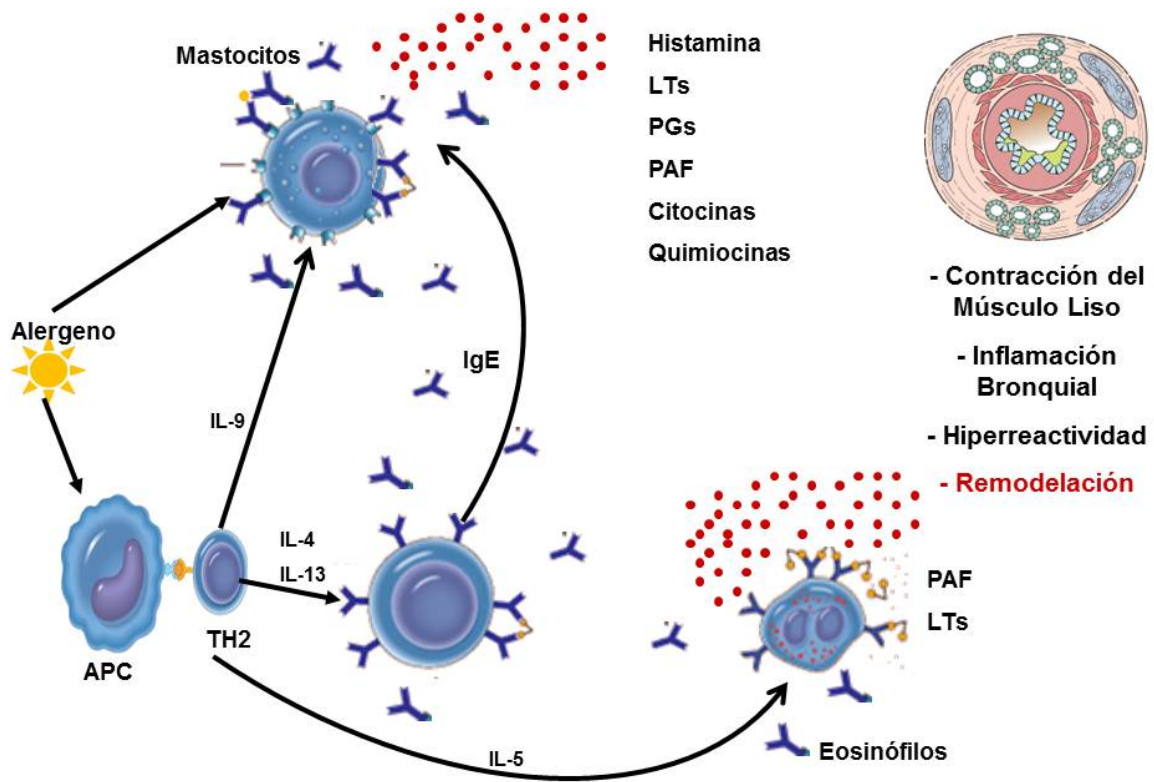
eosinófilo y la peroxidasa eosinofílica, estas son liberadas al ser activados causando daño el epitelio de la vía aérea de manera directa, intensificando la respuesta bronquial y estimulando la degranulación de mastocitos y basófilos (16;19;21).

Adicionalmente, el daño que se genera por los mediadores inflamatorios sobre el epitelio de la vía aérea, estimula la generación de factores de crecimiento tisular y vascular. Estos factores promueven la proliferación y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos para secretar colágeno intersticial, causando los cambios estructurales de la remodelación pulmonar (22).

Dentro del síndrome del asma se encuentra las alteraciones anatomofuncionales de obstrucción del flujo aéreo, la hiperreactividad bronquial, la inflamación y remodelación. La obstrucción del flujo aéreo está dada por el aumento del músculo liso bronquial causado por la hiperplasia e hipertrofia celular. El broncoespasmo es la respuesta súbita que tiene como vía efectora el músculo liso generando la contracción del mismo ante diversos estímulos, ocasionando el estrechamiento de la vía aérea con disminución del flujo (23).

La hiperreactividad bronquial es la respuesta exagerada que induce un broncoespasmo mucho más intenso del que se observa en individuos normales, que son expuestos a los mismos estímulos (Exposición a la metacolina). Para considerar a un paciente como hiperreactor bronquial es necesario que presente una disminución del volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV1) de 15% ante la exposición controlada a estímulos (24). La inflamación y remodelación en el epitelio respiratorio está dado por un edema de la submucosa, con infiltrado celular, angiogénesis de los vasos, dilatación y congestión, e hipertrofia e hiperplasia de músculo liso, lo que contribuye a la obstrucción de la vía aérea (23;25).

A continuación se muestra un esquema muy general de la respuesta inmunológica generada en el asma alérgica, que ocasionan cambios en el tejido pulmonar.



Esquema 1: Respuesta inmune en el asma alérgica

Sintomatología

Los síntomas de la enfermedad son: tos persistente, disnea episódica y variable que se relaciona con la intensidad del cuadro, opresión torácica, la cual es común que empeore en las primeras horas de la mañana y durante las noches. Entre los episodios los pacientes pueden cursar asintomáticos. Por lo que los síntomas son de carácter episódico y cursa con exacerbaciones que ceden espontáneamente o con tratamiento farmacológico. Los síntomas se pueden presentar lentamente o de forma súbita (26).

Diagnóstico

Está basado en la historia clínica, los antecedentes hereditarios, el entorno social y ambiental, además de un examen físico exhaustivo. Se realizan estudios de laboratorio y función pulmonar que sirven de apoyo diagnóstico. Las técnicas objetivas más empleadas en la clínica, son la pletismografía, esta prueba permite medir el volumen residual, que es el volumen que queda en el pulmón después de expulsar todo el aire y la capacidad pulmonar total que es el volumen contenido en el tórax después de una inspiración máxima, y la espirometría, que mide el volumen y la velocidad del aire que se moviliza desde los pulmones hacia el exterior, durante una maniobra de espiración forzada.

Con estas pruebas se obtienen: La capacidad vital forzada (FVC), volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), flujo espiratorio forzado obtenido de la capacidad 25-75% de la capacidad vital exhalada (FEF 25-75%) y la relación FEV1/FVC% (Índice de Tiffeneau) (24). Para esta técnica se utiliza un espirómetro, que muestra de manera numérica y gráfica una curva de flujo/volumen y una de volumen/tiempo con el aire espirado e inspirado.

Cuando se encuentra una reversibilidad mayor al 12% del FEV1 se considera un dato sugestivo de asma, pero el cambio mayor o igual al 15% es significativo (6).

Clasificación del asma

El asma se clasifica en intermitente, leve persistente, moderada persistente y grave persistente: (26;27)

	INTERMITENTE	LEVE PERSISTENTE	MODERADA PERSISTENTE	GRAVE PERSISTENTE
Síntomas	menos de una vez a la semana	más de una vez a la semana pero menos de una vez al día	diarios	diarios
Exacerbaciones	cortas	pueden afectar actividad diaria y el sueño	pueden afectar actividad y el sueño	frecuentes hay limitación física para actividades
Síntomas Nocturnos	no más de dos veces al mes	más de 2 veces al mes	más de una vez a la semana, es necesario el uso diario de β_2 adrenérgicos de acción corta	frecuentes
FEV1 o FEP	$\geq 80\%$ del predicho	$\geq 80\%$ del predicho	60-80% del predicho	$\leq 60\%$ del predicho
FEP o FEV1	con variabilidad $< 20\%$	con variabilidad $< 20-30\%$	con variabilidad $> 30\%$	con variabilidad $> 30\%$

Tratamiento

La eficacia clínica dependerá en gran medida de la adherencia al tratamiento. Debe de incluir varios puntos importantes, entre los que se encuentran: Evitar alérgenos e irritantes desencadenantes, control ambiental, educación de los padres y al paciente, farmacoterapia e inmunoterapia.

De acuerdo a sus acciones, los fármacos utilizados se pueden dividir en dos grupos: 1.- los medicamentos sintomáticos o de rescate, que carecen de efecto antiinflamatorio y no

modifican la reactividad bronquial (β_2 adrenérgicos y anticolinérgico) y 2.- los que tienen actividad antiinflamatoria y disminuyen la reactividad bronquial (esteroides sistémicos e inhalados, antagonistas de los receptores de leucotrienos).

Los estudios han demostrado que los esteroides inhalados mejoran rápidamente y marcadamente los síntomas clínicos y la función pulmonar a bajas dosis en la mayoría de los pacientes con enfermedad leve, son considerados los tratamientos de primera línea en casos de asma crónica (26).

Crisis asmática

Episodios agudos o subagudos de deterioro progresivo con tos, sibilancias, dificultad respiratoria, respiración entrecortada o alguna combinación de estos síntomas (26).

Pueden ser desencadenadas por alérgenos, infecciones, humo de tabaco, contaminación, ejercicio, estrés, aire frío, medicamentos y cambios hormonales. Durante la crisis asmática se debe clasificar a los pacientes según la clasificación de la Iniciativa global para el asma (GINA) (26).

En el tratamiento de las crisis asmáticas es fundamental limitar la progresión de la enfermedad hacia la insuficiencia respiratoria. El tratamiento incluirá oxígeno, líquidos, agonistas β_2 , nebulizaciones, esteroides sistémicos, teofilina, sulfato de magnesio; los medicamentos serán elegidos según la gravedad de la crisis (26).

El tratamiento para el asma es únicamente paliativo o de control de la enfermedad, hasta el momento no existe un tratamiento curativo para esta enfermedad. Por tal motivo es de suma importancia entender mejor la fisiopatogenia del asma, para identificar los factores que inician, intensifican y modulan la respuesta inflamatoria en las vías aéreas. Además, conocer más de los procesos inmunológicos y biológicos que inducen el daño en tejido pulmonar característicos de la enfermedad.

Asma y angiogénesis

Se sabe que uno de los procesos más importantes que suceden en el asma es la angiogénesis, la cual se define como el crecimiento y proliferación de vasos sanguíneos de neoformación. Este proceso contribuye al edema (28). Además de tener un papel

preponderante en la remodelación del tejido, pues al existir un incremento de la masa pulmonar, es necesario incrementar la vasculatura para oxigenar el tejido en crecimiento, sin olvidar que ya existe una deficiencia en el funcionamiento pulmonar, lo que ocasiona un estado de hipoxia en el tejido afectado (29;30).

Concretamente, la hipoxia fisiológica o patológica es una causa de remodelación pulmonar y es un potente estímulo para la activación de la expresión de factores angiogénicos y citocinas, liberados por células endoteliales (30-32) el principal regulador de la angiogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular “Vascular endotelial grow factor” (VEGF) como mediador de la fibrosis y además participa en el engrosamiento de las membranas basales de las células epiteliales de las vías aéreas en pacientes asmáticos (33). Se sabe que VEGF juega un papel muy importante en la fisiopatogenesis de esta enfermedad (34-36). Se ha visto que la administración de un inhibidor del receptor de VEGF en un modelo murino de asma, reduce los signos de la patofisiología del asma y la disminución de la metaloproteínasa 9 (MMP-9), por lo que tiene un papel crucial en la iniciación y mantenimiento de la enfermedad (35).

Se ha observado que en estados de hipoxia los niveles de mRNA de VEGF se incrementan rápidamente (37) y utilizando técnicas de microarreglo de DNA se observó que la hipoxia sobrerregula la expresión de diversos factores angiogénicos como la angiopoyetina, el factor de crecimiento de plaquetas y los VEGFs, con lo que se induce la proliferación de nuevos vasos sanguíneos en el pulmón (38). También se sabe que HIF-1 regula de manera transcripcional la expresión de VEGF (37;39;40).

Factor inducible en Hipoxia.

El factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1) por sus siglas en inglés “Hypoxic Inducible Factor”, fue descrito en 1991 por el grupo de Semenza al identificarse la eritropoyetina (EPO) responsable de la eritropoyesis como el primer gene regulado por HIF-1 y con ello reportaron la secuencia consenso de unión al DNA descrita como los elementos respondedores a hipoxia (HRE) 5’-(A/G)CGTG-3’ (41;42). Hasta la fecha se ha reportado que este factor de transcripción regula la transcripción de más de 150 genes involucrados en procesos tan diversos como angiogénesis, eritropoyesis, metabolismo energético,

glicólisis, apoptosis, crecimiento celular, supervivencia, movilidad celular y quimiotaxis (37;41-48).

Este factor es el principal regulador de la homeostasis del oxígeno y hasta hace unos 5 años se creía que este se regulaba esencialmente en procesos de hipoxia que es la falta de oxígeno tisular, la cual se presenta cuando los niveles de oxígeno son menores a los requeridos para el mantenimiento fisiológico de la tensión de O₂ en los tejidos, (49). Sin embargo, en los últimos años se han generado evidencias de que HIF-1 es regulado en procesos de inflamación (50-53).

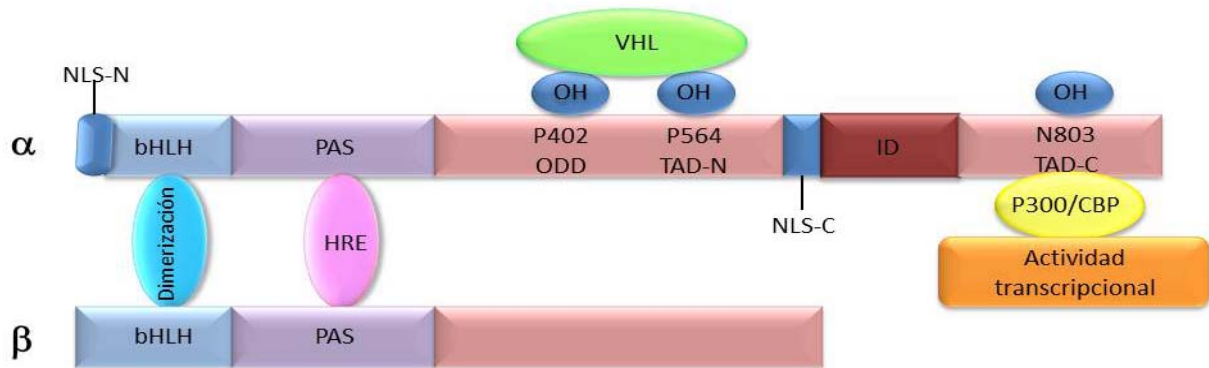
HIF-1 es un heterodímero constituido por dos subunidades α y β , HIF-1 α es la subunidad inducible en hipoxia, tiene una vida media de 1-2 minutos en condiciones de normoxia (54), esto porque su expresión solo se incrementa en estados de hipoxia, dificultando la detección de la proteína (55). Sin embargo, el mRNA se puede encontrar de forma constitutiva y no se altera por los cambios de oxígeno (56). HIF-1 β previamente identificada como ARNT (Aryl hydrocarbon receptor translocator) (57) es la subunidad constitutiva, pues no se afectan los niveles de mRNA ni de proteína por hipoxia (58;59).

Con respecto a su regulación, el primer paso es la detección de cambios de oxígeno, la cual se lleva a cabo por un sensor de oxígeno que hidroxila dos residuos de prolina (P402 y P564) (60), que se localizan en el dominio de degradación dependiente de O₂ (ODD) además se hidroxila una asparagina (N803), la cual se localiza en el dominio de transactivación C-terminal (C-TAD). Esta hidroxilación permite la unión del inhibidor de HIF-1 (FIH-1) y con ello evita la unión del co-activador p300/CBP (61). Por su parte, la hidroxilación de las dos prolina, favorece la unión de la proteína Von Hippel Lindau VHL (62) y con esto da la señal para la ubiquitinación por el complejo E3-ubiquitin-ligasa y su subsecuente degradación por el proteasoma 26S (63).

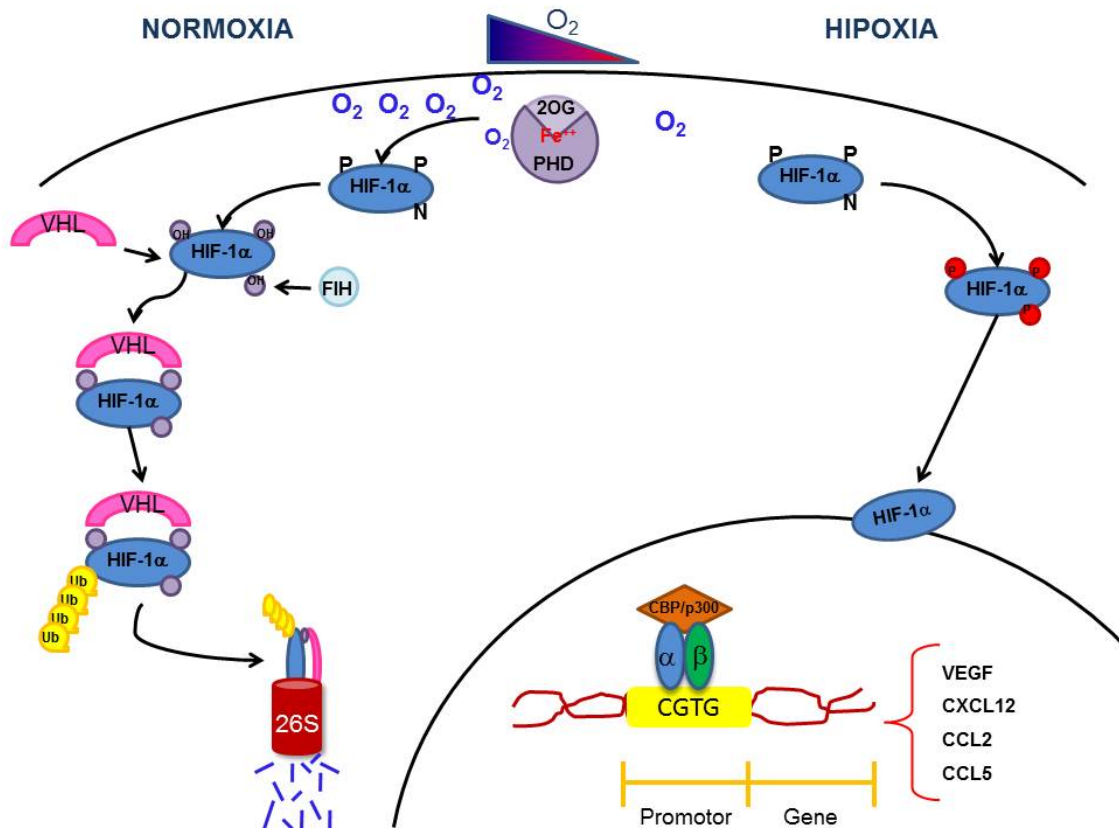
Por otro lado, en estado de hipoxia estas hidroxilaciones no se producen, lo que permite que la subunidad α sea translocada al núcleo, mediante la participación de dos motivos NLS localizados uno en el dominio bHLH y el otro en el extremo C-terminal de la proteína, lo que es crucial para su importación al núcleo (64). Una vez translocada, la subunidad α dimeriza con la subunidad β , permitiendo la unión a los elementos respondedores en hipoxia (HER) que tienen una secuencia consenso 5'-(A/G)CGTG-3' a la que

posteriormente se le une el co-activador p300/CBP (65), permitiendo la transcripción de diversos genes.

HIF-1 es esencial para el desarrollo embrionario y de la placenta, y su carencia produce defectos en angiogénesis siendo esta la razón por la que ratones “knock out” para ambas subunidades no son viables (57).



Esquema 2: Dominios de las proteínas HIF-1 α y HIF-1 β .



Esquema 3. Regulación del factor de transcripción HIF-1. La regulación está mediada por un sensor de oxígeno constituido por la enzima prolilhidroxilasa, Fe^{2+} , O_2 y 2-oxoglutarato (2OG), el cual en estado de normoxia, hidroxila a HIF-1 α permitiéndole ser ubiquitinizado y degradado por proteasoma, en tanto en estados de hipoxia, la subunidad α es fosforilada y transloca al núcleo transcribiendo sus genes blanco.

HIF-1 ha sido ampliamente estudiado en diversos padecimientos en los que existe hipoxia como hipertensión pulmonar, infartos y principalmente en cáncer, en los que ha sido un blanco terapéutico y recientemente en artritis reumatoide una enfermedad esencialmente inflamatoria(50-53). Existen pocos reportes de la participación de HIF-1 en asma. En el 2006, el grupo de Kim y cols., publicaron el primer reporte del incremento de HIF-1 α y HIF-2 α en biopsias de pacientes asmáticos obtenidas por broncoscopia, en comparación con

los controles (66). Además este incremento correlaciona con los niveles en suero de VEGF el cual como ya se menciona es regulado de manera transcripcional por HIF-1 (37;39;40) y es el principal mediador de la angiogénesis (66).

Sin embargo, la participación de este factor de transcripción HIF-1 en la inflamación alergia pulmonar y sus implicaciones en la fisiopatogenia de esta enfermedad no ha sido dilucidada por completo. Por ello, en este trabajo se evaluó la participación de HIF-1 en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar utilizando diferentes estrategias para modificar su expresión, usando un modelo murino bien caracterizado de esta enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la cinética de expresión del factor HIF-1 durante el curso de la enfermedad en el modelo experimental antes mencionado, en una segunda parte del presente estudio se evaluó el curso de la enfermedad posterior a la supresión farmacológica de la actividad de HIF-1 (2-metoxiestradiol, 2ME2), y por el uso de ratones “knock out” inducible para HIF-1 β . Además de estudiar el efecto de una droga que induce la expresión de HIF-1 α (etil-3,4 dihidroxibenzoato, EDHB) y la administración combinada del tratamiento que inhibe e induce la actividad de este factor de transcripción.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica con episodios agudos de obstrucción del flujo de aire que a largo plazo provoca remodelación del tejido pulmonar. En la actualidad, afecta aproximadamente al 10% de la población mundial generando altos costos de atención y la mala calidad de vida de los pacientes, por lo que continúa siendo un problema de salud pública, además de que los tratamientos actuales no son muy efectivos pues solo son paliativos.

VEGF participa de manera importante en la remodelación del tejido pulmonar y este es regulado por el factor de transcripción HIF y se ha reportado que los niveles de HIF se encuentran elevados en pacientes con asma.

Sin embargo hasta el momento no está claro el papel de HIF en la fisiopatogenia del asma, por lo que entender mejor la participación de este factor en la inflamación alérgica pulmonar es muy importante para el desarrollo de terapias efectivas.

HIPÓTESIS

El factor de transcripción HIF-1 participa en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar a través de la regulación de sus genes blanco (VEGF), por lo que la modulación de su actividad tendrá un impacto directo en esta enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del factor de transcripción HIF-1, en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar, utilizando diferentes estrategias para modificar su expresión.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la expresión de HIF-1 α en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.
2. Evaluar la inflamación alérgica pulmonar después de la inhibición farmacológica de HIF-1.
3. Evaluar la inflamación alérgica pulmonar en un modelo “Knock out” inducible de HIF-1 β .
4. Evaluar la inflamación alérgica pulmonar después de la inducción farmacológica de HIF-1.
5. Evaluar la expresión de HIF-1 en pacientes alérgicos posterior al reto alérgico.

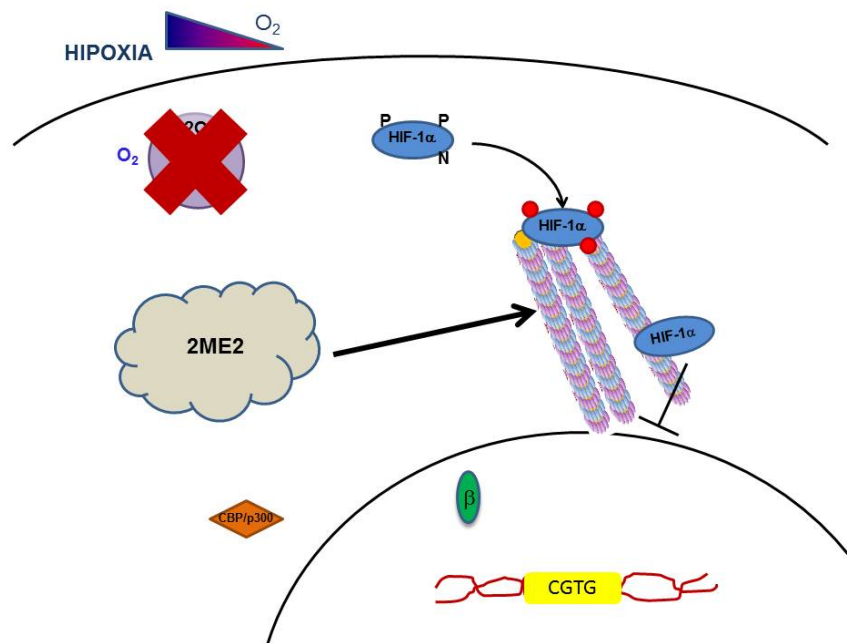
MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

1) Ovoalbumina (OVA) grado V, obtenida de la compañía Sigma Aldrich (St. Louis, MO. USA). Fue utilizada como alérgeno en la inducción de la inflamación alérgica pulmonar experimental.

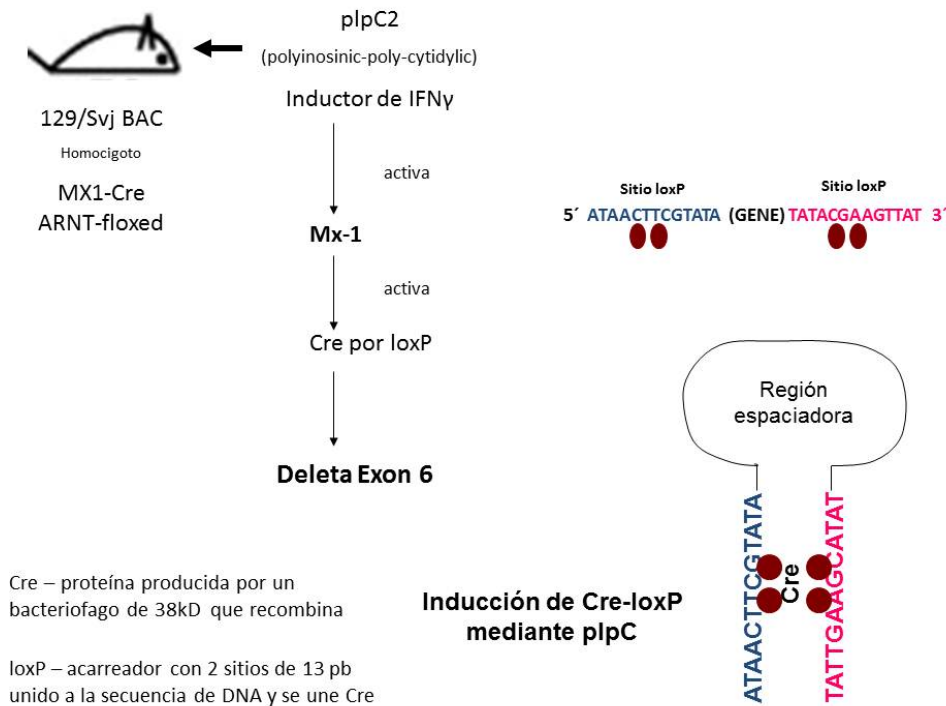
2) Hidróxido de aluminio (alum), adquirido de Pierce Biotechnology (Rockford, IL. USA) y que se utilizó como adyuvante.

3) 2-Metoxiestradiol (2ME2) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO. USA) que se utilizó para el tratamiento de los animales en el modelo de inhibición de la actividad de HIF-1 α . El 2ME2 es un metabolito natural del 17 β -estradiol, se han propuesto diferentes mecanismos de acción, uno de ellos es por la inhibición de la polimerización de los microtubulos de tubulina, impidiendo la translocación al núcleo de la subunidad α . También se ha visto que causa el arresto del ciclo celular en las fases G₂/M, con la subsecuente inducción de la apoptosis.



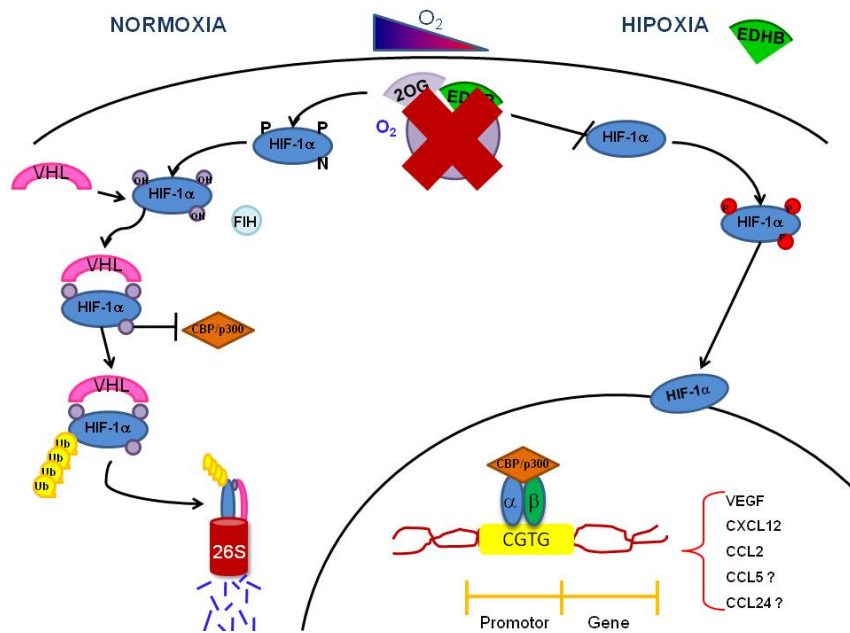
Esquema 4. 2ME2 inhibe la actividad de HIF-1 α . El 2-metoxiestradiol (2ME2) desestabiliza la polimerización de microtúbulos, evitando así la translocación de la subunidad α al núcleo en estado de hipoxia.

4) Acido polinosin-policitidilico (plpC) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO. USA), que se empleo para la inducción de la deleción de HIF-1 β en el modelo de los ratones “knock out”. Este fármaco induce la expresi3n de la prote3na Cre, la cual se une a los sitios loxP que flanquean el ex3n 6 del gen de HIF-1 β , necesario para la dimerizaci3n con la subunidad. Al unirse Cre a loxP se forma una estructura en asa, dejando fuera de la transcripci3n a este sitio cuando se lleva a cabo la recombinaci3n hom3loga.



Esquema 5. Deleción inducible de HIF-1 β por el sistema Cre-loxP. Los animales son inoculados con plpC2 induciendo la expresi3n de IFN γ , el cual activa transcripcionalmente la prote3na Cre que es codificada por el gen Mx-1. As3 las prote3nas Cre se unen a los sitios complementarios loxP, formando una regi3n espaciadora que no es codificante.

5) Ethyl-3,4 dihydroxybenzoate (EDHB) de Sigma Aldrich (St. Louis, MO. USA), el cual simula hipoxia debido a que inhibe la acción de la enzima prolil-hidroxilasa responsable de la hidroxilación de HIF-1 α , necesaria para su degradación por proteasoma, de esta forma se promueve la acumulación de la proteína en citoplasma, lo cual permite su translocación al núcleo y la unión a la subunidad β y transcripción de los genes blanco.



Esquema 6. Mecanismo de acción del EDHB. El EDHB se une a la prolilhidroxilasa compitiendo con el 2 oxoglutarato y de esta forma inactiva la función enzimática, por lo que HIF-1 α no es degradada, permitiendo la acumulación de HIF-1 α en citoplasma, simulando estados de hipoxia.

6) Anticuerpos anti-HIF-1 α , anti-VEGF y anti-cabra conjugado a biotina, que se adquirieron en la compañía Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, USA) y se utilizaron para realizar las tinciones de inmunohistoquímica

Animales

Ratones Balb/c, ratones machos de entre 6 y 8 semanas de edad, fueron obtenidos y mantenidos en un ambiente libre de patógenos en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMN). Los ratones se mantuvieron en un cuarto de temperatura controlada con ciclos de 12 hrs de oscuridad y 12 hrs de luz, se alimentaron con comida y agua estéril. Todos los experimentos se realizaron bajo las normas de ética para el manejo de animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMN).

Ratones Cre+ARNT. Ratones “knock out” inducibles para la HIF-1 β , machos de 6 a 10 semanas, fueron previamente generados y evaluados (67) y fueron proporcionados por el Dr. Oliver Hankinson del departamento de Patología de la Universidad de California de Los Angeles (UCLA), EU. Estos ratones se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los ratones Balb/c. Todos los experimentos se realizaron bajo las normas de ética para el manejo de animales de UCLA.

Diseño experimental

1) Evaluación de la expresión de HIF-1 durante una cinética de inflamación alérgica pulmonar.

Se utilizó un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar previamente descrito por nuestro grupo de trabajo (68). Brevemente, ratones BALB/c fueron sensibilizados vía intraperitoneal (i.p) en los días 0 y 5, con 10 μ g de OVA emulsificada en 1 mg de alum. Posteriormente los ratones fueron retados los días 12, 22, 32 con 0.75% de OVA en SS vía intratraqueal (i.t), los ratones fueron sacrificados en el día 42, para evaluar la inflamación alérgica pulmonar (figura1A).

2) Evaluación de la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizando un fármaco inhibidor de la actividad de este factor de transcripción.

Con el propósito de evaluar la participación HIF-1 en inflamación alérgica pulmonar utilizamos 2ME2, que se sabe bloquea la actividad de HIF- α , pues inhibe la translocación al núcleo de este factor de transcripción. Los ratones sensibilizados como se describió anteriormente, recibieron 2 retos en los días 12 y 22. En los días 24, 26 y 28 los ratones fueron tratados con 30 mg/kg de 2ME2 por vía i.t. y fueron sacrificados el día 32. El grupo control fue manejado de la misma forma que el grupo problema, pero solo recibió SS (Figura 2A).

3) Evaluación de la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizando ratones en los que se indujo la eliminación del gen HIF-1 β (Cre+loxP-ARNT).

Con el propósito de evaluar la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar de una manera más directa, utilizamos ratones en los que genéticamente se puede inhibir la expresión de HIF-1 β . Se realizó el modelo de inflamación alérgica pulmonar en los ratones C57BL/6, sensibilizando i.p. los días 15 y 20 y retando a los animales vía i.t. en tres ocasiones los días 28, 38 y 48, sacrificando por exanguinación el día 52 (Figura 3A). Para inducir la inhibición de HIF-1 β en los días 0, 3 y 6 los ratones recibieron 500 μ g plpC vía i.p. Posteriormente en los días 15 y 20, los animales son sensibilizados administrándoles 10 μ g de OVA + 1 mg de alúmina vía i.p., después el día 28 y 38 recibieron los retos con OVA al 0.75% vía i.t., fueron sacrificados el día 32 (Figura 3C).

4) Evaluación de la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizando un fármaco que aumenta la expresión de este factor de transcripción.

Con el propósito de evaluar el efecto de la sobre-expresión de HIF-1 α , en la inflamación alérgica pulmonar, utilizamos EDHB la cual es un fármaco que inhibe la

degradación de este factor de transcripción, al competir con el 2-oxoglutarato necesario para la activación de la prolil hidroxilasa, enzima responsable de la hidroxilación de la subunidad α en condiciones de normoxia.

Para ello, utilizamos el modelo experimental ya mencionado, y realizamos el siguiente esquema de sensibilización, tratamiento y retos. En los días 0 y 5 los animales fueron sensibilizados con 10 μ g de OVA + 1 mg de hidróxido de aluminio, vía i.p. Posteriormente recibieron 2 retos en los días 12 y 22 en los que se les administró OVA al 0.75% vía i.t., el día previo a cada reto (días 11 y 21), los ratones recibieron 100 mg/kg de EDHB vía i.p. Finalmente los animales fueron sacrificados el día 26. El grupo control fue manejado de la misma forma que el grupo problema, pero solo recibió SS (Figura 4A).

5) Evaluación de la expresión de HIF-1 en pacientes asmáticos antes y después del reto alérgico

El procedimiento para la obtención de muestra de pacientes asmáticos, se realizó en su totalidad en la Unidad de Inmunología y Alergia de la Universidad de California, Los Angeles (UCLA). Se trata de un procedimiento aprobado por el comité de ética de dicha universidad. Las muestras fueron enviadas a nuestro laboratorio para su estudio. Se incluyeron once pacientes con asma alérgica a la caspa de gato, con grado de severidad de leve o moderada (6 mujeres y 5 hombres, con una media de edad de 18.5 ± 7.0 años, media de FEV1 de $96\% \pm 8\%$).

A estos pacientes se les realizó un estudio de broncoscopía en donde se les tomo una biopsia endobronquial y un lavado bronquioalveolar (LBA). Tres días después los pacientes fueron expuestos en un cuarto con gatos (tres gatos obtenidos del bioterio), durante una hora o cuando sus valores de FEV1 disminuyeron un 20%, lo que ocurriera primero (la concentración de la primer proteína alérgica presente en los gatos, Fel d 1 fue de $17.2 \pm 5.8 \text{ ng/m}^2$ de aire). Tres días después del reto fueron sometidos una broncoscopía en donde se les tomo una biopsia endobronquial y lavado bronquioalveolar (Figura 5A). Dos de las biopsia endobronquiales fueron obtenidas al

azar de la sección segmental carinii, estos se fijaron en paraformaldehído, transferidos a etanol al 70% y después embebidos en parafina.

Los lavados bronquioalveolares (LBA) fueron tomados con solución salina en el subsegmento medio del lóbulo derecho. De manera subsecuente fueron instilados e inmediatamente aspirados con una jeringa 14, 40 y 50 ml de solución salina. El volumen total aspirado se filtró a través de un filtro de 100 μ y puestos en hielo. El LBA fue centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, el botón celular fue resuspendido en suero fetal bovino (SFB), y mediante una citocentrífuga se prepararon laminillas con 100,000 células por laminilla. Posteriormente fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H/E) para realizar conteo diferencial o fijarlas en paraformaldehído al 4%; las muestras fueron almacenadas en refrigeración (4°C) en PBS para su posterior tinción por inmunocitoquímica.

Histología pulmonar y análisis morfométrico en los modelos murinos

Después de sacrificar a los animales por exanguinación, los pulmones fueron perfundidos vía i.t. con 1 ml de etanol absoluto. Los especímenes perfundidos se fijaron por 24 horas y posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación para ser embebidos en parafina. Para su análisis histológico se hicieron cortes seriados de 4 μ utilizando un micrótopo rotatorio modelo 2165 Leica (Leica, Nussloch, Alemania). De estos se hicieron tinciones de H/E para ver la estructura pulmonar e infiltrado inflamatorio, tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) para observar la presencia de células caliciformes productoras de moco y la tinción tricromica de Masson para distinguir el colágeno presente, se realizó el análisis morfométrico de cada tinciones por microscopia de luz (Olympus BX-40) a un aumento de 40X y usando un analizador automático de imágenes (Leica Qwin).

A partir de las tinciones de H/E se midió el área de infiltrado inflamatorio seleccionando vasos con un diámetro de 100-200 μ m y bronquios con 150-300 μ m de diámetro. Se analizaron cuatro vasos sanguíneos y cuatro bronquios del tejido pulmonar de los seis ratones de cada grupo. Los resultados se muestran en promedio y las desviaciones

estándar del área infiltrada por células inflamatorias ($200 \mu\text{m}^2$). Para la tinción de PAS se midió el área positiva al PAS en μm , en bronquios con 150-300 μm . Se analizaron cinco bronquios de cuatro a seis cortes de pulmón por cada grupo experimental y los resultados se expresaron en promedio y desviaciones estándar de área positiva al PAS. Se usó la tricromía de Masson para determinar el depósito de colágeno y el engrosamiento del músculo liso en el pulmón en μm en cuatro áreas seleccionadas al azar en cada ratón por cada grupo.

Inmunohistoquímica y análisis morfométrico.

Se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para HIF-1 α , y VEGF en cortes de pulmón de 4 μm , previamente desparafinados. Posteriormente, se realizó la recuperación de antígenos, utilizando una solución de citrato de sodio al 0.01% de pH 6.0, durante 15 min en ebullición. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con una solución al 3% de H_2O_2 con metanol durante 25 minutos. La unión inespecífica de los anticuerpos se redujo al incubar con una solución al 2% de suero normal de cerdo en PBS (PBS-SNC) durante 60 min. Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos contra el HIF- 1 α (1: 250) (Biotecnología de Santa Cruz, Santa Cruz, CA), o VEGF (1:750) (Santa Cruz). Al día siguiente, las laminillas se lavaron cinco veces en PBS 0.1 M pH 7.4 durante 8 min. Después del lavado, las laminillas se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado que reconoce al primero (Anti-cabra IgG 1:500) Santa Cruz, durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguida por una incubación con streptavidina conjugada a HRP (LSAB de la corporación DAKO), durante 30 min a temperatura ambiente. Para desarrollar el color se utiliza 3,3' tetra-hidrocloruro diaminobenzidina (DAB líquido, Corporación DAKO) de uno a cinco min. La reacción fue detenida con agua destilada y las laminillas se contra tiñeron con Hematoxilina. Finalmente los tejidos son deshidratados mediante baños de etanol (70, 90 y 100%) en xileno y conservado con un medio Mount E-2 (laboratorio Shandon, Pittsburg, PA, Estados Unidos), y analizadas en un microscopio óptico a 40X (Olympus BX-40). A fin de reducir la variabilidad, todas las muestras de cada grupo se procesaron al mismo tiempo en un solo experimento usando una sola alícuota de anticuerpos diluida en PBS-SNC.

El análisis morfométrico de la tinción de inmunohistoquímica de HIF-1 α y VEGF se realizó mediante un analizador cuantitativo automático, en el cual se determinó la densidad de la expresión en pixeles/200 μm^2 de los infiltrados perivasculares y peribronquiales, epitelio bronquial y de intersticios, incluyendo 4 campos por laminilla de por cada ratón en los diferentes grupos. De los datos obtenidos se calculó la media por cada ratón y luego por grupo. Los resultados se analizaron por ANOVA considerando significativo una p igual o menor de 0.05.

Cuenta diferencial de lavados bronquioalveolares (LBA)

Después de sacrificar a los ratones por exanguinación, se expuso la tráquea para ser intubada con un catéter de polietileno a través de la cual se administró 1 ml de SS y se aspiró realizando lavados para recolectar las células bronquio-alveolares. Las células del lavado fueron recolectadas por centrifugación (500Xg durante 10 min. a 4°C), se contó el número de células y se realizó una dilución a 1×10^5 células/ml. Por cada animal se prepararon seis frotis que se tiñeron con H/E efectuando un conteo diferencial de cada grupo. El análisis se efectuó por microscopia de luz a 40X y se contaron 200 células/laminilla. El resultado se presenta como el promedio de células/ml por grupo.

Determinación en suero de IgE OVA-especifica

Los niveles en suero de IgE OVA especifica fueron determinados por ELISA mediante un "kit" comercial de MD Bioscience (St. Paul, MN, USA). El análisis fue realizado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La especificidad de la ELISA fue corroborada mediante la utilización de suero proveniente de ratones no inmunizados, en los cuales no se encontraron niveles detectables de unión al antígeno OVA. La reacción calorimétrica fue desarrollada mediante la adición de OPD en buffer de sustratos (Sanofi Diagnostic Pasteur). La reacción fue detenida con 50 μl de H_2SO_4 . La densidad óptica fue determinada a 495 nm.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el paquete Prisma[®], los cuales fueron expresados en promedios \pm desviación estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron usando una prueba de ANOVA para la diferencia entre grupos. Se determinaron diferencias significativas entre los grupos usando una t de students. La prueba de Pearson fue utilizada para determinar correlaciones. Una $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

RESULTADOS

Sección 1. Aumento de la expresión de HIF-1 α en el modelo experimental de inflamación alérgica pulmonar

Con el propósito de evaluar la expresión de HIF-1 α en mi modelo de inflamación alérgica pulmonar previamente descrito por nuestro grupo de trabajo (68) realizamos una cinética de sacrificio, como se muestra en detalle en la figura 1A. Después de sacrificar los animales, los pulmones fueron obtenidos y preparados para su análisis histológico y para la evaluación de la expresión de HIF-1 en el infiltrado inflamatorio pulmonar, mediante inmunohistoquímica. En la figura 1B, se presentan imágenes representativas de tinciones de H/E (1B a-h) en donde se muestra el infiltrado de células inflamatorias en áreas perivasculares (1B a-d) y peribronquiales (1B e-h) en los distintos tiempos incluido en la cinética de sacrificio arriba mencionados, a los 10 días (1B b y f), 20 (1B c y g) y 40 días (1B d y h). Los resultados muestran de manera clara un aumento significativo del infiltrado tanto perivascular (1B, panel intermedio izquierdo), como peribronquial (1B, panel intermedio derecho), cuando se compara con el grupo control que solo recibió SS (1B a y e). De manera interesante el infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquial disminuye de forma importante a medida que aumenta el tiempo de sacrificio.

La medición de producción de moco mediante la tinción de PAS (1B i-l), se ve incrementada de manera significativa después del reto alérgico con OVA (1B j,k,l) en comparación con el grupo control que solo recibió SS (1B i), pero esta producción de moco disminuye gradualmente en los días 20 y 40 después del último reto. Esta disminución fue estadísticamente significativa como se observa en el panel inferior de la figura 1B ($p < 0.05$, ANOVA/TUKEY).

Por otro lado, también nos interesó evaluar el proceso de remodelación del tejido pulmonar, durante nuestra cinética de tiempo. Utilizando la tinción tricromica de Masson (1C a-h), observamos el engrosamiento de las paredes de vasos (b-d) y bronquios (f-h) en comparación con el grupo control (a y e), lo cual denota remodelación del tejido. El aumento fue estadísticamente significativo (1C, panel inferior). Interesantemente, en comparación con el infiltrado inflamatorio y la producción

de moco en donde, como ya se mencionó, existe una disminución en los días 20 y 40 pos-reto, la remodelación del tejido incremento de manera proporcional al tiempo. Observándose mayor remodelación en el día 40 (d y h).

Después de evaluar los cambios del tejido pulmonar de la cinética de tiempo, se evaluó cómo se encontraba la expresión de la subunidad inducible HIF-1 α , para lo cual evaluamos mediante ensayos de inmunohistoquímica, la expresión de dicha proteína en el tejido pulmonar (vasos 1D a-c y bronquios 1D e-h). En las estructuras evaluadas se observó un aumento en la expresión de HIF-1 α después del reto alérgico (vasos b-d y bronquios f-h) en comparación al grupo control (a y e). Principalmente en macrófagos, células epiteliales y células del músculo y en menor grado en linfocitos, predominantemente a nivel nuclear. Es importante mencionar, que la expresión de este factor de transcripción al igual que la remodelación del tejido pulmonar incrementa con respecto al tiempo. En la figura 1D panel inferior, se presentan los resultados de la cuantificación de las células HIF-1 α positivas en donde se observa que el aumento en la expresión de este factor de transcripción es estadísticamente significativo respecto a los controles con SS y con respecto al tiempo ($p < 0.05$, ANOVA/TUKEY).

Los resultados anteriores en conjunto, sugieren que HIF-1 α puede tener un papel importante durante la inflamación alérgica pulmonar y en los procesos de remodelación.

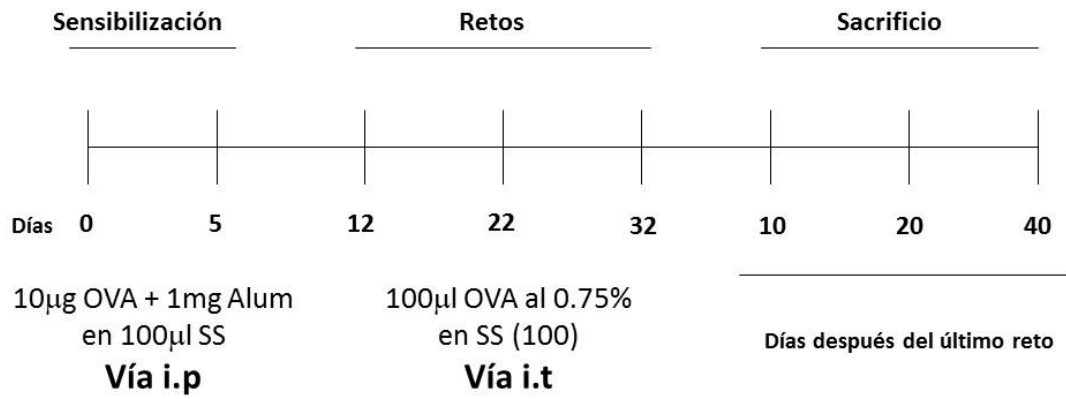


Figura 1A. Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar a OVA. Ratones BALB/c machos fueron sensibilizados vía i.p. (días 0 y 5), retados vía i.t (días 12, 22 y 32) y se sacrificaron por exanguinación en una cinética de tiempo, los días 10, 20 y 40 posteriores al último reto (día 42,52 y 72).

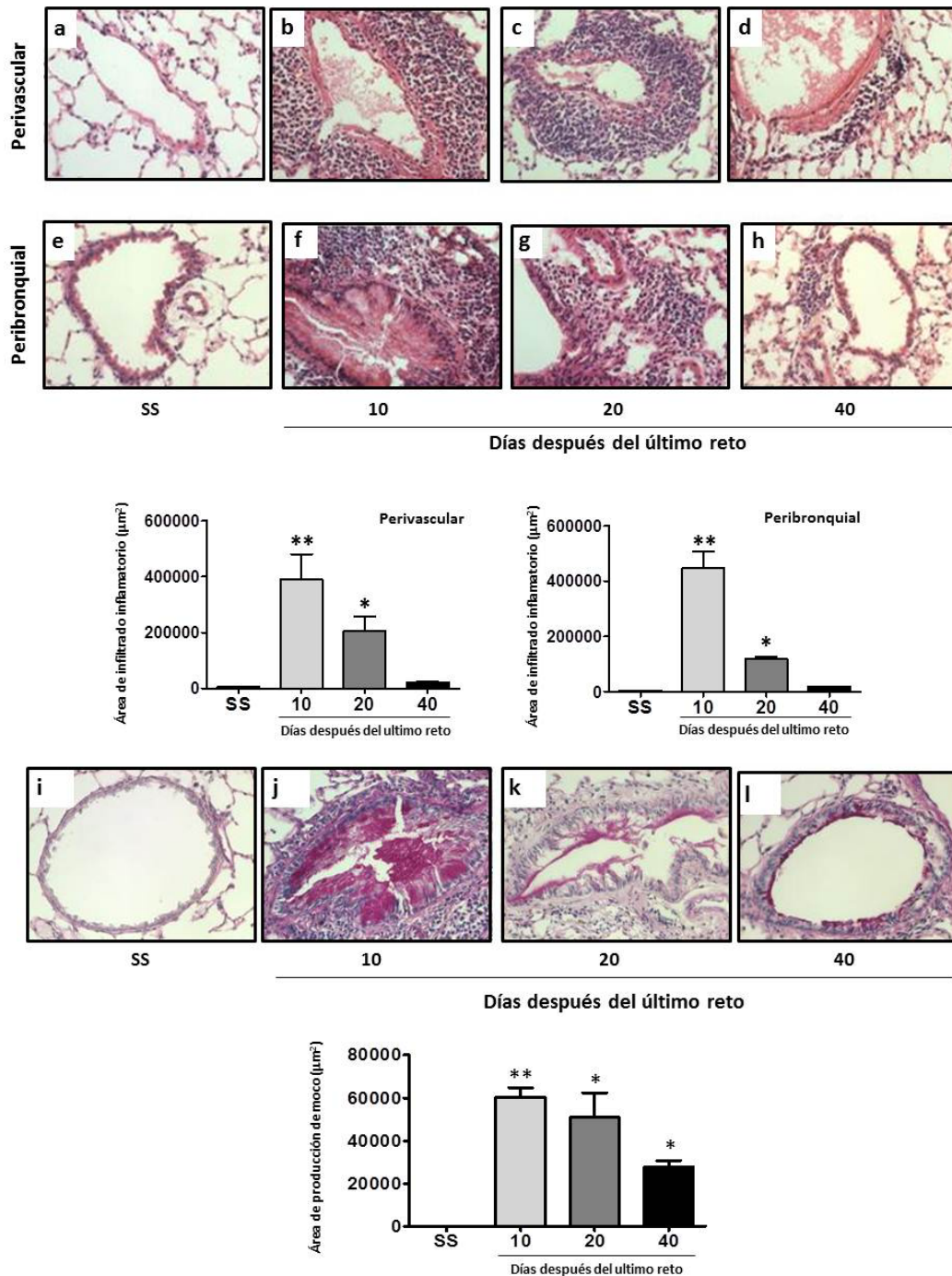


Figura 1B. Caracterización del modelo murino de inflamación alérgica pulmonar. Mediante el análisis morfométrico en el que se muestran micrografías representativas de cortes de tejido pulmonar con la tinción de HE, en el que se observa el infiltrado perivascular (a-d) y peribronquial (e-h). De estos se realizó el análisis morfométrico del área del infiltrado inflamatorio (panel superior e intermedio derecho). Se muestran micrografías representativas de la determinación de la producción de moco por la tinción de PAS en la cinética de sacrificio (i-l), así como el análisis del área de moco (panel inferior derecho). Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar. * $p = 0.05$, ** $p = 0.005$ ratones que recibieron OVA vs SS (ANOVA).

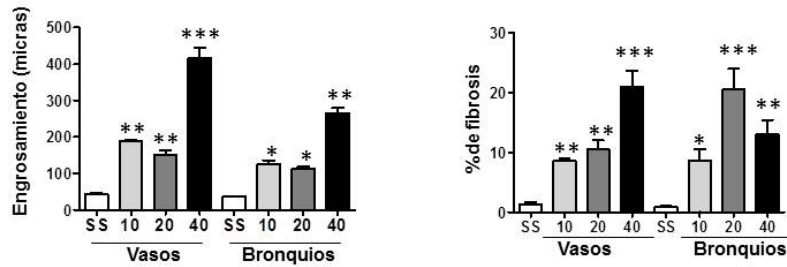
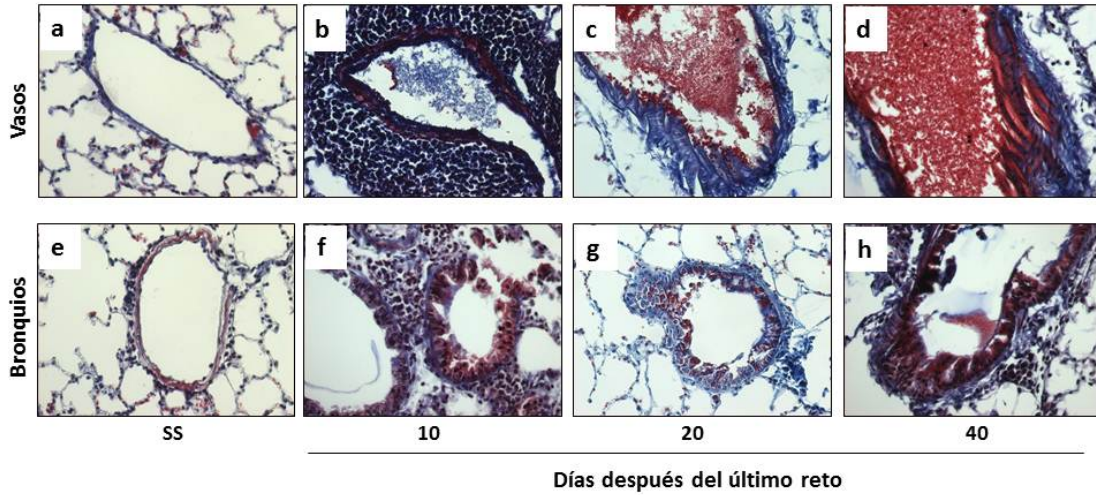


Figura 1C. Incremento de la remodelación pulmonar generado por la inflamación alérgica. Micrografías representativas de la tinción tricrómica de Masson, de vasos (a-d) y bronquios (e-h) que nos permite la cuantificación del engrosamiento de vasos y bronquios por la hiperplasia del musculo liso (panel inferior izquierdo) y depósito de colágeno por el porcentaje de fibrosis (panel inferior derecho) que se muestra en el análisis cuantitativo. Las diferencias son estadísticamente significativas. Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar. * $p= 0.05$, ** $p= 0.005$, *** $p=0.0005$ ratones que recibieron OVA vs SS (ANOVA/TUKEY).

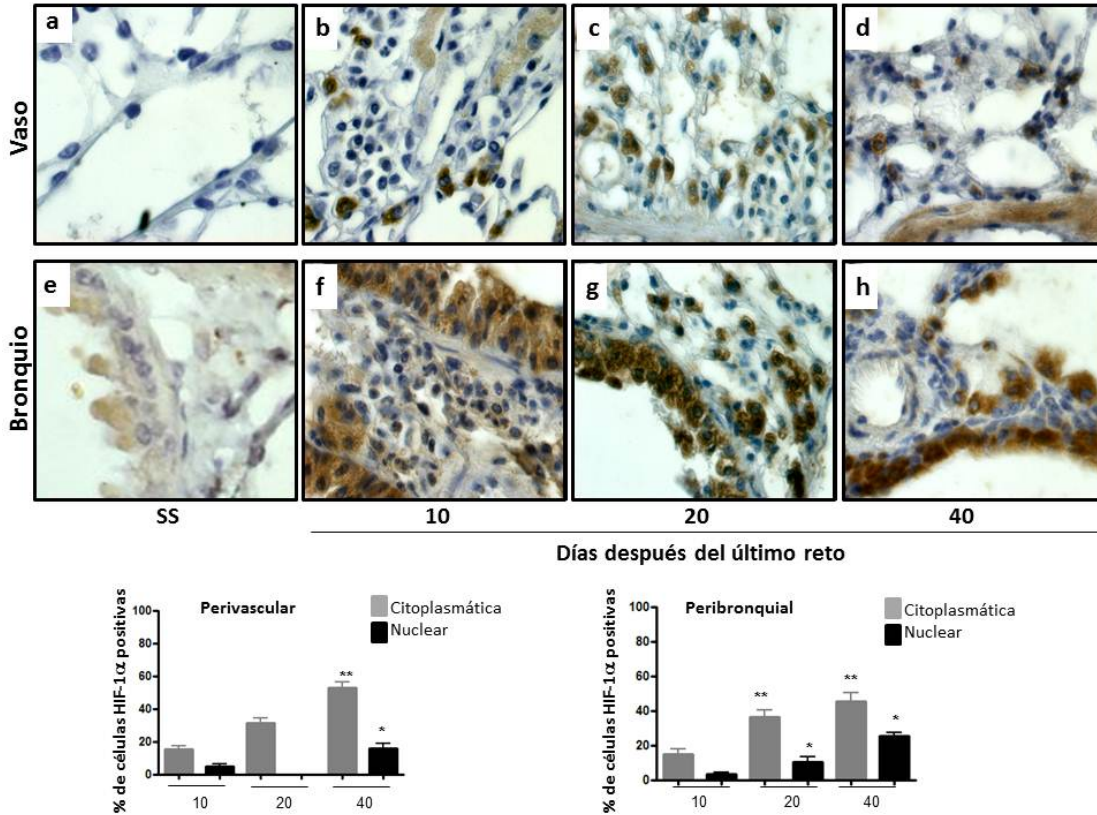


Figura 1D. Incremento de la expresión de HIF-1 α durante la inflamación alérgica pulmonar. Micrografías representativas de cortes de tejido pulmonar en los que se muestra la expresión de HIF-1 α en el infiltrado perivascular (a-d), y peribronquial (e-h), así como en el grupo control de SS (a y e). En los días de sacrificio 10 (b y f), 20 (c y g) y 40 (d y h) posteriores al último reto (100X). De esta inmunotinción se realizó el análisis cuantitativo del porcentaje de células positivas para HIF-1 α en citoplasma y núcleo, para el infiltrado perivascular (panel inferior izquierdo) y peribronquial (panel inferior derecho). En donde se observa un aumento significativo de la expresión de esta proteína con respecto al tiempo. Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar del número de células positivas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ ratones que recibieron OVA a los diferentes días de sacrificio vs SS (ANOVA/TUKEY).

Sección 2. La inhibición de la actividad de HIF-1 induce disminución de la inflamación alérgica pulmonar, mediante la modulación farmacológica con 2ME2

Con el propósito de evaluar la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizamos 2ME2 (69). En la figura 2A, se muestra el modelo de inflamación alérgica pulmonar y tratamiento con 2ME2. En la figura 2B (panel superior), se presentan micrografías representativas de las tinciones con H/E para evidenciar el aumento del infiltrado inflamatorio inducido por OVA (b y e) presente a nivel perivascular (b) y peribronquial (e), en comparación con el grupo control (a y d). De manera interesante, los resultados muestran una disminución del infiltrado inflamatorio en los animales retado con OVA y tratados con 2ME2 (OVA+2ME2) (c y f). En el panel inferior de la figura 2B, presentamos el análisis cuantitativo de infiltrado inflamatorio, en donde se observa una disminución estadísticamente significativo ($p < 0.05$ tratados vs no tratados, ANOVA). En la Figura 2C (panel superior) se muestran micrografías representativas de la tinción de PAS, en la que se puede observar una disminución en la producción de moco y de la hiperplasia de células caliciformes en los animales alérgicos tratados con 2ME2 (c) en comparación con los animales no (b). Cuando realizamos el análisis cuantitativo (panel inferior) observamos que la diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$ tratados vs no tratados). La remodelación del tejido pulmonar fue evaluada mediante tinción de Masson (Figura 2D) en donde se midió el engrosamiento del músculo liso y la fibrosis pulmonar (depósito de colágeno). Los resultados indican que el reto alérgico induce la remodelación pulmonar como ya lo habíamos demostrado (b y e). De manera importante observamos que el tratamiento con 2ME2 induce una disminución de la remodelación en vasos (c) y bronquios (f), esto fue estadísticamente significativo tanto en el engrosamiento del músculo liso (panel inferior izquierdo), como en la fibrosis pulmonar (panel inferior derecho ($p < 0.05$ tratados vs no tratados, ANOVA/TUKEY).

Por otro lado, el tratamiento con 2ME2 induce disminución de las células inflamatorias en LBA. En la figura 2E, se observa una reducción de la presencia de eosinófilos y neutrófilos, en el caso de los linfocitos esta disminución es estadísticamente

significativa en el grupo OVA+2ME2, en comparación al grupo de animales alérgicos no tratados OVA (* $p=0.0365$ tratados vs no tratados) (t student).

Se sabe que HIF-1 regula de manera trascricional la expresión de VEGF (37;39;40), por esa razón, nos preguntamos si el tratamiento con 2ME2 tenía un efecto en la expresión de esta citocina. La figura 2F muestra micrografías representativas de la expresión de VEGF a nivel perivascular (a-c) y peribronquial (d-f) en ratones alérgicos no tratados (b y e) y tratados (c y f). Se aprecia que el tratamiento con 2ME2 disminuye de manera importante la expresión esta citocina. Al realizar el análisis cuantitativo, demostramos que esta disminución fue significativa tanto a nivel perivascular (panel inferior izquierdo), como a nivel peribronquial (panel inferior derecho) ($p<0.05$ tratados vs no tratados, ANOVA/TUKEY).

Uno de los principales marcadores de la alergia es la elevada presencia de IgE sérica antígeno específica. Por lo que fue de nuestro interés evaluar por ELISA el efecto del tratamiento con 2ME2 en la producción de anticuerpos IgE OVA específicos en el suero de los animales alérgico tratados y no tratados. La figura 2G muestra una discreta pero significativa disminución en los niveles de esta IgE en los ratones tratados con 2ME2. ($p<0.05$ tratados vs no tratados, t student).

Los resultados anteriores demuestran que la inhibición de la actividad de HIF-1 mediante la modulación farmacológica con 2ME2, resulta en la disminución de parámetros característicos generados durante la inflamación alérgica pulmonar. Por lo que se sugiere que HIF-1 está participando de manera importante en la fisiopatogenesis de esta enfermedad.

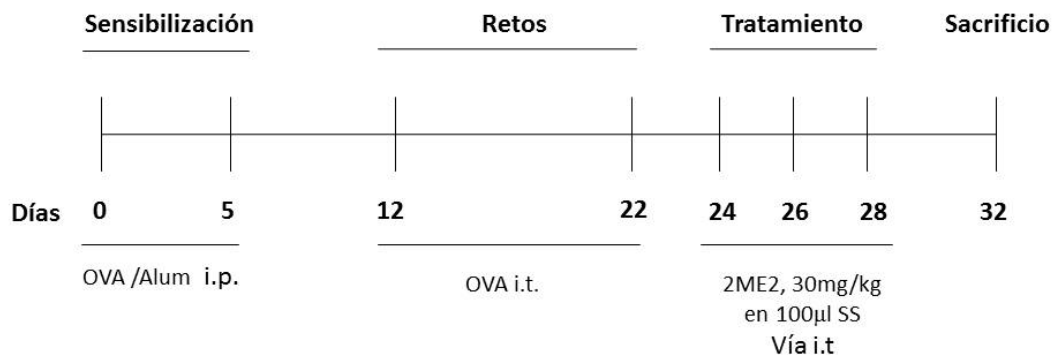


Figura 2A. Modelo de inhibición de inflamación alérgica pulmonar mediante el tratamiento con 2ME2. El efecto de la administración i.t de 2ME2 fue evaluado en los animales sensibilizados con OVA vía i.p los días 0 y 5, y posteriormente se les administro dos retos con OVA vía i.t. los días 12 y 22; en el contexto de inmunoterapia los animales recibieron 2ME2 los días 24, 26 y 28.

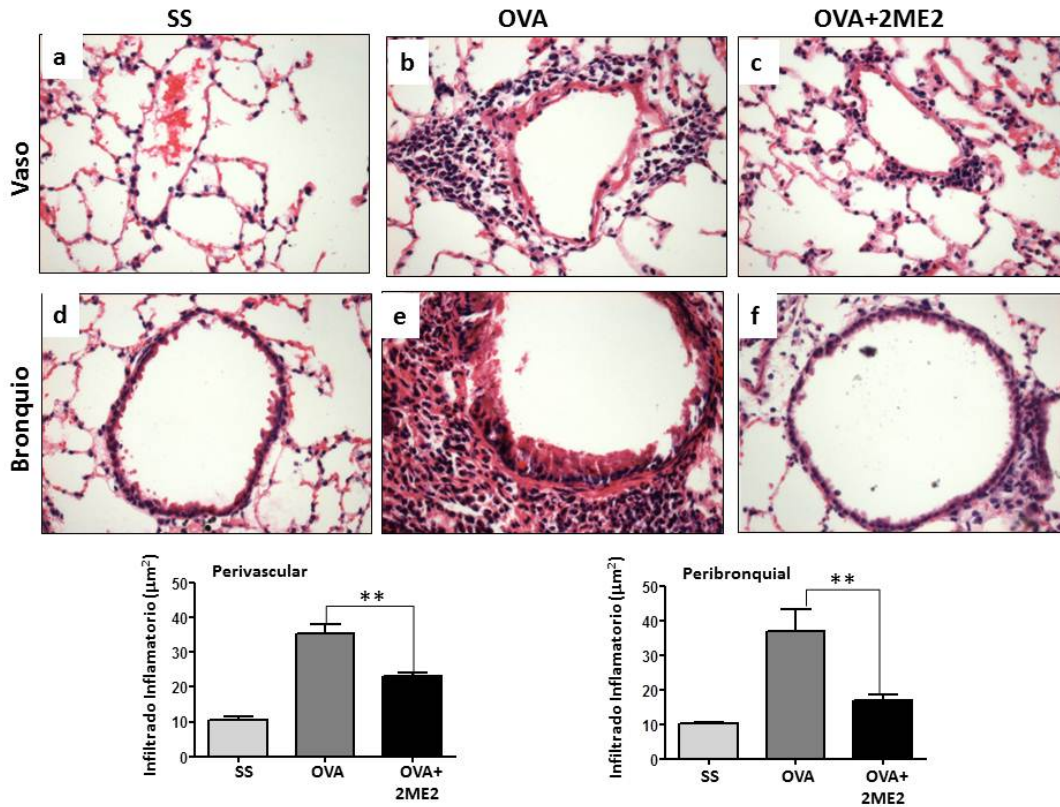


Figura 2B. El tratamiento con 2ME2 reduce el infiltrado inflamatorio en el modelo murino de inflamación alérgica pulmonar. Micrografías representativas (panel superior), de la tinción básica de H/E que nos muestra la extensión del infiltrado inflamatorio perivascular (a-c) y peribronquial (d-f). Los animales que se trataron con 2ME2 (OVA+2ME2) (c y f), presentan disminución en el infiltrado inflamatorio en comparación con los animales que solo reciben el alérgeno (OVA) (b y e). Esta diferencia es estadísticamente significativa como se muestra en el análisis del infiltrado inflamatorio (panel inferior). $**p < 0.005$ en los animales tratados con 2ME2 vs no tratados (ANOVA/TUKEY).

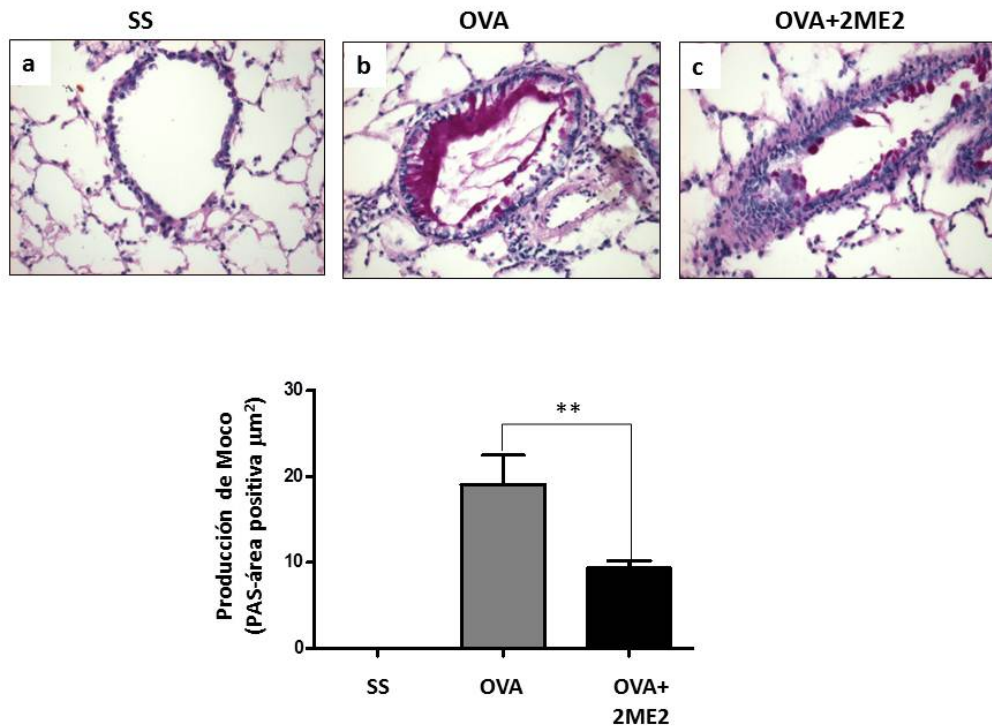


Figura 2C. El tratamiento con 2ME2 disminuye la producción de moco. Micrografías representativas de la tinción de PAS, en la que se evidencia en color fucsia la presencia de moco. Los animales que se trataron con 2ME2 (OVA+2ME2) (c) presentan disminución en la producción de moco en comparación con los que solo recibieron OVA (b), los animales control, solo recibieron SS (a). Se realizó el análisis cuantitativo del material positivo a PAS que muestra una disminución estadísticamente significativa con una $**p=0.0042$ en los animales tratados con 2ME2 vs no tratados (t student).

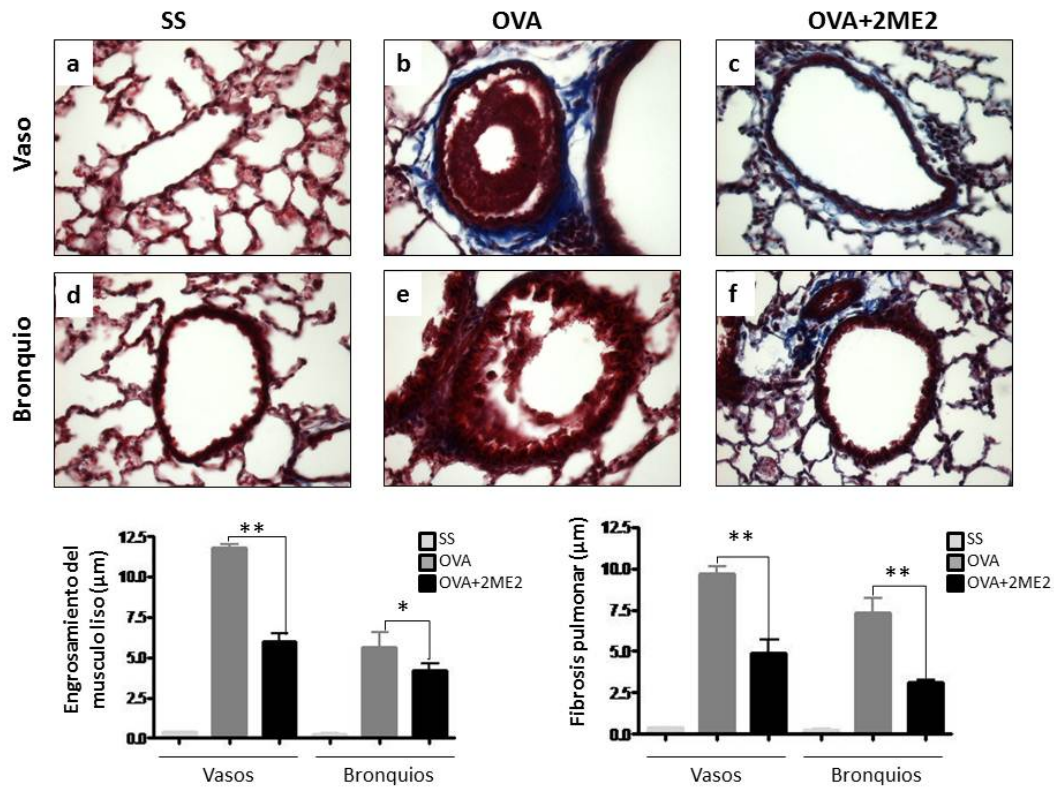


Figura 2D. El tratamiento con 2ME2 disminuye la remodelación pulmonar. Micrografías representativas de la tinción tricromica de MASSON, en la que podemos observar de color azul los depósitos de colágeno. Los animales tratados con 2ME2 (OVA+2ME2) (c y f) presentan una disminución en la fibrosis pulmonar (panel inferior derecho), así como la disminución del engrosamiento del músculo liso (panel inferior izquierdo) en comparación con los que solo recibieron OVA (b y e). Las diferencias son estadísticamente significativas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ en los animales tratados con 2ME2 vs no tratados (ANOVA/TUKEY).

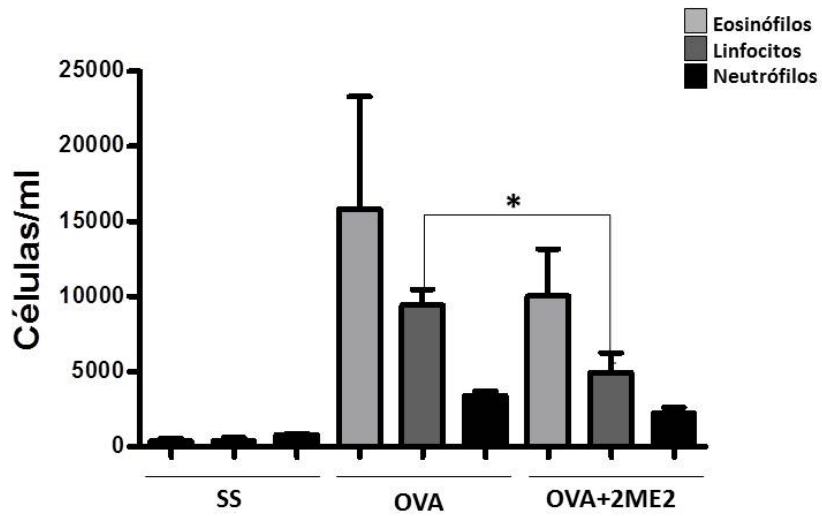


Figura 2E. El tratamiento con 2ME2 induce disminución de las células inflamatorias en LBA.

Después de obtener las células por lavados bronqueoalveolares (LBA) estas fueron centrifugadas y contadas para la preparación de laminillas por citocentrifugación y fueron teñidas con HE. La cuenta diferencial muestra una disminución de eosinófilos y neutrófilos, siendo estadísticamente significativa, en el caso de los linfocitos. En los animales que son tratados con 2ME2 en comparación con los no tratados * $p < 0.05$ (t student).

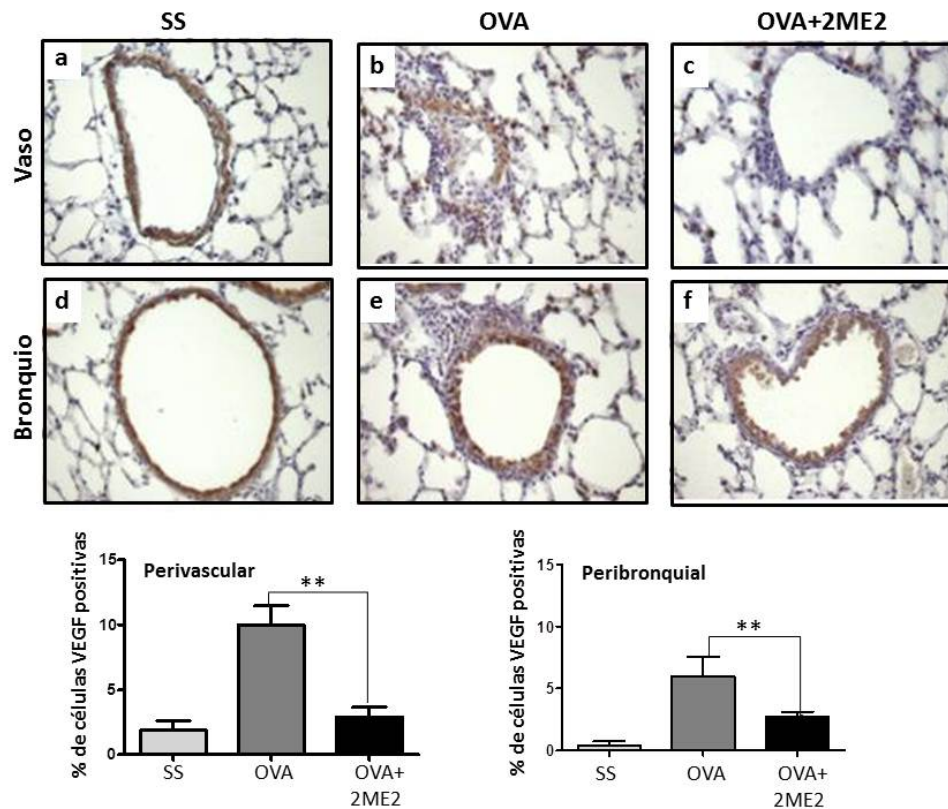


Figura 2F. El tratamiento con 2ME2 disminuye la expresión de la proteína VEGF. Micrografías representativas de la tinción de inmunohistoquímica para la proteína VEGF en vasos (a-c) y bronquios (d-f). De las que se realizó el análisis cuantitativo en porcentaje de células positivas para dicha citosina en el infiltrado inflamatorio perivascular (panel inferior izquierdo), peribronquial (panel inferior derecho), en las que se observa la disminución de esta proteína después del tratamiento con 2ME2 (c y f) en comparación con los no tratados (b y e) la cual es estadísticamente significativa, $**p=0.001$ (ANOVA/TUKEY).

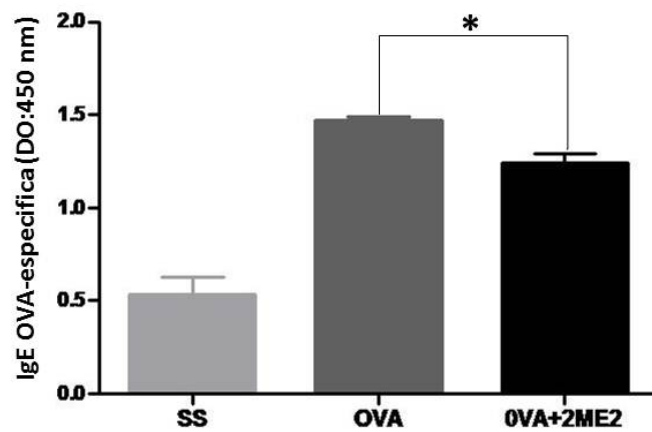


Figura 2G. El tratamiento con 2ME2 disminuye la IgE OVA específica. Por el método de ELISA se determinó la IgE OVA específica de los diferentes grupos. En el que se puede observar una disminución discreta pero significativa en los ratones tratados con 2ME2, en comparación con los no tratados, * $p=0.05$ (ANOVA/TUKEY).

Sección 3. La inhibición de la expresión de HIF-1 disminuye la inflamación alérgica pulmonar: Ensayos empleando ratones “knock out” inducibles de HIF-1

Con el propósito de validar de manera más específica que HIF-1 participa en la inflamación alérgica pulmonar, utilizamos ratones “knock out” inducibles en la expresión de HIF-1 β (Cre+loxP-ARNT), con lo cual se bloquea la actividad de HIF-1 para unirse al DNA a sus elementos de respuesta. Los ratones Cre+loxP-ARNT fueron generados en la cepa C57BL6, los cuales tiene un fondo genético (H2^b) diferente a los ratones BALB/c (H2^d) utilizados en los experimentos anteriores. Por tal motivo, era necesario primero evaluar si el reto alérgico con OVA, también inducía la expresión de HIF-1 α en estos ratones, antes de iniciar los experimento en donde se promueve la delección de HIF-1 β . En la figura 3A se esquematiza el modelo de inflamación alérgica utilizado, en donde los ratones fueron sensibilizados con OVA vía i.p en los días 15 y 20, después retados con OVA vía i.t. en los días 28, 38 y 48, por ultimo sacrificados el día 52. La figura 3B panel superior izquierdo, muestra micrografías representativas de la inmunotinción para HIF-1 α , donde observamos que a pesar de que el infiltrado inflamatorio es menor en esta cepa de ratones en comparación con la cepa de BALB/c, se observa un aumento claro en la expresión de este factor de trascrición a nivel peribronquial (b), en comparación con el grupo control de SS (a). Cuando se realizó el análisis cuantitativo de la expresión de HIF-1 α en diferentes células presentes en el pulmón, se observó que el aumento en la expresión de este factor de trascrición es estadísticamente significativo en células epiteliales, macrófagos y linfocitos (panel inferior izquierdo). También evaluamos la expresión de HIF-2 α (panel superior derecho, c-d) debido a que se sabe que esta isoforma se expresa principalmente en pulmón. De la misma forma evaluamos de manera cuantitativa la expresión de esta isoforma en los diferentes tipos de células evaluada con anterioridad. En el panel inferior derecho de la Figura 3B, se muestra que HIF-2 α se induce después del reto alérgico (d), en comparación con el grupo control de SS (c) y este aumento de HIF-2 α es estadísticamente significativo en células epiteliales, macrófagos y linfocitos. Es importante mencionar que al igual que en la cepa de ratones BALB/c tanto la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α se observó en los mismos tipos celulares, principalmente a nivel nuclear.

Después de demostrar que en la cepa de ratones C57BL/6 se presentaba un efecto similar de inducción de HIF-1 α posterior al reto alérgico. El siguiente paso fue inducir la delección de HIF-1 β en los ratones Cre+loxP-ARNT. Para ello, estos ratones fueron tratados inicialmente con plpC por tres ocasiones, que como ya se menciona es un inductor de la proteína recombinante Cre, que permite la recombinación homóloga en el sistema loxP para la delección del gene de HIF-1 β , una vez inducida la delección los ratones fueron sensibilizados y retados con el alérgeno. En la Figura 3C se muestra con detalle el modelo empleado. Reportes previos han demostrado que se requieren alrededor 14 días para que se lleve a cabo la delección de dicho gene (67;70). Por esta razón el esquema de inducción de la inflamación alérgica a la OVA se inició el día 15. La figura 3D, ilustra como el grupo de ratones que presentan la delección de HIF-1 β , fueron incapaces de producir una respuesta inflamatoria adecuada en respuesta a la OVA (Cre+OVA) tanto a nivel perivascular (d) como a nivel peribronquial (h), en comparación con el grupo que no recibió plpC (Cre-OVA) (d y f). Los ratones que recibieron SS no presentaron inflamación perivascular (a y c), ni peribronquial (e y g). El panel inferior de la figura 3D revela que la diferencia en la respuesta inflamatoria es estadísticamente significativa ($p < 0.05$ Cre+ OVA vs Cre-OVA).

HIF-1 regula de manera trascricional la expresión de VEGF, por lo que nuevamente evaluamos si la delección de HIF-1 β tenía un efecto en la expresión de esta citocina. La figura 3E muestra micrografías representativas de la expresión de VEGF a nivel perivascular (a-d) y peribronquial (e-h) en ratones Cre-OVA (b y f) y Cre+/OVA (d y h), en donde se observa una clara disminución de la expresión de esta citocina cuando no está presente HIF-1 β (Cre+/OVA). Al realizar el análisis cuantitativo, demostramos que esta disminución fue significativa tanto a nivel perivascular como a nivel peribronquial (panel inferior) ($p < 0.05$ Cre+/OVA vs Cre-/OVA).

Por otro lado, la delección de HIF1- β induce disminución de las células inflamatorias en LBA. En la figura 3F, se observa una reducción significativa de la presencia de eosinófilos en comparación a grupo de animales alérgicos que no presentan la delección ($p < 0.05$ Cre+/OVA vs Cre-/OVA).

Como se mencionó anteriormente, uno de marcadores de la alergia es la elevada presencia de IgE antígeno específica en suero, así como también de IgG1. Por lo que fue de nuestro interés evaluar por ELISA el efecto de la delección de HIF-1 β tanto en la producción de anticuerpos IgE, como IgG1 OVA específicos en el suero de los animales alérgico Cre⁺ en comparación con los Cre⁻. La figura 3G se muestra una disminución significativa en los niveles tanto de IgE (panel superior) como de IgG1 (panel inferior) específicos para OVA en los ratones Cre⁺/OVA ($p < 0.05$ Cre⁺/OVA vs Cre⁻/OVA).

Estos resultados confirman que HIF-1 participa de manera importante en la inflamación alérgica inducida por OVA y son consistentes con los resultados obtenidos al inhibir la actividad de HIF-1 mediante 2ME2.

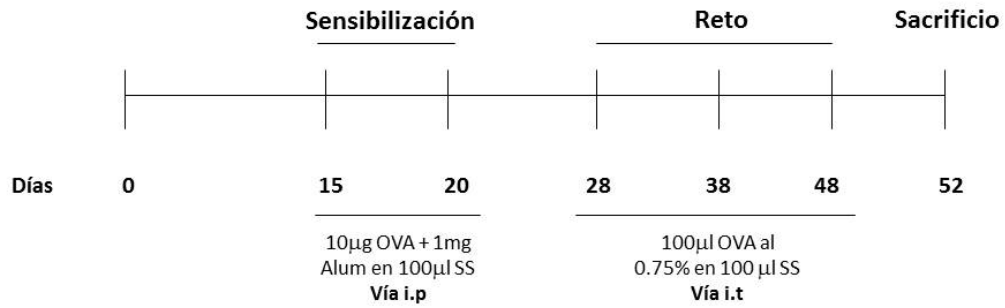


Figura 3A. Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar a OVA. Ratones C57BL/6 machos fueron sensibilizados vía i.p. los días 15 y 20, retados vía i.t los días 28, 38 y 48 y se sacrificaron por exanguinación al día 52.

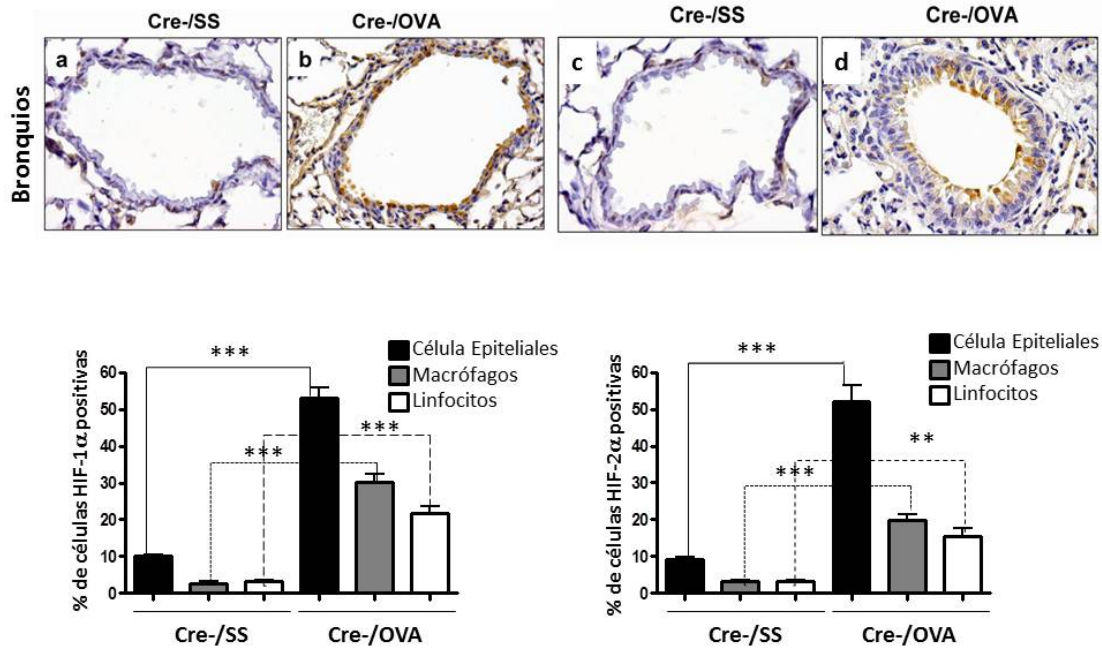


Figura 3B. Incremento de la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α durante la inflamación alérgica pulmonar en ratones C57BL/6. Micrografías representativas de tinciones de inmunohistoquímica en tejido pulmonar para las proteínas HIF-1 α (a-b) y HIF-2 α (c-d) de ratones Cre- que recibieron el alérgeno OVA (b y d) y los que recibieron SS (a y c). De las cuales se cuantificaron el porcentaje de células positivas epiteliales, macrófagos y linfocitos mostrando un incremento significativo en los animales alérgicos en comparación con los controles. Ratones que recibieron OVA vs SS, ** $p=0.001$, *** $p=0.0001$ (ANOVA/TUKEY).

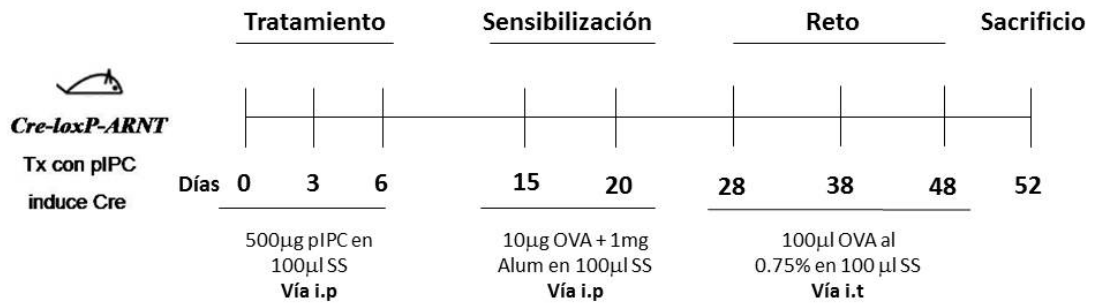


Figura 3C. Modelo de Inhibición de la expresión de HIF-1 β y su efecto en la inflamación alérgica pulmonar en ratones KO inducibles por el sistema Cre+loxP-ARNT. Los animales fueron tratados con pIPC los días 0, 3, y 6 vía i.p. para inducir la delección del exón 6 del gen de HIF-1 β y posteriormente se realizó la sensibilización con OVA vía i.p. en los días 15 y 20, además se les administro tres retos con OVA vía i.t. al día 28, 38 y 48. Los animales se sacrificaron al día 52.

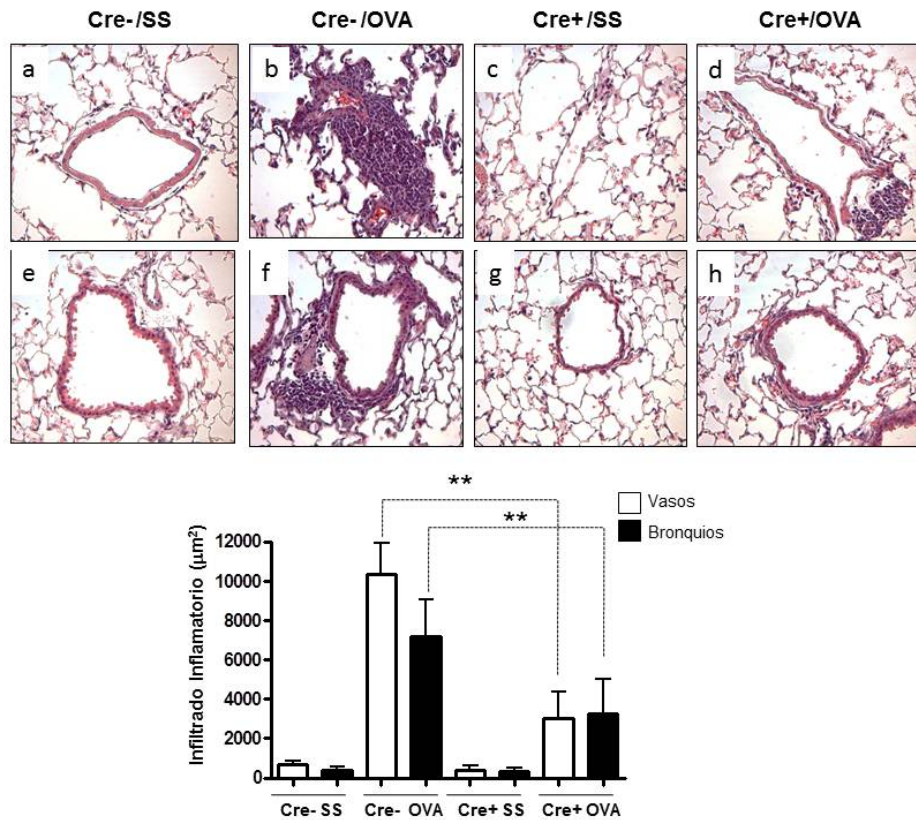


Figura 3D. La delección de HIF-1 β disminuye la inflamación alérgica pulmonar. En el panel superior se muestran micrografías representativas de la tinción con HE de la inflamación alérgica pulmonar en los ratones "knock out" inducibles para HIF-1 β , el grupo Cre- indica la ausencia de la proteína Cre (a-b, e-f) (ratones que expresan HIF-1 β normalmente) en tanto que los Cre+ presentan expresión de Cre (c-d, g-h) (ratones deficientes de HIF-1 β), es decir que los animales que recibieron plpC. Los grupos tratados con SS (a-e, c-g), en los cuales no se observa inflamación alérgica pulmonar, en tanto que los grupos que recibieron OVA (b-f, d-h), se observa el infiltrado inflamatorio, este disminuye en los Cre+ (KO inducible a HIF-1 β) (d-h) en comparación con los Cre- (que si presenta HIF-1 β), (b-f). C) De los diferentes grupos se realizó el análisis cuantitativo (panel inferior) para ver el área de infiltrado inflamatorio (μm^2) mostrando que existe una disminución estadísticamente significativa en los grupos de ratones Cre+ que recibieron OVA. Ratones con delección de HIF-1 β vs ratones que si expresan HIF-1 β , ** $p= 0.001$ (ANOVA/TUKEY).

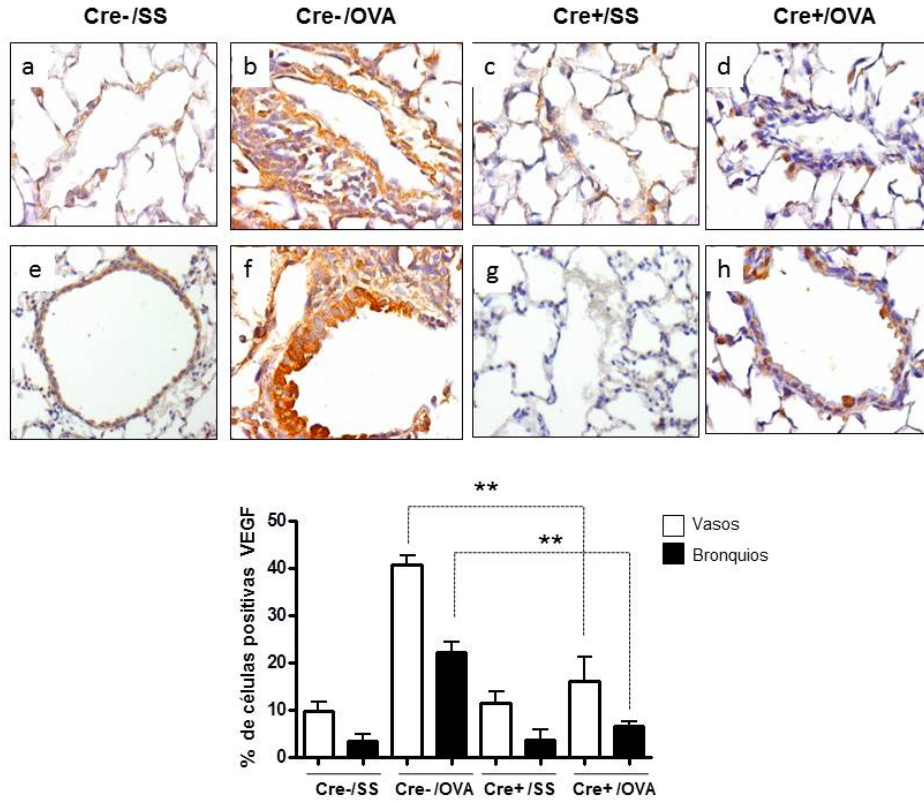


Figura 3E. La delección de HIF-1 β disminuye los niveles de la proteína VEGF en los ratones alérgicos. Micrografías representativas de la tinción de inmunohistoquímica para la proteína VEGF en vasos (a-d) y bronquios (e-h). En los que podemos observar una disminución importante en la expresión de VEGF en los animales alérgicos con la delección (Cre+/OVA) (d y h) en comparación con los animales sin la delección (Cre-/OVA) (b y f). Los ratones Cre-SS (a y e) y Cre+SS (c y g) presentan niveles basales de expresión de esta proteína. Se realizó el análisis cuantitativo (panel inferior) del porcentaje de células positivas en el que la disminución es estadísticamente significativa, ** $p=0.001$ (ANOVA/TUKEY).

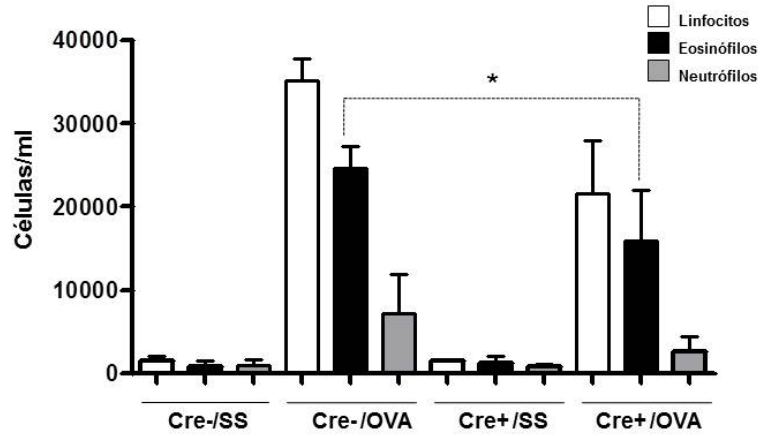


Figura 3F. La delección de HIF-1 β disminuye el número de eosinófilos en LBA. De la tinción de HE de las células obtenidas por lavados bronqueoalveolares (LBA) y preparadas en laminillas por citocentrifugación. Se realizó la cuenta diferencial que muestra una disminución en linfocitos, neutrófilos y estadísticamente significativa de eosinófilos, en los animales Cre+/OVA en comparación con los Cre-/OVA * $p < 0.05$ (t student).

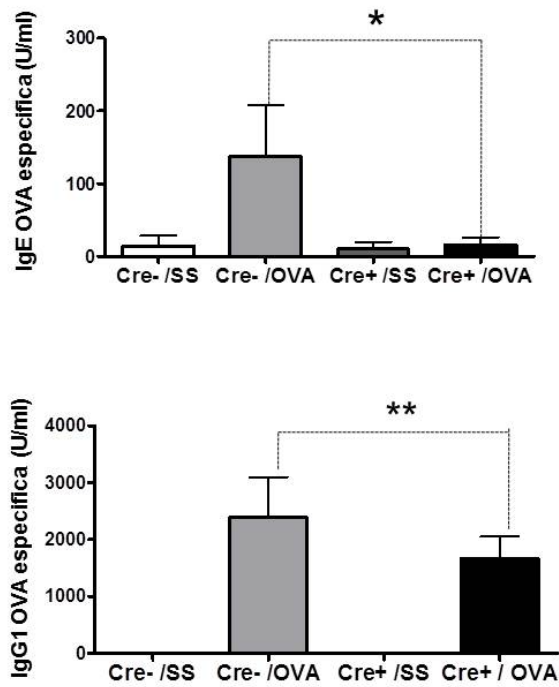


Figura 3G. La delección de HIF-1 β disminuye los niveles de IgE e IgG1 OVA específica. Por el método de ELISA se determinó la IgE e IgG1 OVA específica de los diferentes grupos. En el que se puede observar una disminución estadísticamente significativa en los ratones Cre+/OVA en comparación con los Cre-/OVA. En los animales Cre+/OVA en comparación con los Cre-/OVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (ANOVA/TUKEY).

Sección 4. La inducción de la expresión de HIF-1 α incrementa la inflamación alérgica pulmonar: Ensayos con el fármaco EDHB.

Con el propósito de confirmar la participación de HIF-1 en la inflamación alérgica pulmonar, utilizamos un sistema que nos permitió evaluar el efecto de la sobre-expresión de HIF-1 α en nuestro modelo de inflamación alérgica a la OVA (figura 4A) mediante la utilización del fármaco EDHB. La figura 4B muestra una tinción de H/E en donde se observa que el tratamiento con EDHB promueve el infiltrado inflamatorio a nivel perivascular (c) y peribronqueal (f), a mayor aumento puede observarse que el infiltrado inflamatorio esta favorecido por la presencia de eosinófilos (g). No se observa infiltrado inflamatorio en el grupo control de SS (a y d); este resultados fueron significativo ($p < 0.05$ EDHB+ OVA vs OVA) según lo muestra el análisis cuantitativo del infiltrado inflamatorio (panel inferior izquierdo).

Un hallazgo interesante (Figura 4C) fue que los animales control que recibieron el tratamiento (SS+EDHB) presentan un ligero infiltrado inflamatorio (b), en comparación con los animales que solo recibieron (SS) (a), este incremento es estadísticamente significativo, sin embargo este infiltrado esta principalmente compuesto por macrófagos, neutrófilos y en menor grado linfocitos.

Una vez que observamos que la administración de EDHB potencia la inflamación alérgica preexistente, determinamos si esto también inducía un incremento en la expresión de HIF-1 α y de VEGF lo cual evaluamos mediante tinciones de inmunohistoquímica. La figura 4D muestra los resultados de expresión de la proteína HIF-1 α en infiltrado inflamatorio perivascular (a-c) y peribronquial (e-f). En ambos casos la administración del fármaco EDHB incrementa la producción del factor de transcripción HIF-1 α (c y f), en comparación con el grupo que solo recibió OVA (b y e). Los ratones control de SS, presentan una leve expresión basal de este factor (a y d). Este incremento fue estadísticamente significativo a nivel perivascular y peribronquial, como se muestra en el panel inferior de la figura 4D ($p < 0.05$, OVA+EDHB vs OVA, ANOVA/TUKEY).

La figura 4E muestra la expresión de la proteína VEGF analizada en infiltrado perivascular (a-c) y peribronquial (d-f) y de manera similar a HIF-1 α en todos los casos la administración de EDHB indujo la expresión de la proteína VEGF (c y f), en

comparación con el grupo que solo recibió OVA (b y e). Nuevamente se encontró una expresión basal de esta citocina en el grupo control de SS (a y d). El análisis cuantitativo se muestra en el panel inferior en donde el incremento de VEGF es estadísticamente significativo ($p < 0.05$, OVA+EDHB vs OVA, ANOVA).

Estos resultados son consistentes con lo obtenido en los ensayos de inhibición de HIF-1 en donde se observa una disminución de la inflamación alérgica. En contraste la inducción de la expresión de HIF-1, causa un claro incremento de la inflamación alérgica pulmonar, lo cual demuestra de manera consistente con los resultados de inhibición, que este factor de transcripción está implicado en la fisiopatogenia de la enfermedad.

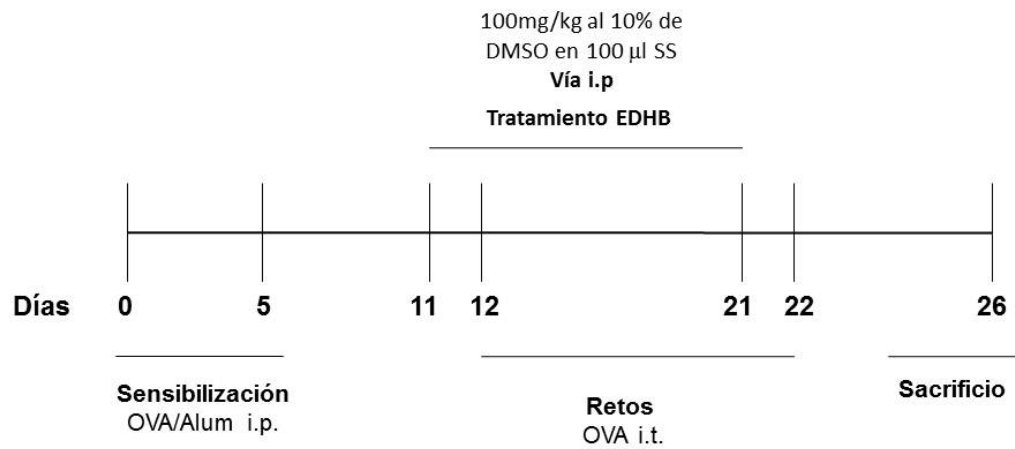


Figura 4A. Inducción de la expresión de HIF-1 α en el modelo experimental. Modelo de inflamación alérgica pulmonar con el tratamiento de EDHB. Los animales se sensibilizaron los días 0 y 5, posteriormente fueron tratados con EDHB 24 horas antes de los retos, es decir los días 11 y 21 recibieron EDHB y los días 12 y 22 los retos con OVA, sacrificándolos el día 26.

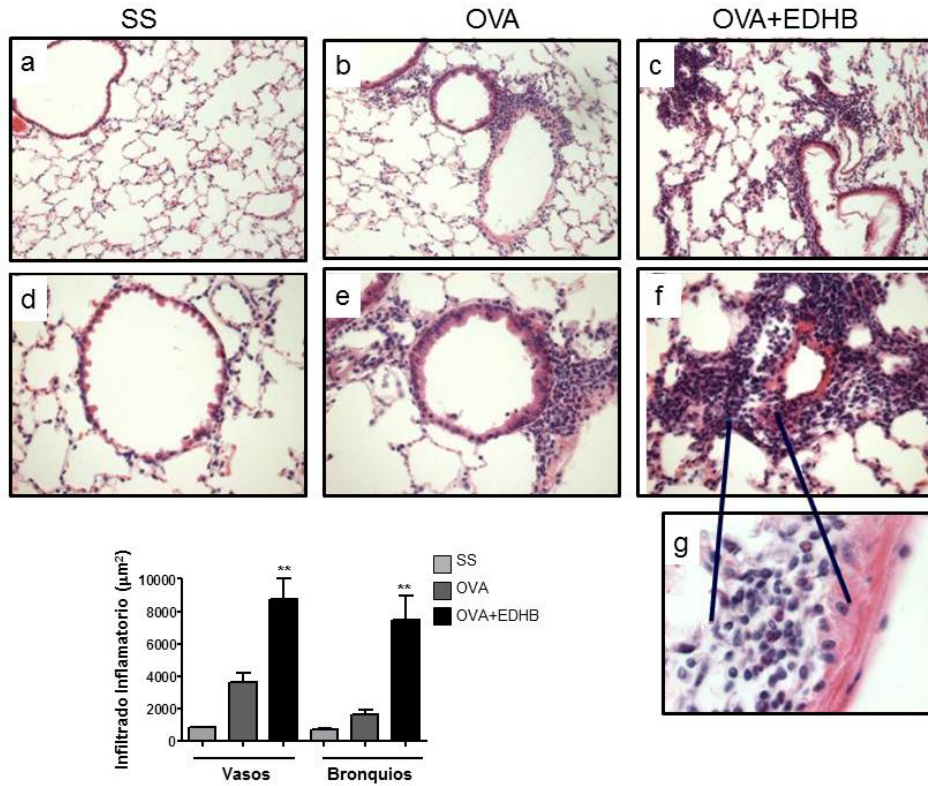


Figura 4B. La sobreexpresión de HIF-1 incrementa el infiltrado inflamatorio inducido por OVA.

Micrografías representativas de la tinción de H/E en cortes de tejido pulmonar, en los que se puede observar la estructura pulmonar normal en los animales que recibieron SS (a y d), en comparación con los que recibieron OVA (b y e) que muestran un infiltrado inflamatorio tanto perivascular (b) como peribronquial (e). Sin embargo, los animales que reciben la combinación OVA+EDHB (c y f) presentan mayor infiltrado inflamatorio tanto a nivel perivascular (c) como peribronquial (f). A mayor aumento (100X) se muestra que este infiltrado inflamatorio es principalmente compuesto por eosinófilos y linfocitos (g). El análisis morfométrico (panel inferior izquierdo) de los infiltrados inflamatorios muestra que el aumento generado por el tratamiento con EDHB es estadísticamente significativo, $**p < 0.005$ ratones tratados con OVA y EDHB vs tratados solo con OVA (ANOVA/TUKEY).

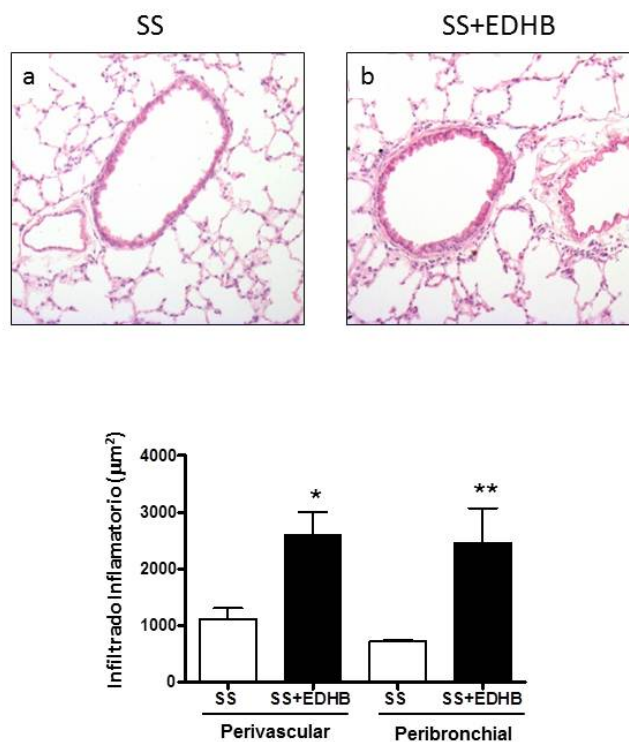


Figura 4C. Inducción de inflamación pulmonar por la simulación de hipoxia. Micrografías representativas de los animales control que recibieron SS (a) y los tratados con SS+EDHB (b). De los cuales se realizó el análisis cuantitativo (panel inferior) del infiltrado inflamatorio siendo estadísticamente significativo el incremento de los animales tratados con EDHB, en comparación con los que no recibieron el tratamiento. $**p < 0.005$ ratones controles SS vs controles tratados con SS+EDHB (ANOVA/TUKEY).

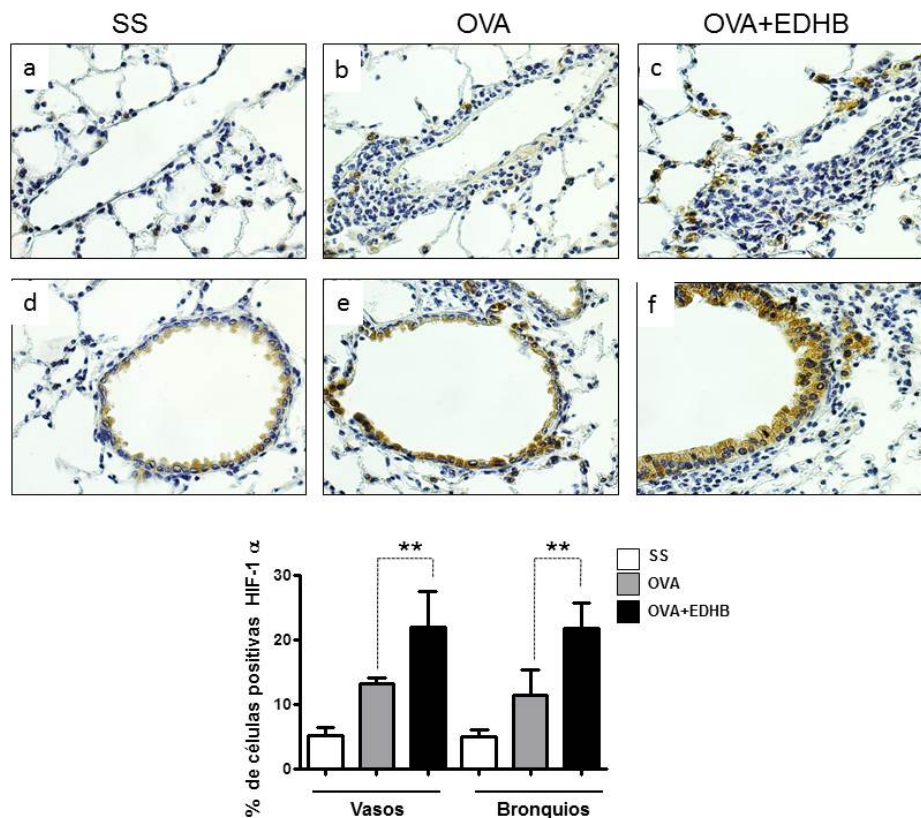


Figura 4D. El tratamiento con EDBH induce la sobreexpresión de HIF-1 α en el modelo de inflamación alérgica pulmonar. Micrografías representativas de la tinción de inmunohistoquímica en cortes de tejido pulmonar para HIF-1 α , que muestra mayor número de células positivas para esta proteína en los animales que recibieron OVA+EDHB (c y f), en comparación con los que recibieron OVA solamente (b y e), tanto en el infiltrado perivascular (a-c) como peribronquial (d-f). Esto se demostró en el análisis cuantitativo (panel inferior) por el porcentaje de células positivas para esta proteína, mostrando un incremento estadísticamente significativo los animales tratados con EDHB vs los no tratados. **** $p < 0.005$ (ANOVA/TUKEY).**

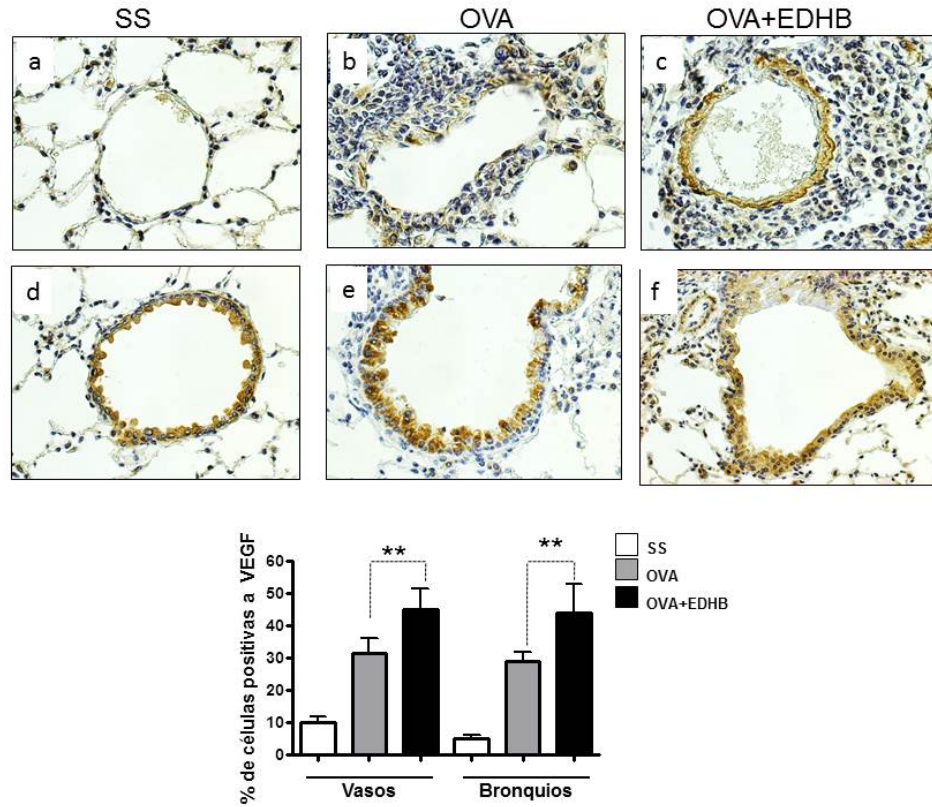


Figura 4E. El tratamiento con EDBH sobreexpresa los niveles de VEGF en el modelo de inflamación alérgica pulmonar. Micrografías representativas de la tinción de inmunohistoquímica en cortes de tejido pulmonar para la proteína VEGF, que muestra mayor número de células positivas para esta proteína en los animales que recibieron OVA+EDHB (c y f), en comparación con los que recibieron OVA solamente (b y e), tanto en el infiltrado perivascular (a-c) como peribronquial (d-f). Esto se demostró en el análisis cuantitativo (panel inferior) del porcentaje de células positivas para esta proteína, mostrando un incremento estadísticamente significativo los animales tratados con OVA+EDHB vs OVA. $**p < 0.005$ (ANOVA/TUKEY).

Sección 5. El reto alérgico induce la expresión de HIF-1 en pacientes asmáticos.

Con la finalidad de corroborar la importancia de HIF-1 en la IAP en nuestros modelos animales y que además estos tuvieran relevancia en humanos, utilizamos un modelo en pacientes en donde se evaluó la expresión de HIF-1 α antes y después del reto alérgico. En la figura 5A, se muestra el esquema detallado del modelo empleado. La figura 5B se muestran micrografías representativas de la expresión de HIF-1 α (a-c) y VEGF (d-f), evaluadas por inmunocitoquímica en células de lavados bronquioalveolares, obtenidas pre-(b y e) y post-(c y f) exposición alérgica (caspa de gato), en donde se observa un claro incremento de ambas proteínas en las muestras obtenidas post-reto alérgico (c y f), en comparación con las muestras pre-reto (b y e). El control de isotipo (a y d) demuestra la especificidad de la inmunotinción. Las diferencias de la expresión fueron estadísticamente significativas tanto para HIF-1 α a nivel nuclear (panel inferior izquierdo), como para VEGF (panel inferior derecho) ($p < 0.05$ pre vs post t student).

La figura 5C, muestra resultados muy similares en la expresión de HIF-1 (a-c) y VEGF (d-f) en el tejido pulmonar evaluado por inmunohistoquímica. En donde se observa un incremento de ambas proteínas post-reto alérgico (c y f), en comparación con las muestras obtenidas pre-reto (b y e). Nuevamente el control de isotipo (a y d) muestra la especificidad de la inmunotinción. Además, de que las diferencias de la expresión fueron estadísticamente significativas tanto para HIF-1 α (panel inferior izquierdo), como para VEGF (panel inferior derecho) ($p < 0.05$ pre vs post t student).

Estos resultados muestran por primera vez, el aumento en la expresión de HIF-1 después del reto alérgico en humanos, resultados que son consistentes con los obtenidos en modelos animales. Lo cual sugiere que HIF-1 está participando en la fisiopatogenesis del asma en humanos.

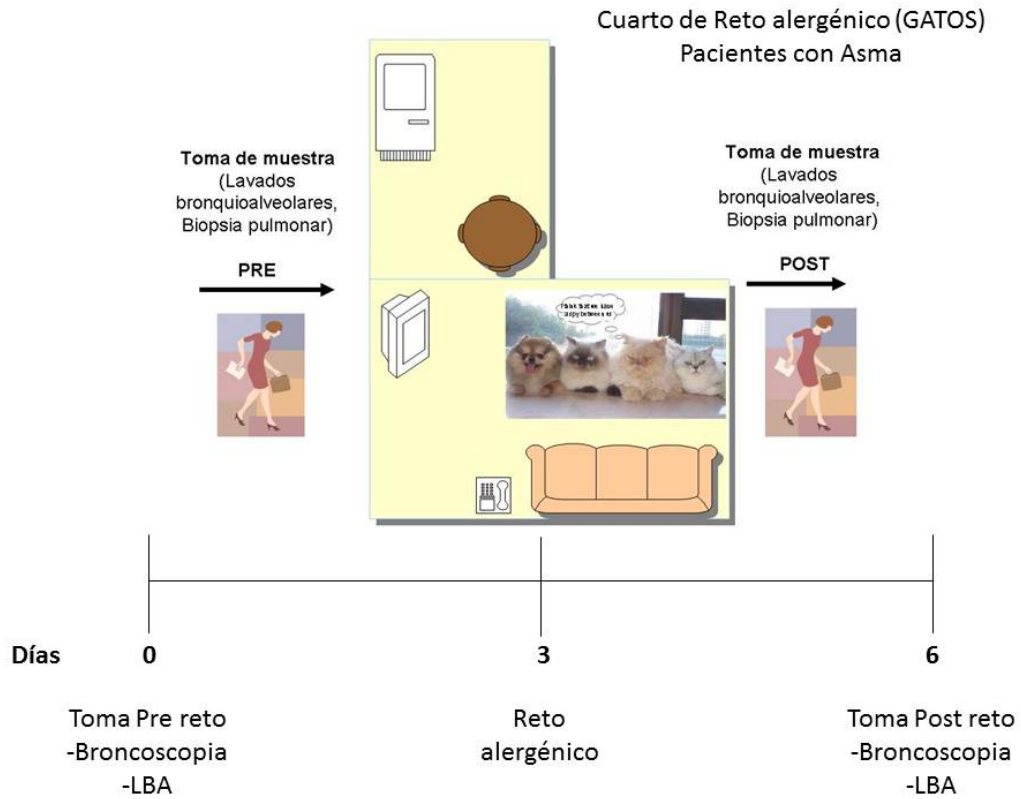


Figura 5A. Exposición alérgica de pacientes con asma. Se incluyeron once pacientes con asma alérgica a la caspa de gato, con grado de severidad de leve a moderada, los cuales fueron expuestos a un reto alérgico natural en un cuarto con gatos. 3 días antes (Pre) y 3 días después del reto (Post) se les realizó la toma de muestras de LBA y de biopsias pulmonares por broncoscopia.

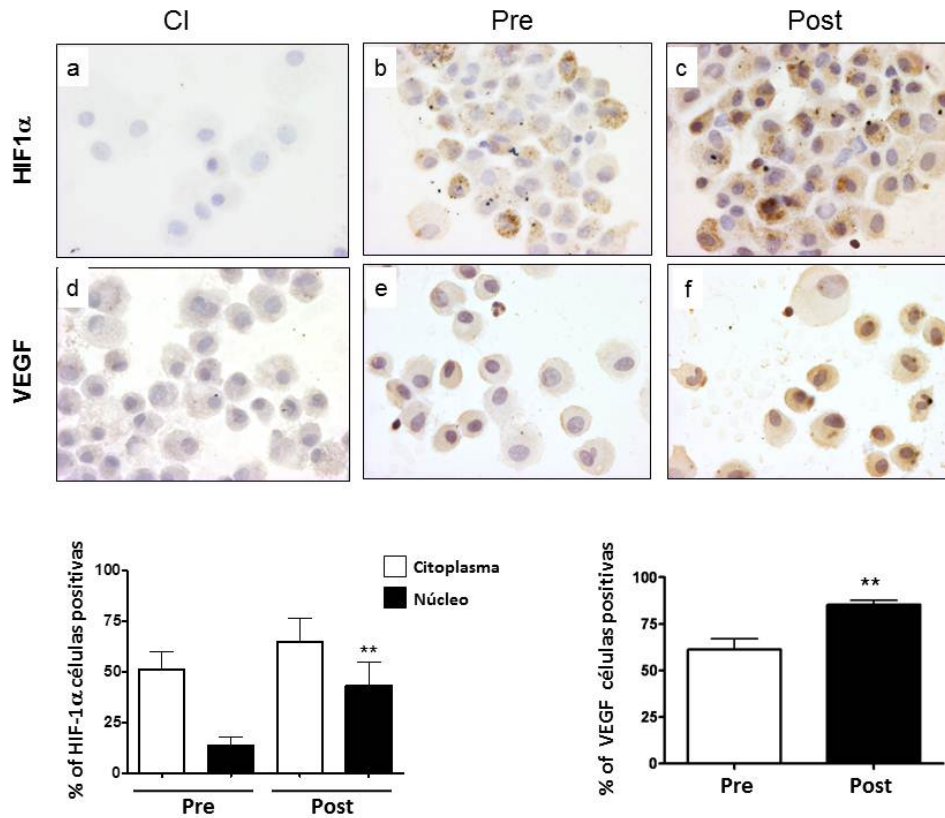


Figura 5B. Incremento de las proteínas HIF-1 α y VEGF en LBA de pacientes alérgicos después del reto alérgico. De los LBA obtenidos de los pacientes alérgicos pre (b y e) y post (c y f) reto, se realizó la tinción de inmunocitoquímica para las proteínas HIF-1 α (b-c) y VEGF (e-f). El control de isotipo (a y d) muestra especificidad de la tinción. De las inmunotinciones se analizó cuantitativamente el porcentaje de células positivas, en el caso de HIF-1 α (panel inferior izquierdo) se cuantificó la tinción citoplasmática y nuclear, y para VEGF (panel inferior derecho) se tomó como positiva la tinción citoplasmática y de membrana. Ambas proteínas incrementan de forma significativa post reto en comparación con el pre reto. ** $p < 0.005$ (t student).

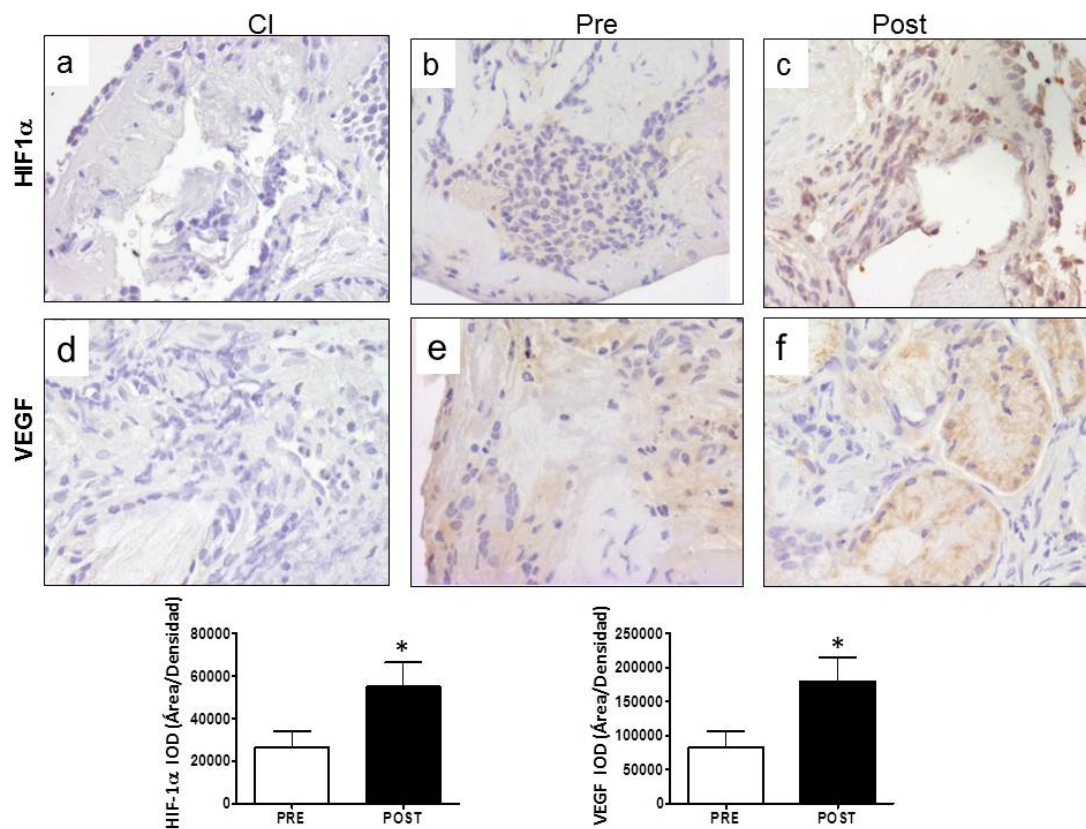


Figura 5C. Incremento de las proteínas HIF-1 α y VEGF en tejido pulmonar de pacientes alérgicos después la exposición al alérgeno. De las biopsias obtenidas de los pacientes alérgicos pre (b y e) y post (c y f) reto, se realizó la tinción de inmunohistoquímica para las proteínas HIF-1 α (b-c) y VEGF (e-f). El control de isotipo (a y d) muestra especificidad de la inmunotinción. En el panel inferior izquierdo se muestra la densidad de la expresión (IOD) de las muestras para HIF-1 α y en el panel inferior derecho para VEGF. Ambas proteínas muestran un incremento estadísticamente significativo en el post reto en comparación con las muestras pre reto. * $p < 0.05$ (t student).

DISCUSION

HIF-1 es un factor de transcripción que ha tomado gran importancia en los últimos años, pues se ha visto que es el regulador maestro de la respuesta celular a la disponibilidad de oxígeno, y regula diversos genes que tienen que ver con eritropoyesis, apoptosis, glicolisis, angiogénesis, hematopoyesis, quimiotaxis entre otros (37;41-48). La diversidad de las funciones de los genes regulados por HIF-1 indica la importancia que tiene para la homeostasis del oxígeno. Sin embargo, recientemente se ha reportado que no solo está siendo regulado en procesos de hipoxia, sino que puede ser regulado durante la inflamación (51;53;71;72).

HIF-1 participa en la fisiopatología de diversas enfermedades. Su papel ha sido más estudiado en padecimientos que se caracterizan por tener procesos de hipoxia, como cáncer, hipertensión pulmonar, sepsis o isquemia. Sin embargo, poco se ha estudiado en otras enfermedades en las que pudiesen existir otras vías de activación dependientes o independientes de hipoxia tisular.

Existen pocos reportes en la literatura de la participación de HIF-1 en las enfermedades alérgicas pulmonares. En 2006 el grupo de Kim y cols, reportaron que HIF-1 se encuentra elevado en biopsias de tejido pulmonar de pacientes asmáticos, y que el incremento correlaciona con la presencia de VEGF (66). Guo y cols, demostraron que ratones heterocigotos parcialmente deficientes de HIF-1 α protegen de la eosinofilia en un modelo de inflamación alérgica pulmonar a OVA (73).

Un estudio realizado en un modelo de inflamación pulmonar por cobalto, demostró que utilizando ratones deficientes de HIF-1 α desarrollan una respuesta de tipo alérgica con presencia de eosinofilia, en contraste con los ratones control en los que la exposición al cobalto genera neutropenia y fibrosis (74). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el cobalto es un inductor de la subunidad α al ser un quelante de la prolilhidroxilasa, simulando estados de hipoxia. Por lo que no existe evidencia suficiente que muestre la participación directa de HIF-1 en el desarrollo de la inflamación alérgica pulmonar. Por lo anterior en este trabajo se buscó evaluar el papel de HIF en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar usando tanto modificaciones farmacológicas como genéticas.

Para evaluar lo anterior, utilizamos, un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar a la OVA, con lo que demostramos que durante la respuesta alérgica pulmonar se incrementa la expresión y actividad de HIF-1 (figura 1D), lo cual sugiere que este factor de transcripción puede estar implicado en la fisiopatología del asma. Nuestros resultados demostraron que existe un incremento progresivo en la expresión de HIF-1 α durante el curso de la inflamación alérgica y al utilizar el fármaco 2ME2, un inhibidor no específico de la actividad de HIF-1, se disminuye significativamente el infiltrado inflamatorio, la producción de moco y el depósito de colágeno (figura 2B, C y D). Adicionalmente se afecta la producción de IgE OVA específica y la expresión de su gen blanco VEGF (Figura 2G y F). Se eligió 2ME2 por que se conoce su efecto inhibitorio de la actividad de HIF-1 α en diversas enfermedades en donde se sabe la expresión y actividad de HIF-1 se encuentra aumentada. El uso de 2ME2 en humanos ha sido aprobado por la FDA y no tiene efectos secundarios importantes, y el tratamiento es por vía oral (75). Por otro lado, ha sido especialmente prometedor para tratar algunos tipos de cáncer y actualmente su uso se encuentra en estudios de fase clínica III para el tratamiento de mieloma múltiple, y cáncer de mama entre otros (76-78). Por estas razones resulta atractivo, que se pudiese utilizar para el tratamiento de la inflamación alérgica pulmonar.

El papel de HIF-1 en el proceso inflamatorio alérgico se corroboró con los ratones “knock out” inducibles de HIF-1 β . Este sistema es necesario porque la delección de HIF-1 es incompatible con la vida, debido a fallas en la embriogénesis y formación de la placenta. Previo a la determinación del papel de HIF-1 β por su delección se analizó la expresión de HIF-1 α y 2 α en el tejido pulmonar de los ratones alérgicos en comparación con los controles esto para comprobar que la sobrerregulación de las subunidades α se genera por la inflamación alérgica pulmonar. De forma interesante observamos que la falta de HIF-1 β atenuó la respuesta inflamatoria alérgica pulmonar (figura 3D), la eosinofilia (Figura 3F) y los niveles de IgE e IgG1 OVA específica (Figura 3G) así como la expresión de VEGF (Figura 3E) disminuyen significativamente en comparación con los ratones que expresan niveles normales de la subunidad β . Es poco probable que la disminución de estos parámetros este dado por la pérdida de la actividad de otros factores que dimerizan con ARNT como es el caso de AHR. En este estudio no es posible distinguir si el papel de HIF-1 β está dado durante la

sensibilización o el reto alérgico, sin embargo la atenuación de la producción de IgE OVA específica sugiere que HIF se involucra en la sensibilización alérgica.

Con la finalidad de estudiar el efecto opuesto, utilizamos EDHB, que se sabe induce de manera específica la expresión de este factor de transcripción. Este fármaco inhibe la actividad de las prolin-hidroxilasas, enzimas responsables de la hidroxilación de HIF-1 α , lo cual impide su degradación y por tanto promueve su acumulación en la célula. Ha sido ampliamente utilizado para evaluar la participación de HIF-1 α en la fisiopatogenia de diversas enfermedades neoplásicas en modelos experimentales. En este trabajo el EDHB nos permitió aumentar la expresión de HIF-1 α y evaluar su función durante la inflamación alérgica pulmonar. Contrario a lo observado en los animales tratados con 2ME2 y en los ratones KO para HIF-1 β , el grupo de ratones alérgicos y tratados con EDHB (OVA+EDHB), potencia el infiltrado inflamatorio ya existente en los ratones solo alérgicos (OVA). En ambos casos la inflamación está conformado por linfocitos, macrófagos y eosinófilos (Figura 4B). Un hallazgo interesante fue que el tratamiento con EDHB en ratones sin inflamación alérgica inducida por OVA (SS+EDHB), origina una respuesta inflamatoria (Figura 4C), caracterizada por la presencia de macrófagos, neutrófilos y en menor grado linfocitos, es decir, no es una respuesta alérgica. Este resultado muestra que la inducción de la expresión de HIF-1 sin ningún otro estímulo adicional, es capaz de generar un proceso inflamatorio y explica porque la hipoxia genera inflamación por sí sola. También aumenta la expresión de las proteínas HIF-1 α y VEGF en el tejido pulmonar (Figura 4D y E). Este incremento es estadísticamente significativo en comparación con los animales alérgicos que no recibieron el EDHB. Estos resultados corroboran la participación de HIF-1 en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar. Estos resultados son apoyados por el trabajo del grupo de Lee el cual fue publicado muy recientemente (79) (cuando el artículo en el que reportamos estos hallazgos se encontraba en prensa) (80). Ellos evaluaron la participación de HIF-1 α durante la inflamación alérgica pulmonar, encontrando el incremento del infiltrado inflamatorio, la hiperreactividad y permeabilidad vascular, así como la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 en un modelo murino después de la exposición al alérgeno (OVA). Adicionalmente ellos utilizan el inhibidor de HIF-1 α 2ME2 como tratamiento en su modelo murino, observando la disminución de la inflamación alérgica, hallazgo que había sido reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (81).

Adicionalmente, ellos observaron que células epiteliales tratadas con HIF-1 α siRNA presentan una disminución en la expresión de VEGF, finalmente en el mismo modelo experimental, utilizan un inhibidor de VEGF y de PI3K, que se ha demostrado que por esta vía de señalización se incrementa la expresión de la proteína de HIF-1 α , en donde muestran que HIF-1 α es activado en la inducción de la alergia por el alérgeno mediante la señalización de PI3K- δ .

Por nuestra parte demostramos por primera vez, que la exposición al alérgeno sobre regula la expresión de HIF-1 α y su gen blanco VEGF LBA y biopsias en pacientes asmáticos, lo que sustenta la participación de HIF-1 en el desarrollo de la alergia pulmonar.

Este estudio apoya la idea de que la activación de HIF-1 es necesaria para la (sensibilización al alérgeno) respuesta alérgica, lo cual permite proponer que el factor de transcripción HIF-1 sea utilizado como blanco terapéutico en las enfermedades alérgicas. Por otro lado, nuestros resultados en humanos y sustentados en modelos animales sugieren que los niveles de HIF podrían ser un biomarcador en el asma.

CONCLUSIONES

El conjunto de experimentos que se presentan en este trabajo permitió demostrar por primera vez la importancia de lo siguiente:

1. El factor de transcripción HIF-1 participa en la fisiopatogenia de la inflamación alérgica pulmonar.
2. La expresión de HIF-1 es suficiente para inducir inflamación pulmonar en ausencia de estímulo antigénico.
3. Se sugiere que HIF-1 tiene una participación análoga en el asma alérgica del humano y puede ser un marcador de progresión o gravedad.
4. El tratamiento con 2ME2 muestran que la modulación de HIF-1 puede ser útil en el tratamiento del asma.

REFERENCIAS

- (1) Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B5-11.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. NAEPP NN, editor. Expert Panel Report 3. 2007. Ref Type: Report
- (5) Venables KM, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *Lancet* 1997; 349(9063):1465-1469.
- (6) Respiratory function measurements in infants: measurement conditions. American Thoracic Society/European Respiratory Society. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 151[6], 2058-2064. 1995. Ref Type: Internet Communication
- (7) http://whqlibdoc.who.int/fact_sheet/2006/FS_307.pdf. 2010. Ref Type: Internet Communication
- (8) Eder W, Ege MJ, von ME. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006; 355(21):2226-2235.
- (9) Brim SN, Rudd RA, Funk RH, Callahan DB. Asthma prevalence among US children in underrepresented minority populations: American Indian/Alaska Native, Chinese, Filipino, and Asian Indian. *Pediatrics* 2008; 122(1):e217-e222.
- (10) Lai CK, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 2009; 64(6):476-483.
- (11) Pearce N, it-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 2007; 62(9):758-766.
- (12) Moorman JE, Zahran H, Truman BI, Molla MT. Current asthma prevalence - United States, 2006-2008. *MMWR Surveill Summ* 2011; 60 Suppl:84-86.

- (13) Del-Rio-Navarro B, Berber A, Blandon-Vijil V, Ramirez-Aguilar M, Romieu I, Ramirez-Chanona N et al. Identification of asthma risk factors in Mexico City in an International Study of Asthma and Allergy in Childhood survey. *Allergy Asthma Proc* 2006; 27(4):325-333.
- (14) Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(3):205-217.
- (15) Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol* 2000; 97(1):43-49.
- (16) Rothenberg ME. Eosinophils in the new millennium. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(6):1321-1322.
- (17) Robinson DS, Hamid Q, Jacobson M, Ying S, Kay AB, Durham SR. Evidence for Th2-type T helper cell control of allergic disease in vivo. *Springer Semin Immunopathol* 1993; 15(1):17-27.
- (18) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344(5):350-362.
- (19) Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1592-1600.
- (20) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Management of asthma exacerbations. *Thorax* 2004; 59(7):545-546.
- (21) Lemanske RF, Jr. Inflammatory events in asthma: an expanding equation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(6 Pt 2):S633-S636.
- (22) Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest* 2006; 129(4):1068-1087.
- (23) Pare PD, Wiggs BR, James A, Hogg JC, Bosken C. The comparative mechanics and morphology of airways in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143(5 Pt 1):1189-1193.
- (24) A.Martín Zurro, J.F.Cano Pérez. Compendio de Atención Primaria Conceptos, organización y práctica clínica. Segunda Edición[Capitulo 46], 416-428. 2005. Madrid, España, Elsevier España, S.A. Compendios Elsevier. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (25) Elias JA. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(3 Pt 2):S168-S171.
- (26) NHBI Global Strategy for Asthma Management and Prevention NHLBI/WHO Workshop Report: Global Initiative for Asthma 2004 (Update 2009), NIH Publication 3659. 2010. Ref Type: Internet Communication

- (27) NAEPP, NHLBI, NIH. Expert Panel Report 3: Guidelines for the diagnosis and Management of Asthma. 2007. Ref Type: Report
- (28) Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290(2):L209-L221.
- (29) Tanaka H, Yamada G, Saikai T, Hashimoto M, Tanaka S, Suzuki K et al. Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(12):1495-1499.
- (30) Kourembanas S, Morita T, Christou H, Liu Y, Koike H, Brodsky D et al. Hypoxic responses of vascular cells. *Chest* 1998; 114(1 Suppl):25S-28S.
- (31) Boussat S, Eddahibi S, Coste A, Fataccioli V, Gouge M, Housset B et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(2):L371-L378.
- (32) Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int* 1997; 51(2):438-443.
- (33) Chetta A, Zanini A, Torre O, Olivieri D. Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; 6(1):41-45.
- (34) Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 2004; 10(10):1095-1103.
- (35) Lee KS, Min KH, Kim SR, Park SJ, Park HS, Jin GY et al. Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(2):161-170.
- (36) Lee YC, Lee HK. Vascular endothelial growth factor in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(6):1106.
- (37) Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9):4604-4613.
- (38) Li D, Teng X, Johns RA. Up-regulation of angiogenic factor expression in hypoxia-treated mouse lung demonstrated by DNA array technique. *Chest* 2002; 121(3 Suppl):78S.
- (39) Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270(22):13333-13340.

- (40) Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995; 77(3):638-643.
- (41) Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242(4884):1412-1415.
- (42) Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(13):5680-5684.
- (43) Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10(8):858-864.
- (44) Goda N, Dozier SJ, Johnson RS. HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(4):467-473.
- (45) Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003; 23(1):359-369.
- (46) Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002; 46(10):2587-2597.
- (47) Mojsilovic-Petrovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Stanimirovic DB, Zhang W. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *J Neuroinflammation* 2007; 4:12.
- (48) Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 2004; 51(3):563-585.
- (49) Hopfl G, Ogunshola O, Gassmann M. Hypoxia and high altitude. The molecular response. *Adv Exp Med Biol* 2003; 543:89-115.
- (50) Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94(5):1561-1567.
- (51) Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 2003; 17(14):2115-2117.

- (52) Sharma V, Dixit D, Koul N, Mehta VS, Sen E. Ras regulates interleukin-1beta-induced HIF-1alpha transcriptional activity in glioblastoma. *J Mol Med* 2011; 89(2):123-136.
- (53) Stasinopoulos I, O'Brien DR, Bhujwala ZM. Inflammation, but not hypoxia, mediated HIF-1alpha activation depends on COX-2. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(1):31-35.
- (54) Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272(36):22642-22647.
- (55) Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci* 2002; 17(5):581-588.
- (56) Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(11):5667-5672.
- (57) Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:307-340.
- (58) Sogawa K, Nakano R, Kobayashi A, Kikuchi Y, Ohe N, Matsushita N et al. Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(6):1936-1940.
- (59) Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw ML, Pettersson S, Poellinger L. Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via the E box motif. *J Biol Chem* 1995; 270(23):13968-13972.
- (60) Masson N, Ratcliffe PJ. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 15):3041-3049.
- (61) Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; 16(12):1466-1471.
- (62) Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC et al. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25733-25741.
- (63) Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999; 274(10):6519-6525.

- (64) Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J* 1998; 17(22):6573-6586.
- (65) Gu J, Milligan J, Huang LE. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol Chem* 2001; 276(5):3550-3554.
- (66) Lee SY, Kwon S, Kim KH, Moon HS, Song JS, Park SH et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97(6):794-799.
- (67) Tomita S, Sinal CJ, Yim SH, Gonzalez FJ. Conditional disruption of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene leads to loss of target gene induction by the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Endocrinol* 2000; 14(10):1674-1681.
- (68) Yopez SH, Pando RH, Argumedo LS, Paredes MV, Cueto AH, Isibasi A et al. Therapeutic efficacy of an E coli strain carrying an ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OMPC in a murine model of allergic airway inflammation. *Vaccine* 2003; 21(5-6):566-578.
- (69) Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003; 3(4):363-375.
- (70) Tomita S, Ueno M, Sakamoto M, Kitahama Y, Ueki M, Maekawa N et al. Defective brain development in mice lacking the Hif-1 α gene in neural cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(19):6739-6749.
- (71) Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 2003; 370(Pt 3):1011-1017.
- (72) Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature* 2008; 453(7196):807-811.
- (73) Guo J, Lu W, Shimoda LA, Semenza GL, Georas SN. Enhanced interferon-gamma gene expression in T Cells and reduced ovalbumin-dependent lung eosinophilia in hypoxia-inducible factor-1-alpha-deficient mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(2):98-102.
- (74) Saini Y, Kim KY, Lewandowski R, Bramble LA, Harkema JR, Lapres JJ. Role of hypoxia-inducible factor 1 α in modulating cobalt-induced lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298(2):L139-L147.

- (75) Dahut WL, Lakhani NJ, Gulley JL, Arlen PM, Kohn EC, Kotz H et al. Phase I clinical trial of oral 2-methoxyestradiol, an antiangiogenic and apoptotic agent, in patients with solid tumors. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(1):22-27.
- (76) James J, Murry DJ, Treston AM, Storniolo AM, Sledge GW, Sidor C et al. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of 2-methoxyestradiol alone or in combination with docetaxel in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer. *Invest New Drugs* 2007; 25(1):41-48.
- (77) Zhou Q, Gustafson D, Nallapareddy S, Diab S, Leong S, Lewis K et al. A phase I dose-escalation, safety and pharmacokinetic study of the 2-methoxyestradiol analog ENMD-1198 administered orally to patients with advanced cancer. *Invest New Drugs* 2011; 29(2):340-346.
- (78) <http://www.entremed.com/news/entremed-announces-fda-acceptance-of-ind-application-for-panzem-in-rheumatoid-arthritis>. 2011. Ref Type: Internet Communication
- (79) Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Moon H et al. HIF-1alpha inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium. *Eur J Immunol* 2010; 40(10):2858-2869.
- (80) Huerta-Yeppez S, Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Hernandez-Pando R, Vega MI, Chi L et al. Hypoxia Inducible Factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy* 2011.
- (81) Huerta-Yeppez S, Baay-Guzman GJ, Garcia-Zepeda R, Hernandez-Pando R, Vega MI, Gonzalez-Bonilla C et al. 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clin Immunol* 2008; 129(2):313-324.

ANEXOS

Hypoxia Inducible Factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis

S. Huerta-Yepez^{1,*}, G. J. Baay-Guzman^{1,*}, I. G. Bebenek², R. Hernandez-Pando³, M. I. Vega⁴, L. Chi², M. Riedl⁵, D. Diaz-Sanchez⁶, E. Kleerup⁷, D. P. Tashkin⁸, F. J. Gonzalez⁹, B. Bonavida¹⁰, M. Zeidler^{5,11} & O. Hankinson²

¹Unidad de Investigacion En enfermedades Oncologicas, Hospital Infantil de Mexico, Federico Gomez, Mexico City, Mexico; ²Department of Pathology and Laboratory Medicine, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA, USA; ³Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Science and Nutrition, Salvador Zubiran; ⁴Unidad de Investigacion Medica en Enfermedades Oncologica, Hospital de Oncologia CMN siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico; ⁵Department of Clinical Immunology and Allergy, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA; ⁶Clinical Research Branch, Human Studies Division, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Chapel Hill, NC; ⁷Pulmonary and Critical Care Medicine, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA; ⁸Department of Medicine, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA; ⁹Laboratory of Metabolism, Center for Cancer Research, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, MD; ¹⁰Department of Microbiology Immunology and Molecular Genetics, UCLA, Los Angeles, CA; ¹¹WLA-VA Medical Center, Division of Pulmonary, Critical Care, and Sleep Medicine, Los Angeles, CA, USA

To cite this article: Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Hernandez-Pando R, Vega MI, Chi L, Riedl M, Diaz-Sanchez D, Kleerup E, Tashkin DP, Gonzalez FJ, Bonavida B, Zeidler M, Hankinson O. Hypoxia Inducible Factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy* 2011; **66**: 909–918.

Keywords

allergic airway inflammation; asthma; hypoxia-inducible factor; rhinitis.

Correspondence

Dr. Oliver Hankinson. UCLA Pathology and Laboratory Medicine. Box 951732, 10833 Le Conte Ave., 13-244 Factor Building, Los Angeles CA 90095-1732, USA.
Tel.: +310-825-2936
Fax: 310-794-9272
E-mail: ohank@mednet.ucla.edu

*Equal first authors.

Accepted for publication 14 March 2011

DOI:10.1111/j.1398-9995.2011.02594.x

Edited by: Angela Haczku

Abstract

Background: New therapies are necessary to address inadequate asthma control in many patients. This study sets out to investigate whether hypoxia-inducible factor (HIF) is essential for development of allergic airway inflammation (AAI) and therefore a potential novel target for asthma treatment.

Methods: Mice conditionally knocked out for HIF-1 β were examined for their ability to mount an allergic inflammatory response in the lung after intratracheal exposure to ovalbumin. The effects of treating wild-type mice with either ethyl-3, 4-dihydroxybenzoate (EDHB) or 2-methoxyestradiol (2ME), which upregulate and downregulate HIF, respectively, were determined. HIF-1 α levels were also measured in endobronchial biopsies and bronchial fluid of patients with asthma and nasal fluid of patients with rhinitis after challenge.

Results: Deletion of HIF-1 β resulted in diminished AAI and diminished production of ovalbumin-specific IgE and IgG₁. EDHB enhanced the inflammatory response, which was muted upon simultaneous inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF). EDHB and 2ME antagonized each other with regard to their effects on airway inflammation and mucus production. The levels of HIF-1 α and VEGF increased in lung tissue and bronchial fluid of patients with asthma and in the nasal fluid of patients with rhinitis after challenge.

Conclusions: Our results support the notion that HIF is directly involved in the development of AAI. Most importantly, we demonstrate for the first time that HIF-1 α is increased after challenge in patients with asthma and rhinitis. Therefore, we propose that HIF may be a potential therapeutic target for asthma and possibly for other inflammatory diseases.

Asthma is one of the most common chronic diseases in the world. Even with maximal medical therapy, many patients with asthma do not achieve adequate asthma control (1) resulting in a need for additional anti-asthmatic drugs.

The transcriptional response to hypoxia is primarily mediated by the hypoxia-inducible factor (HIF) family of transcription factors. HIFs are heterodimeric proteins containing one α subunit and one β subunit. HIF-1 α and HIF-2 α are both

expressed widely, as is HIF-1 β [the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)]. HIF-2 β (ARNT2) has a more limited tissue distribution. The β subunits are constitutively expressed, and regulation of HIFs occurs mainly via effects on the α subunits. Under normoxic conditions, the HIF- α subunits are hydroxylated on key proline residues, thereby allowing for their recognition by the von Hippel-Lindau (pVHL) tumor suppressor protein that targets HIF- α for proteasomal degradation. Hydroxylation of both prolines is catalyzed by a family of three iron-containing prolyl hydroxylases in a reaction requiring O₂, iron, ascorbate and 2-oxoglutarate (2). HIF-1 α inhibition also occurs through the hydroxylation of an asparagine residue by an O₂, iron, and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 α , which prevents HIF-1 α from interacting with the coactivator p300 under normoxic conditions (3). During hypoxia, HIF-1 α and/or HIF-2 α dimerize with ARNT and/or ARNT2, and this complex then binds hypoxia response elements (HREs) in the promoters of target genes and upregulates their transcription (4). HIF target genes include those for several pro-inflammatory cytokines, chemokines, and adhesion molecules, including VEGF. However, HIF-1 α and HIF-2 α regulate unique as well as shared target genes and play nonredundant roles in the organism (5, 6).

It has been proposed that HIF plays a role in human allergic airway diseases (7–11). We previously reported that the nonspecific HIF inhibitor 2-methoxyestradiol (2ME) reduced the allergic pulmonary inflammatory and airway remodeling responses to ovalbumin in a mouse model (9). Guo and coworkers (10) demonstrated that mice heterozygous for a HIF-1 α null allele exhibited diminished lung eosinophilia in response to an ovalbumin challenge. However, only limited aspects of the allergic airway response were studied by these last investigators. We therefore decided to thoroughly evaluate the role of HIF in a mouse model of allergic airway response using both genetic and pharmacological perturbations. Our investigations provide compelling evidence for a role of HIF in the development of allergic lung inflammation in the mouse. Importantly, we also demonstrate directly that exposure to allergen leads to upregulation of HIF-1 α and VEGF expression in patients with asthma and rhinitis, as it does in our mouse model of allergic airway inflammation.

Methods

Breeding and genotyping of mice

The original *Arnt*^F allele contained a *neo* cassette, which was excised as described previously (12). The *Arnt*^{f/f} mice, which were of a mixed C57BL/6, 129/Sv, and FVB/N genetic background, were backcrossed to homozygous *Mx1-Cre*⁺ mice in a C57BL/6 genetic background, and at least ten successive times to the C57BL/6 strain. Genotyping of the *Arnt*^F and *Arnt*^A alleles and the *Mx1-Cre* transgene was performed by PCR (13). *Mx1-Cre*^{+/-} heterozygotes could not be distinguished from *Mx1-Cre*^{+/+} homozygotes by this procedure, and these genotypes are collectively referred to as *Mx1-Cre*⁺.

Treatment of mice

Deletion of the *Arnt* allele in *Mx1-Cre*⁺: *Arnt*^{f/f} male mice was induced by intraperitoneal (i.p.) injection with 500 μ g of polyinosinic-polycytidylic acid (pIpC; Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS on three occasions 2 days apart. Sensitization was elicited by two i.p. treatments, 5 days apart, of 10 μ g chicken egg ovalbumin (OVA, grade V; Sigma) emulsified in 1 mg of aluminum hydroxide (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) in a total volume of 100 μ l. Mice were challenged via intratracheal (i.t.) administration of 0.75% OVA on two or three occasions, as indicated. Treatments with ethyl 3,4, dihydroxybenzoate (EDHB) (Sigma), and/or 9 mg/kg (E)-3-(3, 5-Diisopropyl-4-hydroxyphenyl)-2-[(3-phenyl-n-propyl)amino-carbonyl]acrylonitrile (SU1498; Calbiochem, San Diego, CA, USA), or 30 mg/kg 2-methoxyestradiol (2-ME; Sigma) were performed as indicated. Control mice received vehicle solvent only. Mice were euthanized by inhalation of isoflurane. All experiments were performed in accordance with UCLA and INCMN Mexico City regulations.

Lung histology and morphometric analysis

Calculations of inflammatory area and PAS staining carried out as described previously (14).

Immunocytochemistry

Deparaffinized 4- μ m sections were used for immunohistochemical analysis using the LSAB kit (DAKO, Carpinteria, CA, USA) and antibodies against HIF-1 α (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), HIF-2 α (1:750; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), ARNT, ARNT2, or VEGF (1:500, 1:500, and 1:750, respectively; Santa Cruz). All samples from each group were processed at the same time in a single experiment using a single batch of antibody diluted in PBS with normal goat serum (NGS).

Bronchoalveolar lavage (BAL)

Mice were euthanized by exsanguination. Differential counts were performed on four to six H&E-stained cytospin preparations for each experimental group. VEGF in BAL supernatant fluid of rhinitis subjects was determined by ELISA as described previously (15).

OVA-specific IgG1 and IgE

Ovalbumin-specific IgE and IgG1 levels were measured in mouse serum samples using ELISA (15).

Human subjects

Patients with asthma

Eleven mild to moderate cat allergic asthmatic subjects (six women/five men), ages ranging 18–43 (18.5 \pm 7.0), with a mean FEV1 of 96 \pm 8% were studied at baseline with fiberoptic bronchoscopy in which endobronchial biopsies and

BAL were obtained. Three days later, subjects underwent a naturalistic cat room challenge in which they were exposed to three cats housed in a vivarium room, until their FEV₁ dropped by 20% or for an hour, whichever occurred first. The average FELd1 concentration in air samples from the cat room was 17.2 ± 5.8 ng Fel d I/cu meter air 3 days later, subjects again underwent repeat fiberoptic bronchoscopy with endobronchial biopsies and BAL. Further details are provided in Data S1.

Patients with rhinitis

Ten healthy nonsmoking volunteers (one man and nine women) ages 20–40 were recruited for the study. Subjects reported a history of cat allergy but no history of perennial allergic rhinitis. Use of antihistamine, intranasal, or immunosuppressive medication was prohibited 3 days before or at any time during the study. Epicutaneous skin testing was performed with Standardized Cat Allergen Extract – 10 000 BAU units/ml (Hollister Stier, Spokane, WA, USA) to confirm allergic sensitization. Each subject completed a graded intranasal allergen challenge to determine the cat allergen dose stimulating nasal allergy symptoms. (See Data S1) The dose stimulating a symptom score of ≥ 8 was subsequently used for the single allergen dose challenge with nasal lavage samples collected for analysis. Subjects who did not achieve the required symptom score during the graded challenge were excluded from further participation. At least 2 weeks after the graded dose-determination procedures, subjects returned for the single intranasal cat allergen challenge. Subjects performed nasal lavage with 40 ml of sterile saline at baseline (prior to intranasal allergen) and 1 h after intranasal allergen challenge using previously described methods (15). Nasal lavage samples were spun at 1100 g for 30 min at 4°C. The cells from the pellet were collected and used for IHC.

All subjects signed an informed consent, and study activities were approved by the Human Subject Protection Committee of the University of California, Los Angeles.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviations. Statistical comparisons were performed using one-way analysis of variance followed by Fisher's exact test, the unpaired Student's *t*-test, or the Mann–Whitney *U*-test. For the correlation between HIF-1 α and VEGF expression in the human samples, we used Pearson's correlation analysis.

Results

HIF-1 α and HIF-2 α are upregulated in mouse lung in a mouse model of allergic airway inflammation

C57BL/6 mice were subjected to a previously described allergenic protocol (14) (Fig. 1A). Lung sections were subjected to hematoxylin and eosin (H&E) staining and also stained for either HIF-1 α or HIF-2 α . Representative lung sections and quantitative analysis of the staining of four

mice are presented in Fig. 1B, C, D and E. Markedly elevated levels of HIF-1 α and HIF-2 α were observed in the nuclei of the bronchial epithelial cells of the ovalbumin treated mice. Inflammatory cells in the ovalbumin-treated mice also expressed both proteins. Expression was observed in macrophages and lymphocytes.

OVA-sensitized/challenged mice conditionally knocked out for Arnt have a reduced allergic response in the lung

We wished to analyze mice deficient in HIF activity. As described above, both HIF-1 α and HIF-2 α are expressed in mouse lung. However, whereas Arnt is also expressed in the lung, Arnt2 is not (16–18). We therefore studied Arnt-deficient mice. Because mice that are homozygous for an *Arnt* null allele (like *Hif-1 α* knockout and *Hif-2 α* knockout mice) die *in utero* (19, 20), it was necessary to use conditional knockout mice in which deletion is induced in the *Arnt* gene in adulthood. To achieve this, we developed *Arnt^{flf}:Mx1-Cre⁺* mice. The *Mx1* promoter is silent unless the cell is treated with polyinosinic-polycytidylic acid (pIpC). Thus, in *Arnt^{flf}:Mx1-Cre⁺* mice injected intraperitoneally with pIpC, substantial inactivation of the Arnt gene occurs in most tissues of the body, including the lung (12). Immunohistochemical analysis of our mice showed that pIpC treatment led to about an 80% diminution in the levels of the Arnt protein (Fig. S1) in lung tissue.

Arnt^{flf}:Mx1-Cre⁺ and *Arnt^{flf}:Mx1-Cre⁻* mice were used. Five mice of each genotype were subjected to the same allergenic protocol as illustrated in Fig. 1A except that they were also treated i.p. with 500 μ g pIpC (Fig. 2A). *Cre⁻* and *Cre⁺* mice untreated with OVA exhibited no significant inflammatory infiltration. In contrast, OVA treatment in the *Cre⁻* mice elicited a marked perivascular and peribronchiolar inflammatory infiltration comprised mostly of mononuclear cells. The *Cre⁺* mice treated with OVA exhibited a marked reduction in the degree of inflammatory cell infiltration, compared with the similarly treated *Cre⁻* mice (Fig. 2B, C). OVA treatment of *Cre⁻* mice increased the level of the HIF target gene, VEGF, in the cytoplasm of cells lining the bronchioles, while there were fewer VEGF-positive cells in *Cre⁺* mice treated similarly (Fig. 2D–E). The increase in VEGF occurring during the inflammatory response is at least partially mediated by Arnt (Fig. 2F, G), consistent with the upregulation of HIF-1 α and HIF-2 α that occur in these cells. OVA treatment increased the concentration of total leukocytes in mice of both genotypes. However, there were fewer lymphocytes and eosinophils in *Cre⁺* mice compared with *Cre⁻* mice (Fig. 2H). Disruption of Arnt was also associated with a decrease in OVA stimulation of OVA-specific IgE and IgG1 production in the sera of the mice (Fig. 2I, J). Of note, mice sensitized and not challenged did not exhibit increase in any of the hallmark parameters of AAI (data not shown). In conclusion, decreased Arnt expression diminishes manifestations of the allergic response, including lung inflammation with eosinophilia, and allergen-specific IgE and IgG1 production.

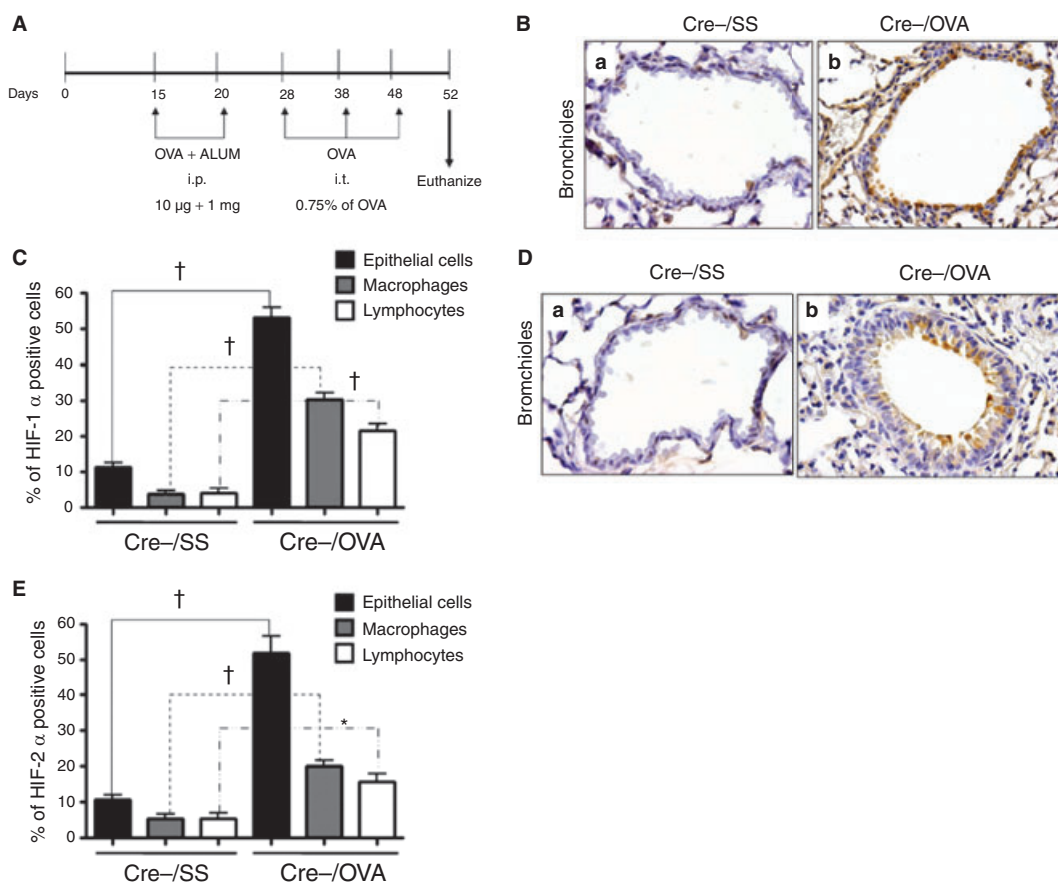


Figure 1 Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α are upregulated in mouse lung in a mouse model of allergic airway inflammation. (A) Experimental protocol. (B, D) Representative lung sections of C57BL/6 mice treated with ovalbumin (OVA) (Cre-OVA) or

sterile saline (Cre-SS) and stained for HIF-1 α and HIF-2 α , respectively. (C, E) Quantification of the immunostaining for HIF-1 α and HIF-2 α , respectively, in four mice in each case. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$.

Increased HIF expression enhances the inflammatory response

Ethyl-3,4-dihydroxybenzoate upregulates HIF-1 α (and presumably HIF-2 α) by inhibiting prolyl hydroxylases competitively with regard to two of their cosubstrates, oxoglutarate and ascorbate (21, 22), and this compound upregulated HIF-1 α in mouse lung (Fig. S2). We injected Balb/c mice i.p. with EDHB on two occasions, 1 day before each intratracheal challenge with OVA (Fig. 3A). EDHB further enhanced the increase in perivascular and peribronchiolar inflammation elicited by OVA (Fig. 3B, C).

EDHB and 2-methoxyestradiol, a nonspecific inhibitor of HIF activity, antagonize each other's effects on airway inflammation and mucus production

We investigated the effect of using 2ME, a nonspecific inhibitor of HIF, which we previously demonstrated to inhibit the AAI response in mice (9), in conjunction with EDHB. However, 2ME destabilizes HIF-1 α indirectly, most

likely as a consequence of microtubule disruption and/or inhibition of mitochondrial respiration (23, 24) and thus has a different molecular target(s) from EDHB. Balb/c mice were treated as outlined in Fig. 4A. As expected, OVA treatment led to increases in inflammatory airway inflammation and also in the production of mucin within goblet cells. (Increases in mucin are routinely observed in this mouse model.) (Fig. S3 and Fig. 4B, C). EDHB enhanced the inflammatory response to OVA, as before, and also increased mucus production. Interestingly, EDHB, even in the absence of OVA, enhanced inflammation. 2ME treatment after OVA challenge reduced the stimulatory effect of OVA on inflammation and mucus production. Importantly, treatment with OVA, 2ME, and EDHB had more of an effect on all the parameters measured than treatment with OVA and 2ME, but had less of an effect on these same parameters than OVA and EDHB. Thus, 2ME and EDHB antagonized each other's effects on these manifestations of allergic airway inflammation, supporting the notion that the effects of each agent on these parameters are indeed mediated by the agents' effects on HIF,

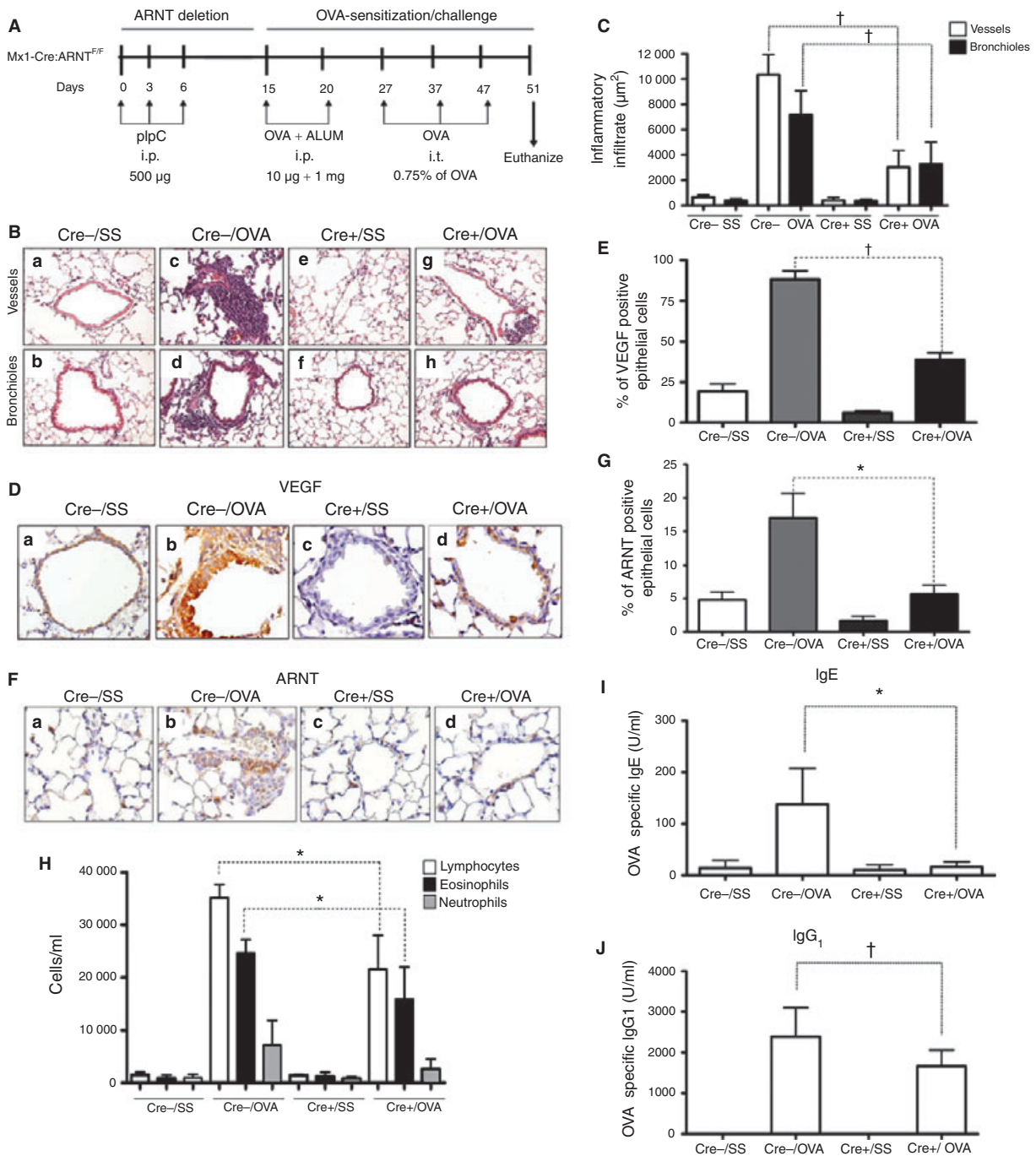


Figure 2 Ovalbumin (OVA)-sensitized/challenged mice conditionally knocked out for *Arnt* have a reduced allergic response in the lung. (A) Experimental protocol. (B) Representative H&E-stained sections of lung tissues were obtained from OVA-sensitized/challenged mice (OVA) and control mice treated with sterile saline (SS), of genotype *Arnt*^{fl/fl}:*Mx1-Cre*⁺ (Cre+) or *Arnt*^{fl/fl}:*Mx1-Cre*⁻ (Cre-). All mice received plpC. (C) The degree of inflammatory infiltration in venules and middle-size veins and in bronchioles from five mice from each experimental group was determined as described in Methods. Results are expressed as averages and standard deviations of infil-

trated area. Empty bars: perivascular infiltrate; solid bars: peribronchiolar infiltrate. (D, F) Immunohistochemical staining of VEGF and Arnt in lung tissue of representative *Arnt*^{fl/fl}:*Mx1-Cre*⁺ and *Arnt*^{fl/fl}:*Mx1-Cre*⁻ mice treated as described in (B). (E, G) Quantification of VEGF and Arnt staining in five mice from each group. (H) Total leukocytes and differential cell counts in Bronchoalveolar lavage from OVA-sensitized/challenged and control *Arnt*^{fl/fl}:*Mx1-Cre*⁺ and *Arnt*^{fl/fl}:*Mx1-Cre*⁻ mice (cells/ml). (I and J) IgE and IgG1 levels in the sera of five mice in each group. **P* < 0.05, †*P* < 0.01, Cre+ OVA vs Cre- OVA (*U* Mann Whitney).

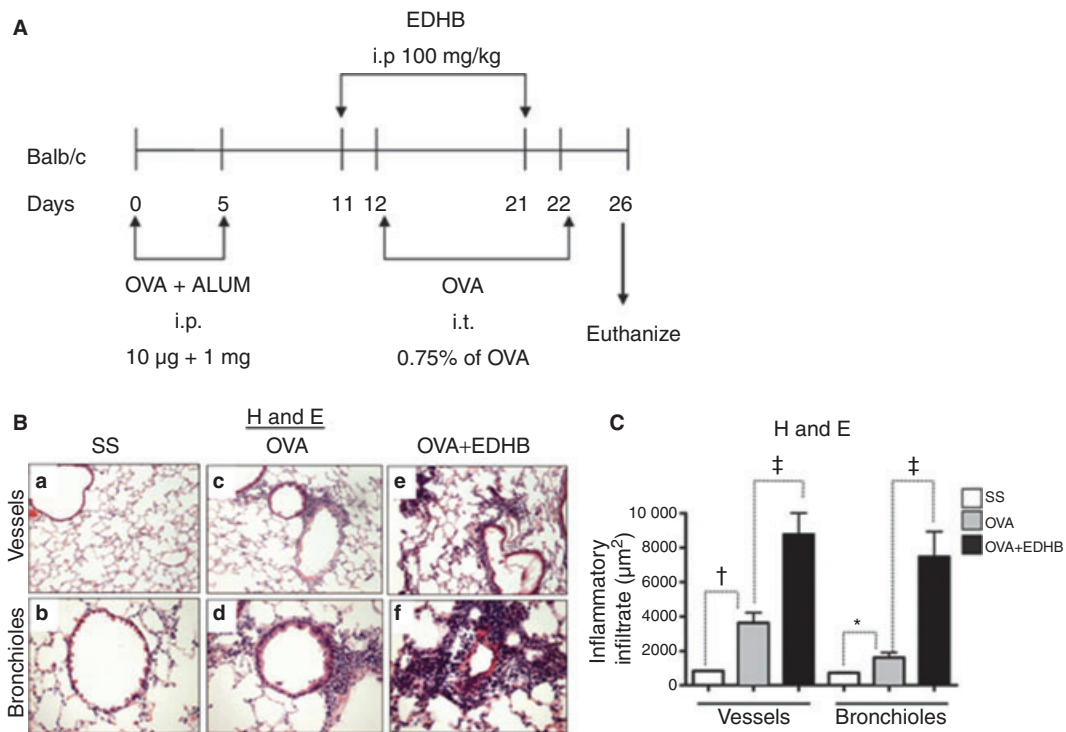


Figure 3 Increased hypoxia-inducible factor expression enhances allergic airway inflammation in Bronchoalveolar lavage B/c mice. (A) Experimental Protocol. Each group consisted of five mice. (B) Representative H&E-stained sections of lung tissues showing blood

vessels or bronchioles. (C) Quantification of the inflammatory response for the five mice from each group. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$, ‡ $P < 0.001$.

and most importantly, supporting the notion that HIF directly impacts the allergic airway response.

Attenuation of the allergic inflammatory response after inhibition of VEGF activity

VEGF has been reported to play a role in the airway inflammatory response (25). We applied a VEGF receptor 2 inhibitor, SU1498, after treatment with EDHB (Fig. 5A). Treatment with SU1498 reduced inflammation induced by EDHB alone, by OVA alone, and by OVA plus EDHB, indicating that the involvement of HIF in the allergic pulmonary response is at least partly mediated by upregulation of VEGF (Figs S4 and 5B).

HIF-1 α expression is increased in patients with asthma and rhinitis after allergen challenge

We next investigated the potential role of HIF in allergic airway diseases in the human. We measured HIF-1 α and VEGF protein levels in cells from BAL and in endobronchial biopsies from eleven patients with asthma before and after exposure to cats in an enclosed room. Cells from BAL were primarily macrophages (Fig. 6A). Both HIF-1 α and VEGF levels increased in bronchial lavage cells after allergen challenge (Fig. 6B, C, and D). HIF-1 α was predominantly nuclear, although some cytoplasmic staining was observed.

VEGF was expressed predominantly in the cytoplasm or in the cell membrane. The levels of both HIF-1 α and VEGF in endobronchial biopsies of the eleven patients were also higher after challenge (Fig. 6E). (This was also true for HIF-2 α ; Fig. S5). In addition, we examined nasal lavage from ten patients with rhinitis. We observed increased HIF-1 α in nasal lavage cells after cat allergen challenge in the patients with rhinitis (Fig. 6F, G). The expression was predominantly nuclear, although some cytoplasmic staining was observed. There was a direct correlation between HIF-1 α immunostaining and VEGF expression (as measured by ELISA), in the nasal lavage fluid (Fig. 1H) after challenge (* $P < 0.05$, $r = 0.7930$). These results suggest that HIF-1 is likely to play a role in the pathogenesis of allergic disease in the human.

Discussion

Our studies on mice confirm and extend previous observations suggesting a role for HIF in allergic airway inflammation (7–10, 26). First, we showed that upregulation of HIF-1 α and HIF-2 α occurs during allergic airway inflammation in mice. Second, we found that the inflammatory responses to OVA challenge, including inflammatory cell infiltration, eosinophil recruitment, VEGF expression, and allergen-specific IgE and IgG1, were all attenuated in pIpC-treated *Arnt^{fl/fl};Mx1-Cre⁺* mice, in which *Arnt* expression is

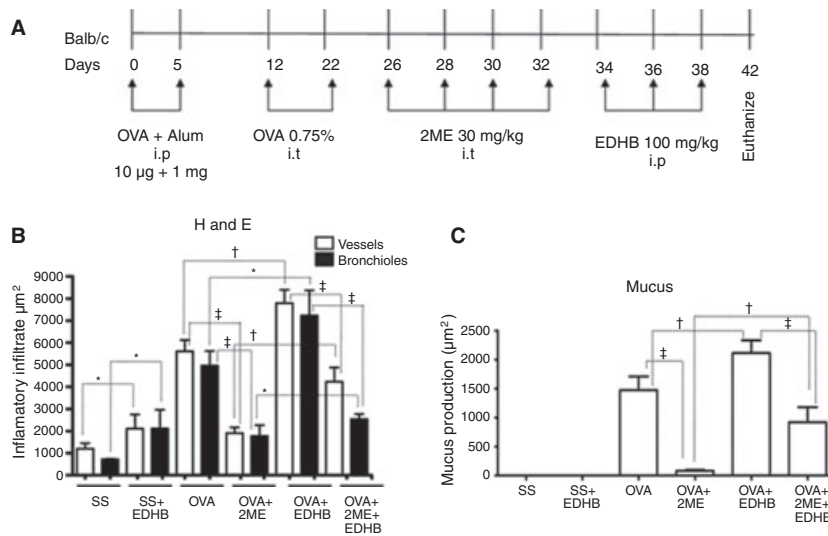


Figure 4 Inhibition of hypoxia-inducible factor activity attenuates the stimulatory effect of Ethyl-3,4-dihydroxybenzoate on airway inflammation and mucus production. (A) Experimental Protocol. (B)

and C) Quantification of the inflammatory response and mucus production, respectively, in five mice from each experimental group. **P* < 0.05, †*P* < 0.01, ‡*P* < 0.001.

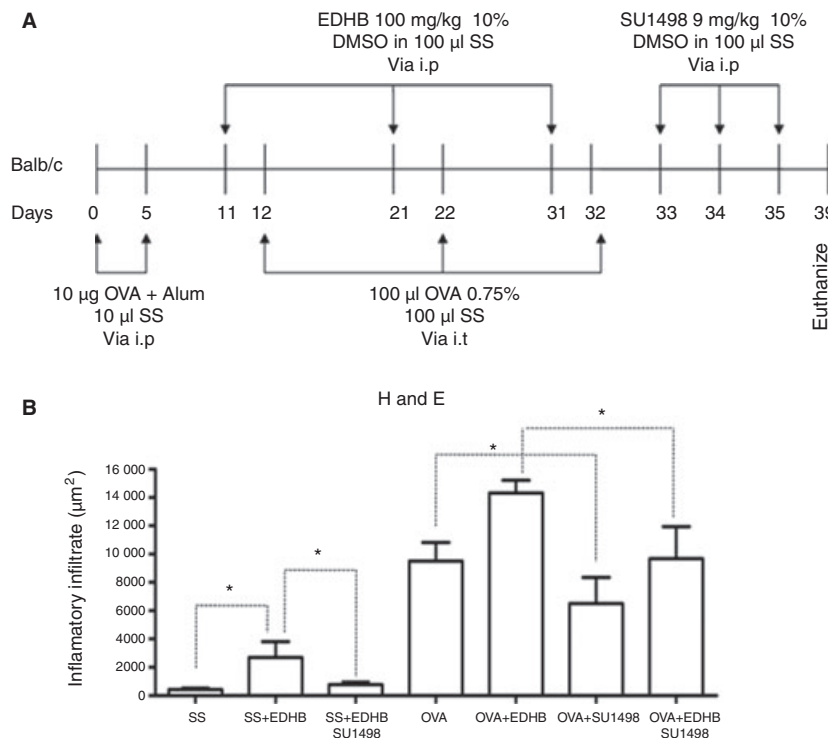


Figure 5 Attenuation of the allergic inflammatory response after inhibition of VEGF activity. (A) Experimental Protocol. (B) Quantifica-

tion of the inflammatory response in five mice from each experimental group. **P* < 0.05.

diminished. Arnt can dimerize with certain other members of the bHLHPAS family of proteins, including the aryl hydrocarbon receptor, single-minded homologs 1 and 2 (Sim 1 and 2), and NXF (27–29). However, it is unlikely that the diminution in the allergic airway response observed in the

Arnt-deficient mice is because of loss of activity with these alternative dimerization partners, because the Sim proteins function mainly as transcriptional repressors (30), NXF has a very limited tissue-specific expression, excluding the lung (29), and C57BL/6 *Ahr*-null mice do not exhibit a reduced allergic

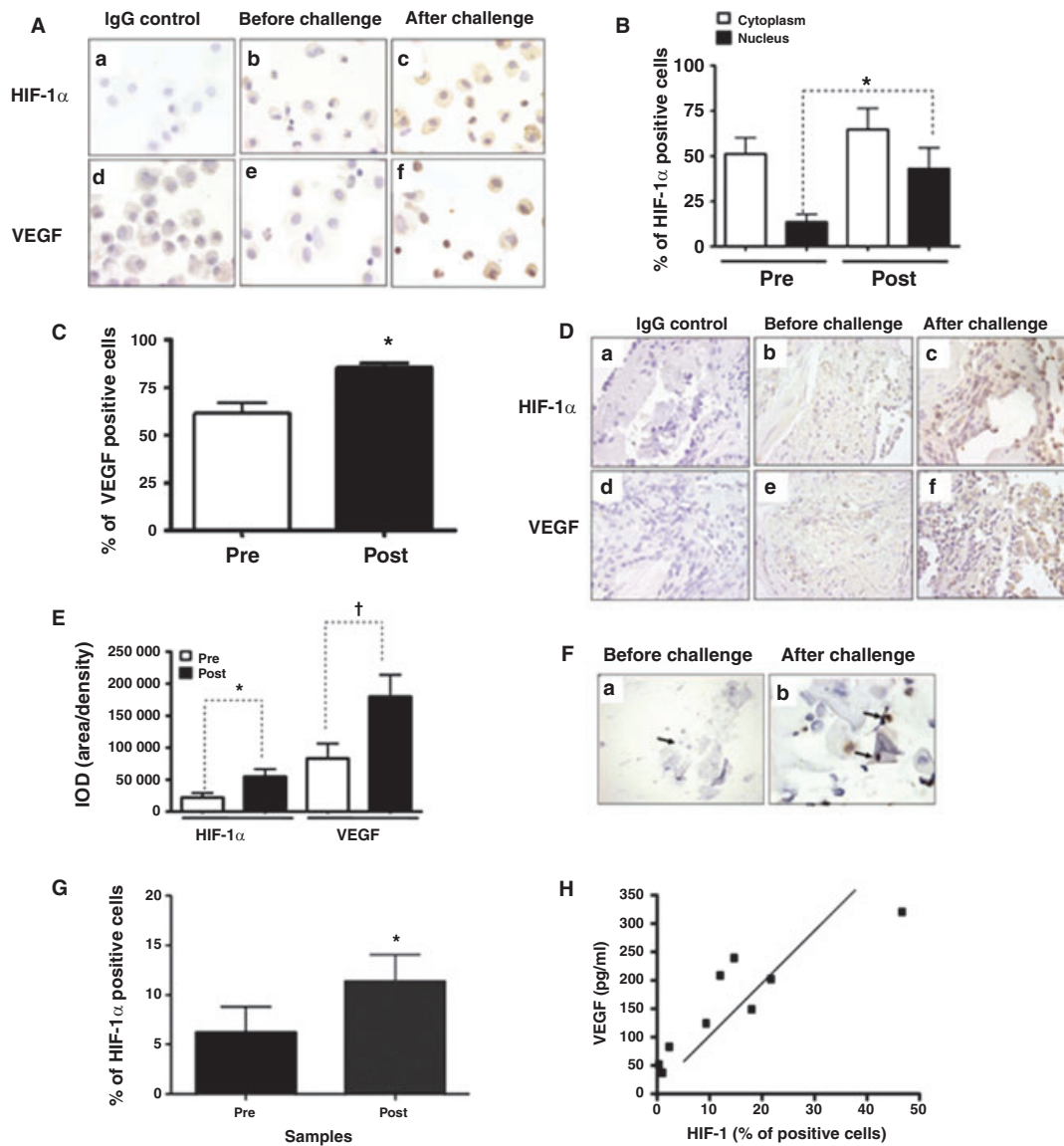


Figure 6 Enhanced hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and VEGF expression in bronchial lavage and lung tissue from patients with asthma (A–E) and nasal lavage from patients with rhinitis (F–H) after allergen challenge. (A) Representative photomicrographs of HIF-1 α and VEGF immunostaining (100 \times) in epithelial cells from bronchial lavage of patients with asthma before and after naturalistic cat challenge. The specificity of the antibodies is shown in staining with the IgG control. (B, C) Frequency of HIF-1 α and VEGF-positive cells in bronchial lavage from 11 patients with asthma. (D) Representative photomicrographs of HIF-1 α and VEGF before and after challenge (40 \times) in endobronchial biopsies. (E) Quantification of the expression of HIF-1 α and VEGF, before and after the cat

challenge in 11 patients (pre- and postchallenge data was collected from the same patient). * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ (ANOVA). (F) Representative photomicrographs of HIF-1 α immunostaining (100 \times) in patients with rhinitis before (a) and after (b) challenge. (G) Quantification of HIF-1 α -positive cells (left), before and after the challenge. The mean and standard deviations were derived from data collected from 10 patients. (H) Correlation analysis between HIF-1 α immunostaining and VEGF expression as measured by ELISA (right), after the challenge. The analysis was performed from data collected from the 10 patients. Student t -test * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ pre- vs postchallenge HIF-1 α expression. Pearson's analysis * $P < 0.05$, * $r = 0.7930$. Postchallenge HIF-1 α vs VEGF.

lung inflammatory response after an OVA challenge protocol very similar to the one we performed here (31).

Third, EDHB markedly enhanced the allergic response to OVA including airway inflammation and mucin production. Fourth, the effects of EDHB and the nonspecific HIF-1 α

inhibitor, 2-ME, on the allergic airway response antagonized each other, thus providing evidence that these agents affect this response via their effects on HIF and supporting the notion that HIF activity directly affects this response. Interestingly, the effects of EDHB were partially inhibited when

followed by treatment with the VEGFR2 inhibitor SU1498, suggesting that the role of HIF in the allergic airway response is at least partly mediated by upregulation of VEGF.

Interestingly, HIF-1 α activity in the alveolar epithelium appeared to protect against the development of an asthma-like inflammatory response to inhaled cobalt in the mouse (32). However, cobalt is a hypoxia mimic and direct inducer of HIF-1 α and HIF-2 α , and the relevance of this study to ours is unclear.

We show here that allergen exposure leads to upregulation of HIF-1 α and VEGF in endobronchial biopsies and bronchial lavage cells of patients with asthma and in nasal lavage of patients with rhinitis. To our knowledge, this is the first time that HIF-1 α and VEGF expression have been shown directly to increase in patients with asthma and rhinitis after allergen challenge. Our clinical observations therefore support a role for HIF in the development of allergic airway diseases.

Our human and animal studies data suggest that HIF levels may serve as a useful biomarker for poor asthma control and a clinical therapeutic target. With regard to the latter notion, several compounds have been identified that down-regulate HIF and there is a major effort underway in both academia and the pharmaceutical industry to develop specific small molecule inhibitors of HIF (33, 34). Our studies suggest that such molecules will represent potential novel treatments for asthma.

Author contributions

SH-Y designed and performed experiments, analyzed data, helped write the paper, and helped coordinate the research. GB-G, RH-P and MV performed the animal experiments and obtained the corresponding histochemistry and immunohistochemistry data, and RH-P assisted in the design of the animal experiments and assisted in interpretation of the immunohistochemical data. MV assisted in experimental design. IGB assisted in performing the immunohistochemistry experiments and helped write the paper. DD-S and MR designed and conducted the human rhinitis studies. MR also provided immunoassay data and wrote portions of the paper. EK, DPT, and MZ, participated in the design of the human studies involving the naturalistic cat allergen exposure, the collection, analysis, and interpretation of the data from these studies and the review and editing of the manuscript. FJG provided materials and advice and reviewed the manuscript, BB assisted in experimental design and in writing the paper,

and CL assisted in interpretation of the immunohistochemical data and helped write portions of the paper. OH designed and interpreted the mouse experiments, wrote the paper, and coordinated the research.

Acknowledgments

Supported by a Collaborative Research Grant from the University of California Institute for Mexico and the United States (UC MEXUS-CONACYT) (S.H.Y and O.H), Mexico Federal Funds Grant HIM/2008/034 (S.H.-Y., G.B.-G.), National Institutes of Health grants R01 CA28868 (O.H.) and R01 HL080343 (E.K. and M.Z.), and the National Cancer Institute Intramural Research Program (F.J.G.), and the US Environmental Protection Agency (D.D.-S.). We thank Kelly Joiner and Stephen Hop for helping prepare the manuscript for submission and Xiaomeng Wu for technical assistance. We thank Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Doctoral scholarship degree grant (G.J. B-G) CONACYT-195431 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Conflict of interest

On behalf of all the authors, there are no conflicts of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article found at: www.wileyonlinelibrary.com

Figure S1. Knockdown of Arnt expression in Arnt^{fl/fl}:Mxl-Cre mice by treatment with pIpC.

Figure S2. EDHB induces HIF-1 α expression in lung tissue of mice.

Figure S3. Inhibition of hypoxia-inducible factor attenuates the stimulatory effect of EDHB on inflammation and mucus production.

Figure S4. H&G staining.

Figure S5. Enhanced HIF-2 α expression lung tissue from asthmatic patients after allergen challenge.

Data S1. Supplementary methods.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA et al. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**170**: 836–844.
- Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ* 2008;**15**:621–627.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002;**16**:1466–1471.
- Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Harnessing the response to tissue hypoxia: HIF-1 α and therapeutic angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002;**12**:362–367.

5. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell* 2007;**18**:4528–4542.
6. Lau KW, Tian YM, Raval RR, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- α in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br J Cancer* 2007;**96**:1284–1292.
7. Lee SY, Chung SM. Neovastat (AE-941) inhibits the airway inflammation via VEGF and HIF-2 α suppression. *Vascul Pharmacol* 2007;**47**:313–318.
8. Lee SY, Kwon S, Kim KH, Moon HS, Song JS, Park SH et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;**97**:794–799.
9. Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Garcia-Zepeda R, Hernandez-Pando R, Vega MI, Gonzalez-Bonilla C et al. 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clin Immunol* 2008;**129**:313–324.
10. Guo J, Lu W, Shimoda LA, Semenza GL, Georas SN. Enhanced interferon-gamma gene expression in T Cells and reduced ovalbumin-dependent lung eosinophilia in hypoxia-inducible factor-1- α -deficient mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;**149**:98–102.
11. Fajardo I, Svensson L, Bucht A, Pejler G. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**170**:477–484.
12. Tomita S, Sinal CJ, Yim SH, Gonzalez FJ. Conditional disruption of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene leads to loss of target gene induction by the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Endocrinol* 2000;**14**:1674–1681.
13. Takagi S, Tojo H, Tomita S, Sano S, Itami S, Hara M et al. Alteration of the 4-sphingene scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function. *J Clin Invest* 2003;**112**:1372–1382.
14. Yepez SH, Pando RH, Argumedo LS, Paredes MV, Cueto AH, Isibasi A et al. Therapeutic efficacy of an E coli strain carrying an ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OMPC in a murine model of allergic airway inflammation. *Vaccine* 2003;**21**:566–578.
15. Macy E, Kemeny M, Saxon A. Enhanced ELISA: how to measure less than 10 picograms of a specific protein (immunoglobulin) in less than 8 hours. *FASEB J* 1988;**2**:3003–3009.
16. Aitola MH, Pelto-Huikko MT. Expression of Arnt and Arnt2 mRNA in developing murine tissues. *J Histochem Cytochem* 2003;**51**:41–54.
17. Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H et al. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 1996;**16**:1706–1713.
18. Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev* 1998;**73**:117–123.
19. Kozak KR, Abbott B, Hankinson O. ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 1997;**191**:297–305.
20. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997;**386**:403–407.
21. Majamaa K, Gunzler V, Hanauske-Abel HM, Myllyla R, Kivirikko KI. Partial identity of the 2-oxoglutarate and ascorbate binding sites of prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 1986;**261**:7819–7823.
22. Wang J, Buss JL, Chen G, Ponka P, Pantopoulos K. The prolyl 4-hydroxylase inhibitor ethyl-3,4-dihydroxybenzoate generates effective iron deficiency in cultured cells. *FEBS Lett* 2002;**529**:309–312.
23. Hagen T, D'Amico G, Quintero M, Palacios-Callender M, Hollis V, Lam F et al. Inhibition of mitochondrial respiration by the anticancer agent 2-methoxyestradiol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**322**:923–929.
24. Mabweesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003;**3**:363–375.
25. Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol* 2002;**168**:3595–3600.
26. Lee KS, Kim SR, Park HS, Park SJ, Min KH, Lee KY et al. A novel thiol compound, N-acetylcysteine amide, attenuates allergic airway disease by regulating activation of NF- κ B and hypoxia-inducible factor-1 α . *Exp Mol Med* 2007;**39**:756–768.
27. Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 1992;**256**:1193–1195.
28. Probst MR, Fan CM, Tessier-Lavigne M, Hankinson O. Two murine homologs of the Drosophila single-minded protein that interact with the mouse aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein. *J Biol Chem* 1997;**272**:4451–4457.
29. Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H. Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:608–616.
30. Woods SL, Whitelaw ML. Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Cross-talk between basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim homology transcription factors. *J Biol Chem* 2002;**277**:10236–10243.
31. Lawrence BP, Denison MS, Novak H, Vorderstrasse BA, Harrer N, Neruda W et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood* 2008;**112**:1158–1165.
32. Saini Y, Kim KY, Lewandowski R, Bramble LA, Harkema JR, Lapres JJ. Role of hypoxia-inducible factor 1 α in modulating cobalt-induced lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;**298**:L139–L147.
33. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010;**29**:625–634.
34. Onnis B, Rapisarda A, Melillo G. Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:2780–2786.

What is hypoxia-inducible factor-1 doing in the allergic lung?

DOI:10.1111/j.1398-9995.2011.02593.x

Emerging evidence points to a role for hypoxia-inducible transcription factors in allergic airway inflammation and asthma. The hypoxia-inducible factor (HIF) family of heterodimeric transcription factors is now known to regulate the activation of different innate immune cell types, and asthma bears the 'footprints of HIF activation'. In this issue of the *Journal*, Huerta-Yepez and colleagues used genetic and pharmacologic approaches to explore the role of HIF-1 in mouse models of allergic airway inflammation. These studies support the idea that activation of HIF-1 is required for allergen sensitization and open the door to future therapeutic studies targeting the HIF pathway in allergic diseases.

The ability to sense and respond to changes in oxygen (O_2) concentration is a fundamental property of all nucleated cells. Exposure to hypoxia results in alterations in gene expression in multiple tissues mediated by the transcription factors of the hypoxia-inducible factor (HIF) family. HIFs are heterodimers comprised of different α subunits and the common HIF-1 β subunit (1). HIF-1 β (also known as aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator or ARNT) is a constitutively nuclear factor that dimerizes with its binding partners to form an active transcriptional complex. In contrast to HIF-1 β , the expression and activity of HIF-1 α is regulated by oxygen (O_2)-dependent hydroxylation. Under normoxic conditions, degradation of HIF-1 α is controlled by binding of the von Hippel-Lindau (VHL) protein, which is the recognition component of an E3 ubiquitin-protein ligase that targets HIF-1 α for proteasomal degradation (2). VHL binds to HIF-1 α that is hydroxylated on specific proline residues (Fig. 1) (3). The prolyl hydroxylases that are responsible for this modification use O_2 as a substrate under normoxic conditions. Under hypoxic conditions, however, HIF-1 α prolyl hydroxylation and degradation are attenuated, allowing HIF-1 α to translocate to the nucleus, interact with HIF-1 β , and bind to specific DNA recognition sequences. This oxygen-sensing mechanism provides a means by which changes in O_2 concentration can be rapidly transduced into changes in gene expression.

HIF-1 α was originally identified in a search for DNA-binding factors that induced erythropoietin gene expression in response to hypoxia (4) and is now known to regulate the expression of an array of genes involved in metabolism, cell survival, and angiogenesis (5). Activation of HIF-1 is strongly associated with cancer growth and metastasis, and HIF-1 pathway antagonists are under active development with some candidates already in clinical trials. More recent studies have suggested that HIFs play a wider role in immunity and inflammation, and distinct roles of HIF-1 α

and HIF-2 α are starting to emerge (6, 7) (discussed further below). Standard cell culture conditions (95% air and 5% CO_2) expose cells to 20% O_2 , which is markedly higher than the O_2 concentrations to which most immune cells are exposed *in vivo*. Tissue oxygen concentrations are even lower during inflammation as edema interferes with the diffusion of oxygen from the microvasculature and the infiltration of inflammatory cells results in increased O_2 consumption. The concentration of oxygen in secondary lymphoid organs is very low (8), suggesting that HIFs may be activated in lymphocytes during their normal circulation in the body. Although oxygen concentration can affect the acute activation of CD4⁺ lymphocytes (9), more research is needed to understand potential effects of varying oxygen concentrations on the differentiation and survival of immune cells.

In the paper published in this issue of the journal, Huerta-Yepez and colleagues (10) used several approaches to explore the role of HIF-1 in allergic airway inflammation. First, the authors used a conditional deletion strategy and found that HIF-1 β -deficient mice were protected from allergen-driven airway inflammation using a well-established model of sensitization to ovalbumin plus alum. Second, the authors complemented this genetic approach with pharmacologic pathway agonists and antagonists (EDHB and 2ME, respectively). Third, the authors showed that HIF-1 α and HIF-2 α expression are upregulated in cells and endobronchial biopsies from human subjects following allergen challenge. Taken together, these studies suggest that HIFs play a role in allergic airway inflammation.

The findings of Huerta-Yepez and colleagues are in keeping with the growing appreciation of the 'footprints of HIF activation' in asthma. For example, the expression of several HIF-1 target genes is increased in the airway in asthma including vascular endothelial growth factor (VEGF) (11, 12). In addition to promoting vascular remodeling and lymphangiogenesis, VEGF contributes to T-cell activation in response to inhaled allergens through distinct effects on dendritic and T cells (13, 14). A nonbiased proteomic analysis revealed that several hypoxia-inducible, HIF-1-regulated proteins are upregulated in the lung in a mouse model of asthma, including several enzymes involved in glycolysis (15). Other molecules associated with both Th2-driven asthma and hypoxia/HIF include Muc5AC, CXCR4, arginase, and some members of chitinase/Fizz family members (16).

Because HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-1 β are required for mouse development (17), homozygous-null germline knockout approaches cannot be used to study the role of these factors in

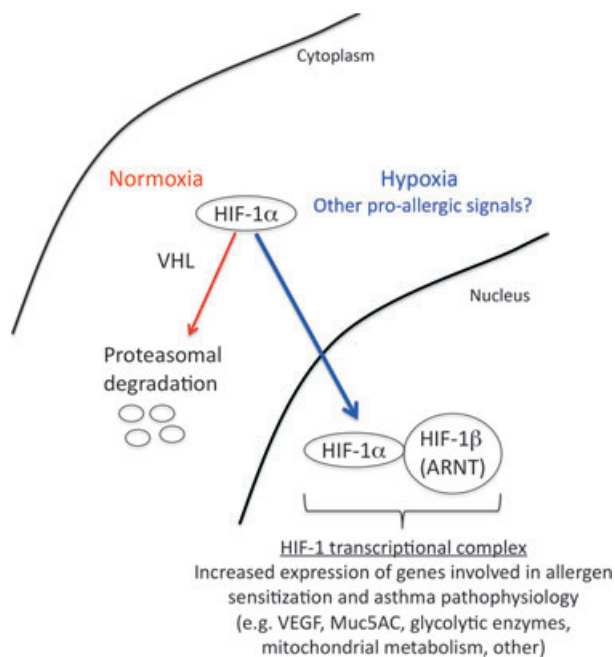


Figure 1. Under normoxic conditions (red arrow, left side), hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α is hydroxylated by proline hydroxylases (not shown), binds von Hippel-Lindau (VHL), and is targeted for proteasomal degradation. Under hypoxic conditions (blue arrow, right side), HIF-1 α translocates to the nucleus and interacts with HIF-1 β (ARNT) to form a transcriptionally active HIF-1 complex. HIF-1 α nuclear translocation might also be promoted by other 'nonhypoxic' pro-allergic signals. HIF-1 induces the expression of genes that contribute to asthma pathophysiology and might also lead to allergic airway inflammation by regulating cellular and mitochondrial metabolism.

adult mice. In a preliminary study, we reported that heterozygous-null mice partially deficient in HIF-1 α were protected from lung eosinophilia in a mouse model of allergic airway inflammation (18). Huerta-Yepez (10) used a conditional strategy to circumvent the embryonic lethality of HIF-1 β . Conditional deletion refers to the technique whereby a gene of interest can be deleted in a cell-type specific and/or inducible manner. A widely used strategy involves insertion of recognition sites for the Cre recombinase flanking a crucial part of the targeted gene of interest. These recognition sites (referred to as lox P sites) are bound by Cre, which excises the intervening genetic segments and recombines the free ends of DNA. Two general approaches can then be used to conditionally delete genes of interest. First, by breeding mice with targeted lox P sites (referred to as 'floxed') to separate transgenic strains in which Cre expression is regulated by tissue-specific promoters, deletion of the targeted gene can be restricted to specific cell types. Second, transgenic mice in which Cre expression can be induced pharmacologically can be used to study acute effects of gene deletion. Both of these conditional deletion strategies can circumvent embryonic lethality of genes that are required during development and provide insights into their roles in adult mice.

For example, Johnson and colleagues used lysozyme promoter-driven Cre to conditionally delete HIF-1 α in neutrophils and monocytes and observed profoundly reduced tissue injury in mouse models of cutaneous inflammation and arthritis (19). Interestingly, there was defective expression of HIF-1 target genes encoding VEGF and glycolytic enzymes in HIF-1 α -null macrophages studied ex vivo even under nonhypoxic conditions. Whereas deletion of HIF-1 α abrogated leukocyte influx, VEGF deletion impaired tissue edema without affecting inflammation. This paper established that HIF-1 α was essential for myeloid-driven inflammation in a VEGF-independent manner. A more recent study reported that HIF-2 α is preferentially induced by Th2 cytokines in myeloid cells and contributes to alternative macrophage activation (7).

Huerta-Yepez et al. used an inducible deletion strategy to study the role of HIF-1 β in allergic airway inflammation. This involved breeding floxed HIF-1 β mice (referred to as *Arnt*^{F/F} mice) with mice expressing Cre under the control of the Mx1 promoter. Mx1 is involved in innate anti-viral defenses and is highly inducible by type I interferons. By injecting mice with the double-stranded RNA polyI:C, which leads to robust type I IFN production, Huerta-Yepez et al. were able to induce widespread deletion of HIF-1 β in multiple cell types. Although immunohistochemical staining indicated prominent baseline expression of HIF-1 β in bronchiolar epithelial cells and blood vessels that was significantly reduced following polyI:C injection, it seems likely that HIF-1 β was deleted in other cell types as well. It is not possible to distinguish between the roles of HIF-1 β during allergen sensitization, allergen challenge, or both from the present study. The observation that HIF-1 β deletion-attenuated Ova-specific IgE production suggests that this factor is involved in alum-driven Th2 sensitization, which involves inflammasome-dependent dendritic cell activation. It will be interesting in future studies to dissect the role of HIF family members in pro-allergic innate immune responses in more detail.

The authors also showed that in both humans and mice, allergen challenge leads to marked upregulation of HIF-1 α and HIF-2 α expression in airway epithelial cells and cells retrieved from nasal and bronchoalveolar lavage. At least some of the HIF-1 α expression was localized to the nucleus, indicative of a transcriptionally active HIF-1 complex. As airway epithelial cells are continually exposed to ambient oxygen concentrations, how could the oxygen-sensing mechanism described above become activated in these cells? One possibility is that alternative 'nonhypoxic' modes of HIF-1 α activation operate in these cells, which is a ripe area for future research. It is worth noting that mouse models of chemical colitis have uncovered a protective role for HIF-1 in promoting intestinal epithelial barrier integrity (20), whereas HIF-1 plays a pathogenic role in promoting lung inflammation in a mouse model of trauma/hemorrhagic shock (21). It will be important in future studies to define the precise role of different HIF family members in the airway epithelium (e.g. with epithelial-specific conditional deletion), as well as in different inflammatory cell types (e.g. dendritic cells and lymphocyte subsets). It is quite possible that HIF-1 α may have protective effects in some contexts. For example,

chimeric mice with complete loss of HIF-1 α in lymphocytes manifest autoimmunity, suggesting a role for HIF-1 in down-regulating immune responses (22). Future studies investigating the potential association of HIFs with redox homeostasis and mitochondrial metabolism in the allergic airway may also prove worthwhile (23).

In summary, the identification of HIF-1 as a transcription factor involved in allergic airway inflammation is an important advance. Future studies of this oxygen-sensing pathway in different cells types and human subjects with asthma should enhance our understanding of asthma pathophysiology. The clinical development of HIF antagonists may also open new doors for therapeutic intervention.

Author contribution

TR and GLS edited and revised the manuscript, SNG wrote the first and final drafts.

Conflict of interest

None of the authors has a conflict of interest with the topic of the editorial.

T. Rangasamy

University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA

G. L. Semenza

Vascular Program, Institute for Cell Engineering and Departments of Pediatrics, Medicine, Oncology, Radiation Oncology, and Biological Chemistry, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

S. N. Georas

University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA

References

1. Semenza GL. Life with oxygen. *Science* 2007;**318**:62–64.
2. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;**399**:271–275.
3. Ivan M, Kondo K, Yang H et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;**292**:464–468.
4. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:5510–5514.
5. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Intersdiscip Rev Syst Biol Med* 2010;**2**: 336–361.
6. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;**9**:609–617.
7. Takeda N, O’Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C et al. Differential activation and antagonistic function of HIF-1 α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev* 2010;**24**:491–501.
8. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG et al. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J Immunol* 2001;**167**:6140–6149.
9. Roman J, Rangasamy T, Guo J, Sugunan S, Meednu N, Packirisamy G et al. T-cell activation under hypoxic conditions enhances IFN- γ secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;**42**:123–128.
10. Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Hernandez-Pando R, Vega MI, Chi L et al. Hypoxia inducible factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy* 2011;in press.
11. Lee YC, Lee HK. Vascular endothelial growth factor in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**107**:1106.
12. Detoraki A, Granata F, Staibano S, Rossi FW, Marone G, Genovese A. Angiogenesis and lymphangiogenesis in bronchial asthma. *Allergy* 2010;**65**:946–958.
13. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH₂-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 2004;**10**:1095–1103.
14. Kim YS, Choi SJ, Tae YM, Lee BJ, Jeon SG, Oh SY et al. Distinct roles of vascular endothelial growth factor receptor-1- and receptor-2-mediated signaling in T cell priming and Th17 polarization to lipopolysaccharide-containing allergens in the lung. *J Immunol* 2010;**185**:5648–5655.
15. Fajardo I, Svensson L, Bucht A, Pejler G. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**170**:477–484.
16. Hoshino M, Fujita Y, Saji J, Inoue T, Nakagawa T, Miyazawa T. Effect of supplant tosylate on goblet cell metaplasia in patients with asthma. *Allergy* 2005;**60**:1394–1400.
17. McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol* 2010;**72**:625–645.
18. Guo J, Lu W, Shimoda LA, Semenza GL, Georas SN. Enhanced interferon- γ gene expression in T Cells and reduced ovalbumin-dependent lung eosinophilia in hypoxia-inducible factor-1 α -deficient mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;**149**: 98–102.
19. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;**112**:645–657.
20. Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;**7**:281–287.
21. Feinman R, Deitch EA, Watkins AC, Abungu B, Colorado I, Kannan KB et al. HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;**299**:G833–G843.
22. Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P et al. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 α -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:2170–2174.
23. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2010;in press.



available at www.sciencedirect.com



www.elsevier.com/locate/yclim



2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model

S. Huerta-Yepetz^{a,e,f}, G.J. Baay-Guzman^{a,b,d,e}, R. Garcia-Zepeda^c,
R. Hernandez-Pando^d, M.I. Vega^{e,f}, C. Gonzalez-Bonilla^e, B. Bonavida^{f,*}

^a Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México, Federico Gómez, Mexico City, Mexico

^b Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^c Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico

^d Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

^e Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, CMN "La Raza" IMSS, Mexico City, Mexico

^f Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, Jonsson Comprehensive Cancer Center, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA, USA

Received 13 June 2008; accepted with revision 12 July 2008

Available online 14 September 2008

KEYWORDS

2-ME;
Airway inflammation;
Asthma;
HIF-1 α ;
VEGF

Abstract Patients with asthma experience airway structural changes, termed airway remodeling, in response to persistent inflammation. 2-Methoxyestradiol (2-ME) is an anti-angiogenic agent and downregulates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and inhibits HIF-1 α -induced transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. We hypothesized that 2-ME may interfere with the development of the clinical manifestations of asthma. We used a chronic murine model of allergic airway inflammation with subepithelial fibrosis in BALB/c mice. Mice were sensitized with ovalbumin (OVA) that was administered intraperitoneally at days 0–5 and challenged intratracheally (IT) with OVA on days 12–22. The mice received 2-ME IT at days 24, 26 and 28 and sacrificed at day 32. The sensitized/challenged mice developed an extensive cell inflammatory response of the airways. 2-ME administration significantly reduced the cellular infiltrate in the perivascular and peribronchial lung tissues, reduced goblet mucous production, reduced airway fibrosis and thickness of smooth muscle and blood vessels, and reduced eosinophil infiltration. Mice treated with 2-ME had a significant decrease of HIF-1 and VEGF expression in the perivascular, peribronchial, and interstitium of lung tissues. Collagen IV expression was also significantly reduced in 2-ME treated mice compared to untreated mice. The 2-ME treatment was associated with a significant decrease of OVA-specific IgE antibodies. These findings provide the first indication that IT administration of 2-ME is effective in preventing and

* Corresponding author.

E-mail address: bbonavida@mednet.ucla.edu (B. Bonavida).

reversing antigen-induced airway remodeling in the OVA allergen inflammatory murine model. The potential role of 2-ME in patients is discussed.
© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The pathophysiology of asthma involves a number of cell types and mediators. Airway structural changes that occur in patients with asthma in response to persistent inflammation are termed airway remodeling and include airway wall thickening, subepithelial fibrosis, and hyperplasia of mucous glands, myofibroblasts, and smooth muscle vasculature [1]. Chronic airway inflammation plays a key role in asthma. The relationship between inflammation and structural changes is speculative. It is believed that remodeling is a direct result of a switch from acute to chronic inflammation followed by healing [2]. For this reason, anti-inflammatory agents will not necessarily prevent or attenuate the process of remodeling [3]. All current guidelines focus on the treatment of inflammation in asthma although there are differences between the processes of airway wall remodeling for which there is no defined treatment validated [2].

Long-acting β agonists produce bronchial dilation and improve asthma symptoms, effects that are maintained with regular use over time. However, immunotherapy with β agonists has been consistently shown to be inferior to the use of inhaled corticosteroids which can reduce the underlying inflammation associated with asthma. For these reasons, inhaled corticosteroids are recommended as first line maintenance treatment for asthma [4].

2-ME is a naturally occurring derivative of 17β -estradiol and was shown to be a well tolerated small molecule that possesses anti-tumor and anti-angiogenic activities [5]. Studies by Mabeesh et al. [6] reported that 2-ME destabilizes microtubules and blocks HIF1- α nuclear accumulation and HIF1- α activity by an oxygen- and proteasome-independent pathways. Evidence was provided for a link between the microtubule cytoskeleton and HIF regulation. Destruction of the normal function of the microtubule cytoskeleton is required for HIF1- α -induced inhibition by microtubule-targeted drugs such as Taxol and Vincristine.

Several reports have been published suggesting the use of different strategies for the suppression of antigen-induced asthma in mice. For instance, the oral administration of CpG-ODNs was effective in preventing and reversing antigen-induced eosinophilia airway inflammation [7]. Also, low doses of leukotriene receptor antagonist were an effective therapy in the airway remodeling in the ovalbumin mouse model [8].

Angiogenesis supports the development of many diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, psoriasis, macular degeneration, and diabetic retinopathy [9–11]. VEGF is a major mediator of angiogenesis, whose expression is induced under hypoxic conditions [9, 12]. The induction of VEGF under hypoxic conditions is a multistage process in which the alpha subunit of HIF (HIF-1 α) plays a key role [13]. HIF-1 α is rapidly degraded by the proteasome under normoxic conditions. Following hypoxic stabilization, HIF-1 α is translocated into the nucleus where it heterodimerizes with HIF-1 β and activates the transcription of more than forty genes

important for adaptation and survival under hypoxia [14]. Hence, the anti-angiogenic activity of 2-ME may regulate the inflammatory process in asthma and reduce cell infiltration. Therefore, we hypothesized that the local intratracheal (IT) administration of 2-ME may inhibit airway inflammation and remodeling. The objective of this study was to test this hypothesis and determine the effect of IT 2-ME administration in the development of airway remodeling using a chronic murine model of allergic airway inflammation with subsequent fibrosis. The findings support our hypothesis and demonstrate that 2-ME significantly inhibited antigen-induced inflammation and airway remodeling in the OVA allergen inflammatory murine model.

Materials and methods

Animals

Balb/c mice (males) were obtained and maintained in a pathogen-free environment in the facilities of the Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutricion (INCMN) (Mexico City). The mice were housed in a temperature-controlled room with 12-h dark/light cycles, and allowed food and water ad libitum. All the experiments described below were performed in accordance with the INCMN regulations.

Experimental design

The protocol for sensitization and intratracheal challenge has previously been described by us in details [15] and illustrated in Fig. 1. Briefly, 6 to 8 week-old Balb/c male mice were sensitized on days 0 and 5 by intraperitoneal injection of 100 μ g chicken egg ovalbumin (OVA, grade V, Sigma, USA) emulsified in 1 mg of aluminum hydroxide (alum) (Pierce Chemical, USA) in a total volume of 100 μ L. Seven days after the last sensitization, mice were exposed twice to intratracheal (IT) administration of 0.75% OVA. 2-ME was purchased commercially from Sigma Aldrich (St Louis, MO). The dose of 2-ME chosen for the *in vivo* experiment was derived from a report using 100 mg/kg in a cancer murine model via the intraperitoneal route [3, 16]. We have chosen a lesser concentration of 30 mg/kg because 2-ME was administered IT. 6 to 8 week-old Balb/c male mice ($n=18$)

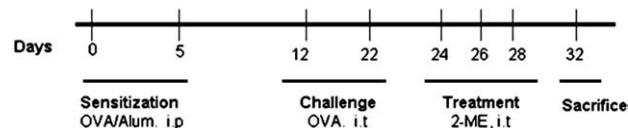


Figure 1 Murine models of airway inflammation and treatment with 2-ME. The effects of IT administered 2-ME and/or OVA were examined in the context of immunotherapy of established atopic lung inflammation.

were divided into three groups. Group one received ovalbumin (OVA) ($n=6$), group two received OVA and then was treated with 2-ME (OVA/2-ME) ($n=6$) and group three ($n=6$) was control and received saline solution (SS). Groups one and two were immunized by intraperitoneal (i.p.) injection of 100 μg (100 μL) of OVA complexed with 1 μg alum on days 0 and 5 and then the mice received an intratracheal (IT) dose of 100 μL of 0.75% of OVA in SS on days 12 and 22. The control group three ($n=6$) received saline solution (SS) with alum i.p. on days 0 and 5 and SS without alum IT on days 12 and 22. A concentrated stock solution of 2-ME was prepared in DMSO and then diluted in SS to prepare a solution of 2-ME (30 mg/kg) that was administered IT to group two beginning on day 24 of the protocol and continuing until day 28 every other day. The mice received 3 administrations every other day, (D 24, D 26 and D 28) of 100 μL (30 mg/kg) of 2-ME IT. Positive control consisted of mice sensitized and OVA-exposed. The non-immunized and OVA-exposed mice were similar to group 1 mice as they did not exhibit detectable airway inflammation. The positive control OVA mice received SS containing the same concentration of DMSO as the one used for treatment with 2-ME. All animals were sacrificed 96 h after the last IT treatment.

Lung histology and morphometric analysis

At 96 h after the last challenge, lungs were removed from the mice after sacrifice. Before the lungs were removed, they were filled intratracheally with a fixative (4% formalin) using a ligature around the trachea. Lung tissues were fixed with 10% (v/v) neutral buffered formalin. The specimens were dehydrated and embedded in paraffin. For histological examination, 4- μm sections of fixed embedded tissues were cut on a Leica model 2165 rotary microtome (Leica, Nussloch, Germany), placed on glass slides, deparaffinized, and stained sequentially with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the inflammatory cell infiltrates. The area (μm^2) was calculated from stained slides, selecting venules with diameter of 100–200 μm and bronchi with 150–300 μm of diameter. Four blood vessels or bronchi from four to six lung sections were analyzed for each experimental group, and results were expressed as average and standard deviations of infiltrated area (μm^2). Mucus production was assessed from lung sections stained with periodic acid Schiff (PAS). The PAS-positive material was measured in μm in bronchi with 150–300 μm . Five bronchi from four to six lung sections were analyzed for each experimental group and the results were expressed as average and standard deviations of PAS-positive area (μm). Mason's trichrome (MT) was used to determine collagen deposition in the lung. The histological analyses were performed by observers who were not aware of the groups of mice from which the samples originated.

Bronchoalveolar lavages (BAL)

After the mice were sacrificed by exsanguination, the tracheas were exposed and intubated with a polyethylene catheter. The BAL fluid was collected by washing with two separated aliquots of 1 ml of SS with 2% of FBS through the trachea. The cells from the first wash were harvested by centrifugation (500 \times g for 10 min at 4 °C), counted in a

hemacytometer and adjusted to 1×10^5 cells/ml. Differential counts from four to six H/E stained cytospin preparations for each experimental group were determined by microscopy. Cells were counted by standard procedures at 40 \times magnification. Results are presented as cells/ml averages from all the slides per group (200 cells/slide).

Immunocytochemistry

For immunohistochemistry of VEGF or HIF-1 α and type IV collagen, the deparaffinized 4- μm sections were incubated sequentially in accordance with the instructions of the LSAB kit from DAKO corporation (Carpinteria, CA, USA). In brief, antigen retrieval was performed by immersing the slides in 0.01% sodium citrate pH 6.0 incubated for 5 min in boiling water. The endogenous peroxidase activity was inhibited by immersing the slides in 3% H_2O_2 -methanol for 25 min, and the background non-specific binding was reduced by incubating with 1% BSA in PBS for 60 min. The slides were incubated overnight at room temperature with antibodies against HIF-1 α (1:250) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), VEGF (1:750) (Santa Cruz) or type IV collagen (1:500) (Santa Cruz). Finally, the slides were washed five times in PBS 0.1 M pH 7.4 for 8 min. In order to reduce the variability, all samples from each group were processed at the same time in a single experiment using a single batch of antibody diluted in PBS-normal swine serum. After washing, the slides were incubated with a biotinylated secondary antibody container in the LSAB kit from DAKO corporation for 30 min at r.t. followed by an incubation with a streptavidin-HRP conjugate container in the LSAB kit for 30 min at r.t. and then with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (liquid DAB, DAKO corporation) for 1 to 5 min in the dark. The reaction was arrested with distilled water and the slides were counterstained with hematoxylin. Thereafter, the tissues were washed in tap water for 5 min, dehydrated through ethanol baths (70, 90 and 100%) in xylene and mounted with E-2 Mount medium (Shandon lab, Pittsburgh, PA, USA). Finally, the slides were analyzed under light microscopy (Olympus BX-40). The analyses were performed by blinded observers.

Determination of serum OVA-specific IgE

Serum levels of specific anti-OVA IgE were determined by ELISA. The ELISA kit was purchased from MD Bioscience, St. Paul, MN (Catalog #OVA IgE 96). The analysis was performed according to the manufacturer's instructions. The specificity of the ELISA was corroborated by demonstrating that serum from naïve non-immunized mice did not reveal any detectable binding to OVA. Color was developed by adding OPD in substrate buffer (Sanofi Diagnostic Pasteur). The reaction was arrested with 50 μL H_2SO_4 and the OD were determined at 495 nm.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M. Statistical comparisons were performed using one-way analysis of variance followed by the Fisher's test. Significant differences between groups were determined using the unpaired Student's test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Intratracheal administration of 2-ME reduces OVA-induced atopic response

Three groups of mice ($n=6$ /group) were examined and were treated with OVA alone (group one), OVA+ 2-ME (group two) and with saline (SS) (group three) as described in Materials and methods. The mice were rendered allergic to OVA with two i.p. injections of OVA-alum suspension at days 0 and 5 and 2 IT challenges at days 12 and 22. Two days after sensitization group two mice were treated three times with 2-ME administered by the intratracheal route every other day. The intensity of allergic inflammation reaction was evaluated on day 32 at sacrifice. The schematic diagram of the above treatment schedules is also illustrated in Fig. 1.

The tissue cellular infiltration was assessed based on H&E staining of the lung sections. Fig. 2 shows a representative lung section derived from each experimental group. The OVA challenge in the sensitized mice induced dramatic perivas-

cular (Fig. 2A, d) and peribronchial (Fig. 2A, c) infiltration of various types of cells as compared with the SS control mice (Fig. 2A, a and b). The 2-ME treatment markedly reduced the infiltration of inflammatory cells in both the perivascular (Fig. 2A, f) and peribronchial areas (Fig. 2A, e). The quantitative pulmonary inflammation was estimated by morphological analysis in the perivascular and peribronchial areas and was expressed in μm^2 of infiltrate. Allergic mice treated with 2-ME (OVA/2-ME) showed significant reduction of perivascular cell infiltrate (Fig. 2B, upper panel) in comparison to untreated allergic mice (OVA), $x=18 \mu\text{m}^2$ versus $38 \mu\text{m}^2$ ($p<0.05$). Similar results were obtained in the peribronchial areas (Fig. 2B, bottom panel). Mice sensitized and OVA-exposed (positive control) behaved similarly to group 1 mice (data not shown). Mice non-immunized and OVA-exposed did not show any airway inflammation (data not shown).

Mucus production that occurs as a result of allergen exposure is an important characteristic of the pathogenesis of asthma, and this production is believed to be highly associated with Th2-type cytokines namely IL-5 and IL-13 [17]. We have reported in our airway inflammation model the

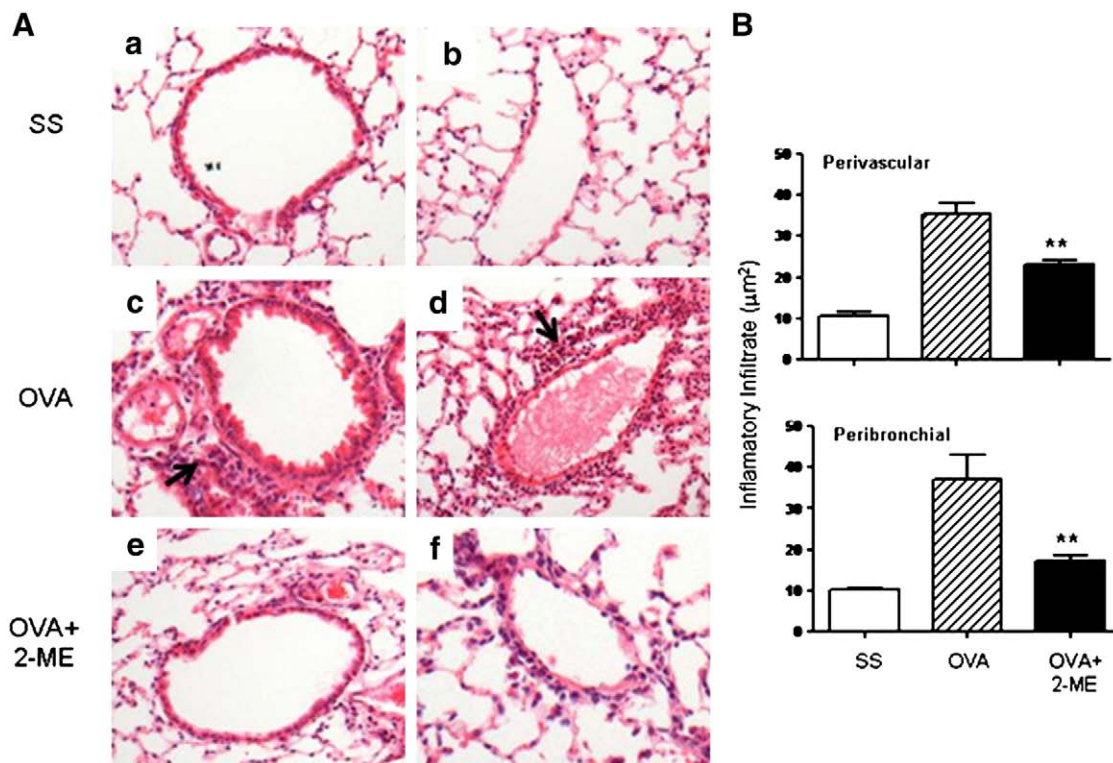


Figure 2 2-ME administered intratracheally reduces airway inflammation in OVA-treated mice. (A) Histology and morphometric analyses of lungs. Representative whole mounts of lung tissues were obtained from OVA-sensitized/challenged mice, in the absence (c and d) or presence (e and f) of 2-ME administered IT at a dose of 30 mg/kg, or saline-treated mice (a, b). The tissues (b, d, f) blood vessels and a, c, e bronchia) were stained with hematoxylin and examined by light microscopy. OVA-treated mice (b and c) exhibit a marked dense cellular infiltrate of eosinophils and other inflammatory cells in the interstitium (arrow) of the lungs. In contrast with OVA treatment alone, OVA-sensitized/challenged mice and administered 2-ME (e and f) have a marked reduction in the cellular infiltration around blood vessels and bronchi. The control mice have blood vessels and bronchi of normal appearance and inflammatory cell infiltration is absent in the lung interstitium (a and b). (B) Lung inflammatory infiltrate in allergic mice to OVA. Lung sections from five to eight mice from each experimental group were stained with H/E and analyzed under light microscopy (40 \times), and the inflammatory infiltrate was measured in venules and middle size veins with 100–200 μm of diameter, and bronchi with 150–300 μm diameter using an image analyzer (five venules or bronchi from five to eight lung sections were analyzed for each experimental group). Results are expressed as averages and standard deviations of infiltrate area. (Upper) Perivascular infiltrate; (lower) peribronchial infiltrate. ** $p<0.05$ presence of 2-ME vs. absence of 2-ME (ANOVA).

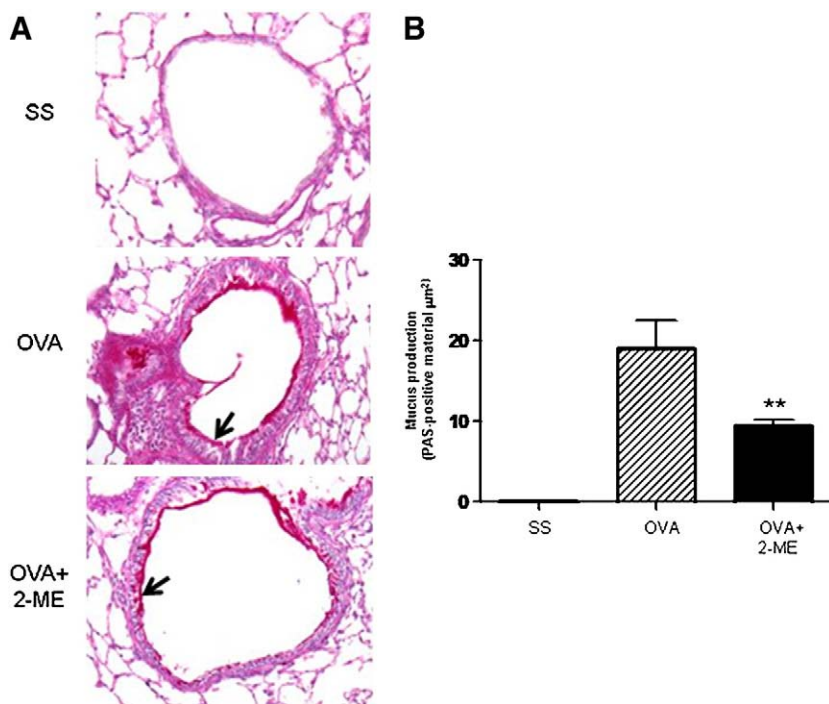


Figure 3 2-ME reduced mucus production in lungs from allergic mice to OVA. (A) Representative microphotography of periodic acid Schiff (PAS) staining observed at magnification of 40 \times . Airway goblet cell hyperplasia (arrows) was observed in the OVA-sensitized/challenged mice (middle panel). There were no goblet cell hyperplasia and mucus occlusion in the SS control mice (top panel). 2-ME treatment decreased goblet cell hyperplasia and mucus occlusion in the lung interstitium (arrow) (bottom panel). (B) Mucus production by histological analysis of lung sections from five to eight mice from each experimental group that were stained with PAS and analyzed under light microscopy (40 \times). The PAS-positive material was measured in 200 μm^2 squares (40,000 μm^2) using an image analyzer (five squares from five to eight lung sections were analyzed for each experimental group). Results are expressed as averages and standard deviations of PAS-positive area (μm^2). ** $p < 0.05$ presence of 2-ME vs. absence of 2-ME (ANOVA).

involvement of the Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13), both at the level of transcription and expression [15]. Lungs from the different experimental groups were stained with PAS to detect mucus-secreting material. Fig. 3A shows representative lung sections stained with PAS from the different experimental groups. Compared to control, the OVA group developed an intense mucus production, affecting the peribronchial regions with marked goblet cell hyperplasia and hypertrophy (Fig. 3A, middle panel) compared to control mice (Fig. 3A, top panel). The allergic mice treated with 2-ME (Fig. 3A, bottom panel) presented significant decrease of mucus production. Moreover, morphometric analysis in the epithelial portion of the airway wall also revealed that chronic allergen exposure increased the amount of mucin present in comparison with the negative control group (SS), which was significantly ($p < 0.001$) decreased following treatment with 2-ME (Fig. 3B).

The remodeling airway tissue and fibrosis are important processes that result from allergen exposure and are important characteristics of the pathogenesis of asthma. We, therefore, determined the effect of 2-ME treatment on airway smooth muscle thickness in our experimental murine model of allergic airway inflammation. Fig. 4A shows representative lung sections from the different experimental groups stained with Mason's trichrome. In OVA-sensitized and challenged mice, dense collagen deposition/fibrosis was seen throughout the lung interstitium surrounding the airways and blood vessels (Fig. 4A, middle panel) as compared with the control SS group (Fig. 4A, top panel). Treatment with 2-ME

markedly reduced the dense collagen deposit/fibrosis (Fig. 4, bottom panel). To measure more quantitatively the smooth muscle layer thickness of the surrounding airways we used the Imagine-pro Plus System. Fig. 4B (upper panel) shows that the thickness of the smooth muscle layer surrounding the airways was markedly increased in the OVA group ($11.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in vessels and $5.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$ in bronchials) as compared with the negative control group (SS) ($0.15 \mu\text{m} \pm 0.012$ in vessels and 0.13 ± 0.009 in bronchials). Treatment with 2-ME induced significant reduction in the thickness of smooth muscle content in the airway ($4.8 \mu\text{m} \pm 1.3$ in vessels and $2.65 \mu\text{m} \pm 0.5$ in bronchials) ($p = 0.0001$). To analyze collagen deposition in a more quantitative manner, subepithelial collagen within the bronchial was measured using the Image-pro Plus System and is presented in μm . As shown in Fig. 4B (bottom panel) the mean of the area of airway fibrosis in OVA mice was significantly increased (with $9.9 \pm 0.9 \mu\text{m}$ in vessels and $7.6 \pm 0.78 \mu\text{m}$ in bronchials) as compared to the SS group ($0.2 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in vessels and $0.15 \pm 0.002 \mu\text{m}$ in bronchials). Administration of 2-ME resulted in a significant reduction in the collagen deposition in the lung including the perivascular and peribronchial areas. The means of the areas of airways collagen in mice treated with 2-ME were $5.0 \mu\text{m} \pm 1.3$ in vessels and $2.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in bronchi which were significantly different from the OVA group ($p < 0.0001$).

Altogether, these results demonstrate that treatment with 2-ME reduce significantly the inflammation, mucus production and collagen deposits/fibrosis in the allergic mice.

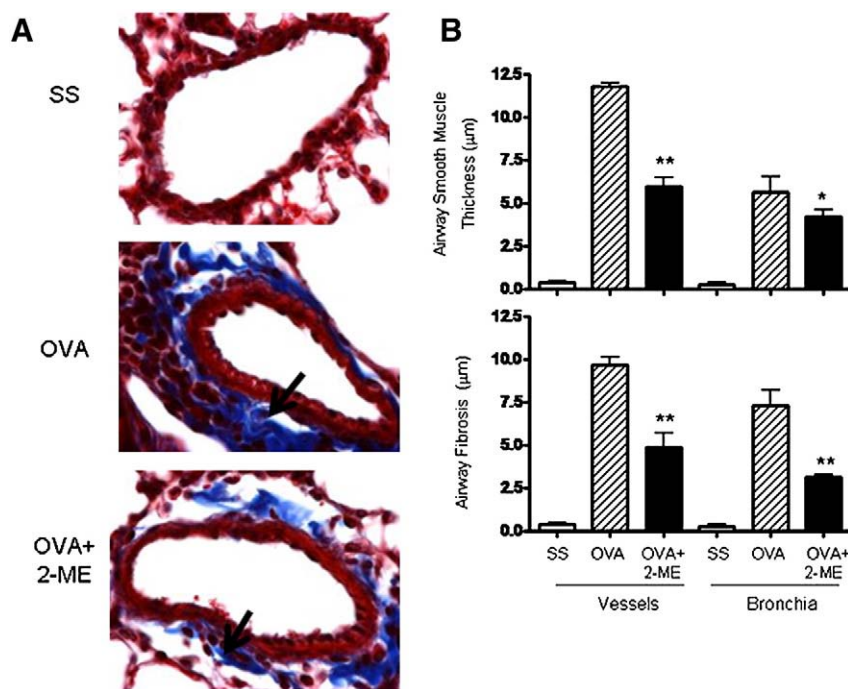


Figure 4 2-ME reduced collagen deposit in lungs from allergic mice to OVA. (A) Representative microphotography of Masson's Trichrome staining (40 \times). Extensive collagen deposit of airways (arrows) was observed in the OVA-sensitized/challenged mice (middle panel). There was no deposit of collagen in the SS control mice (top panel). 2-ME treatment decreased collagen deposit in the lung interstitium around the airways (arrow) (bottom panel). (B) Collagen deposit histological analysis of lung sections derived from five to eight mice from each experimental group. They were Masson's Trichrome stained and analyzed under light microscopy (40 \times). The collagen was measured in 200 μm squares (40,000 μm^2) using an image analyzer (five squares from five to eight lung sections were analyzed for each experimental group). Results are expressed as averages and standard deviations of blue Masson's Trichrome-positive area (μm^2). * $p < 0.05$ presence of 2-ME vs. absence of 2-ME (ANOVA).

2-ME reduces BAL eosinophils

Cell infiltration was measured in BAL from allergic mice and differential cell counts were determined by microscopy in H/E stained cytospin preparations. The differential cell counts revealed a significantly increase in the number of cells predominantly lymphocytes, neutrophils and eosinophils in the OVA-exposed group ($15.5 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10^3$ eosinophils/ml; $9.8 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^3$ lymphocytes/ml and $3.1 \times 10^3 \pm 0.7 \times 10^3$ neutrophils/ml), compared with the SS group ($0.1 \times 10^3 \pm 0.03 \times 10^3$ eosinophils; $0.15 \times 10^3 \pm 0.02 \times 10^3$ lymphocytes and $0.8 \times 10^3 \pm 0.05 \times 10^3$ neutrophils) (Fig. 5). The OVA-exposed group treated with 2-ME showed significant reduction of BAL lymphocytes and eosinophils numbers with $11.2 \pm 2.4 \times 10^3$ eosinophils and $5.1 \pm 1.6 \times 10^3$ lymphocytes/ml in the OVA/2-ME group versus ($15.5 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10^3$ eosinophils/ml and $9.8 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^3$ lymphocytes/ml in the OVA group ($p < 0.05$).

2-ME reduces the expression of HIF-1 α , VEGF and collagen IV in allergic mice

It has been shown that 2-ME blocks the activity of HIF-1 α via disruption of microtubules [18]. In order to delineate if the administration of 2-ME also affects HIF-1 α expression in the allergic mice, we performed immunohistochemistry to measure the expression protein in lung tissues. Very low immunoreactive HIF-1 α localized in epithelial layers around the vessels and bronchioles in the SS group (Fig. 6A, upper panel). In contrast,

the OVA-exposed mice showed a very significant increase of HIF-1 α expression in both the perivascular and the peribronchial areas, and that increase was markedly observed in the interstitium areas (Fig. 6A, middle panel). Interestingly, IT

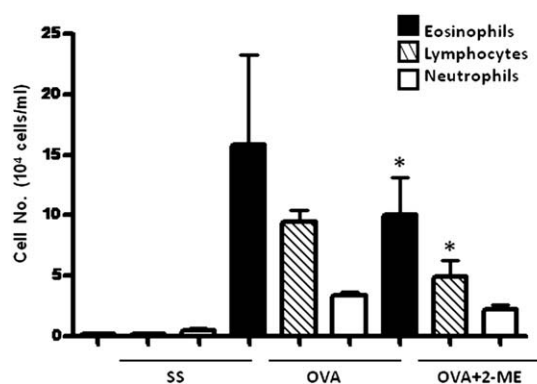


Figure 5 2-ME treatment reduces BAL eosinophils in mice allergic to OVA. Total leukocytes were counted and differential cell analysis per milliliter was determined in BAL from mice allergic to OVA, both treated and untreated with 2-ME. Cytospin BAL preparations were stained with H/E and the differential count of 200 cells per five to eight mice were analyzed for each experimental group (100 \times). Results are presented as the average and standard deviations (cells/ml). * $p < 0.05$ presence of 2-ME vs. absence of 2-ME (ANOVA; Kruskal–Wallis).

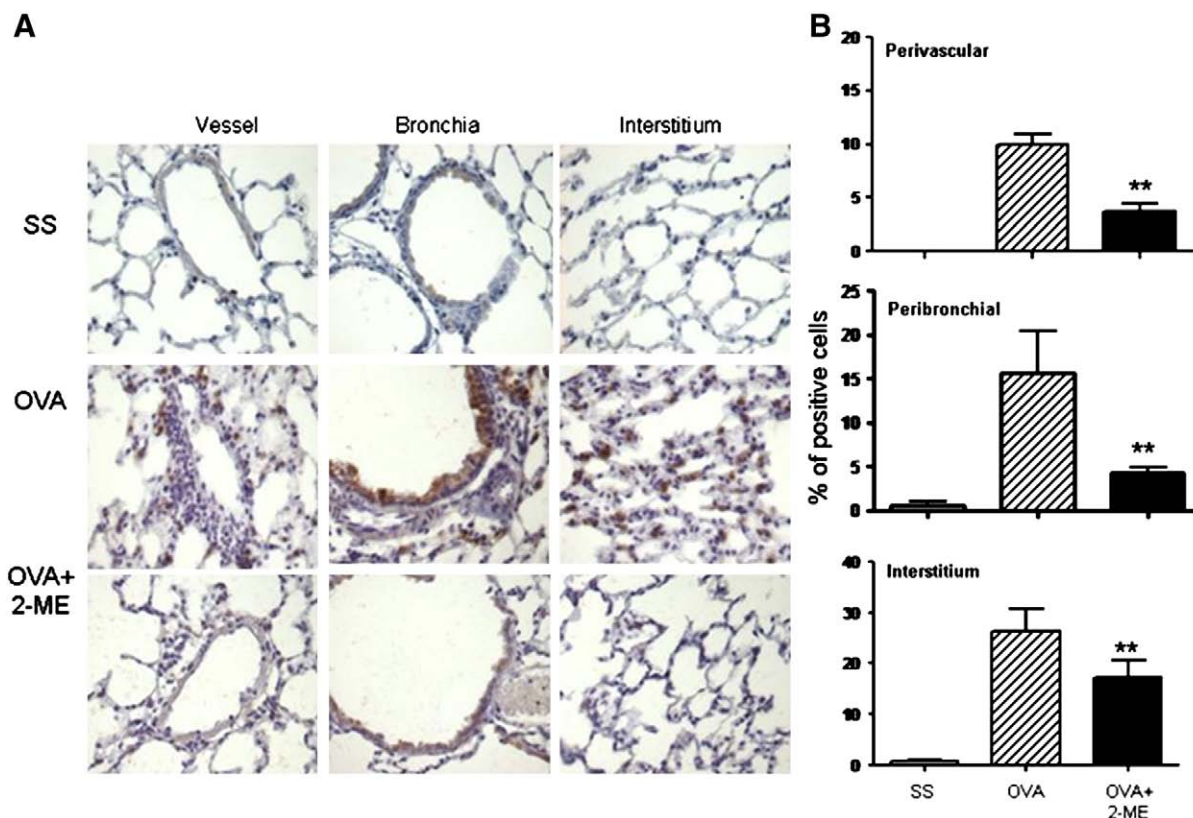


Figure 6 2-ME treatment reduces the HIF-1 α expression in lung tissue. (A) Immunohistochemical comparison of HIF-1 α expression in lung tissue obtained from OVA-sensitized/challenged mice, in the absence or presence of 2ME2 administered IT at a dose of 30 mg/kg, and saline-treated mice. Compared with OVA treatment alone (middle panel); OVA-sensitized/challenged mice and administered 2-ME have a marked reduction in the cellular infiltration HIF-1 α positive numbers cells (perivascular, peribronchial and interstitium) (bottom panel); the control saline-treated mice have very few positive cells (top panel). (B) Percentage of HIF-1 α immunostained cells in several lung compartments, in the absence or presence of 2-ME treatment. Lung sections from five to eight mice from each experimental group were immunostained with anti-HIF-1 α antibodies and analyzed under light microscopy (40 \times). The percentage positive cells were measured in surrounded cellular infiltrate in venules, bronchi and interstitium using an image analyzer (five venules or five bronchi from five to eight lung sections were analyzed for each experimental group). Results are expressed as averages and standard deviations of positive cells. (Upper) Perivascular infiltrate, (middle) peribronchial infiltrate, (lower) interstitium. ** $p < 0.05$ presence of 2-ME vs. absence of 2-ME (ANOVA).

administration of 2-ME dramatically decreased the HIF-1 α expression in allergen-induced asthmatic lungs (Fig. 6A, bottom panel). To analyze the HIF-1 expression in a more quantitative manner, we counted the percent of HIF-1 positive cells in several lung areas. As shown in Fig. 6B, the mean percentage of HIF-1 α positive cells in the OVA group mice significantly increased with $10 \pm 1.1\%$ (perivascular area), $15.2 \pm 5.2\%$ (peribronchial) and $26.5 \pm 4.1\%$ (interstitium), compared with the SS group that shows almost no expression in the different lung areas. In contrast, treatment with 2-ME resulted in a significant reduction in the HIF-1 expression as compared with the OVA group in the perivascular area ($3.9 \pm 0.6\%$ versus 10 ± 1.1), peribronchial area ($5 \pm 0.1\%$), and in the interstitium ($7.2 \pm 2.2\%$) (Fig. 6B).

Recent reports demonstrated that HIF-1 is implicated in the transcriptional regulation of VEGF and it has been shown that VEGF participates in the airway remodeling process that results following allergen exposure [6]. To further understand the role of HIF-1 in this process after allergen exposure, we next determined the effect of 2-ME treatment on VEGF expression

in our experimental murine model of allergic airway inflammation by immunohistochemistry. Low immunoreactive VEGF localized in epithelial layers around the vessels and bronchioles in the SS group (Fig. 7A, upper panels). In contrast, the OVA-exposed mice showed a very significant increase in VEGF expression in both the perivascular and also in the peribronchial areas, and these increases were very significant in the interstitium areas (Fig. 7A, middle panels). The 2-ME treatment dramatically decreased VEGF expression in the allergen-induced asthmatic lungs (Fig. 7A, bottom panels). To quantify the VEGF expression, we counted the percent of VEGF positive cells in several lung areas. Fig. 7B shows that the mean percentage of VEGF positive cells in the OVA group mice significantly increased with $10.5 \pm 1.3\%$ (perivascular area), $7.5 \pm 1.2\%$ (peribronchial) and $38.7 \pm 4.5\%$ (interstitium), compared with the SS group with $3.3 \pm 0.8\%$ (perivascular area), $1.5 \pm 0.2\%$ (peribronchial) and $14.7 \pm 2.5\%$ (interstitium). In contrast, treatment with 2-ME resulted in a significant reduction in VEGF expression as compared with the OVA group in the perivascular area ($3.2 \pm 0.5\%$ versus $10.5 \pm 1.3\%$), peribronchial

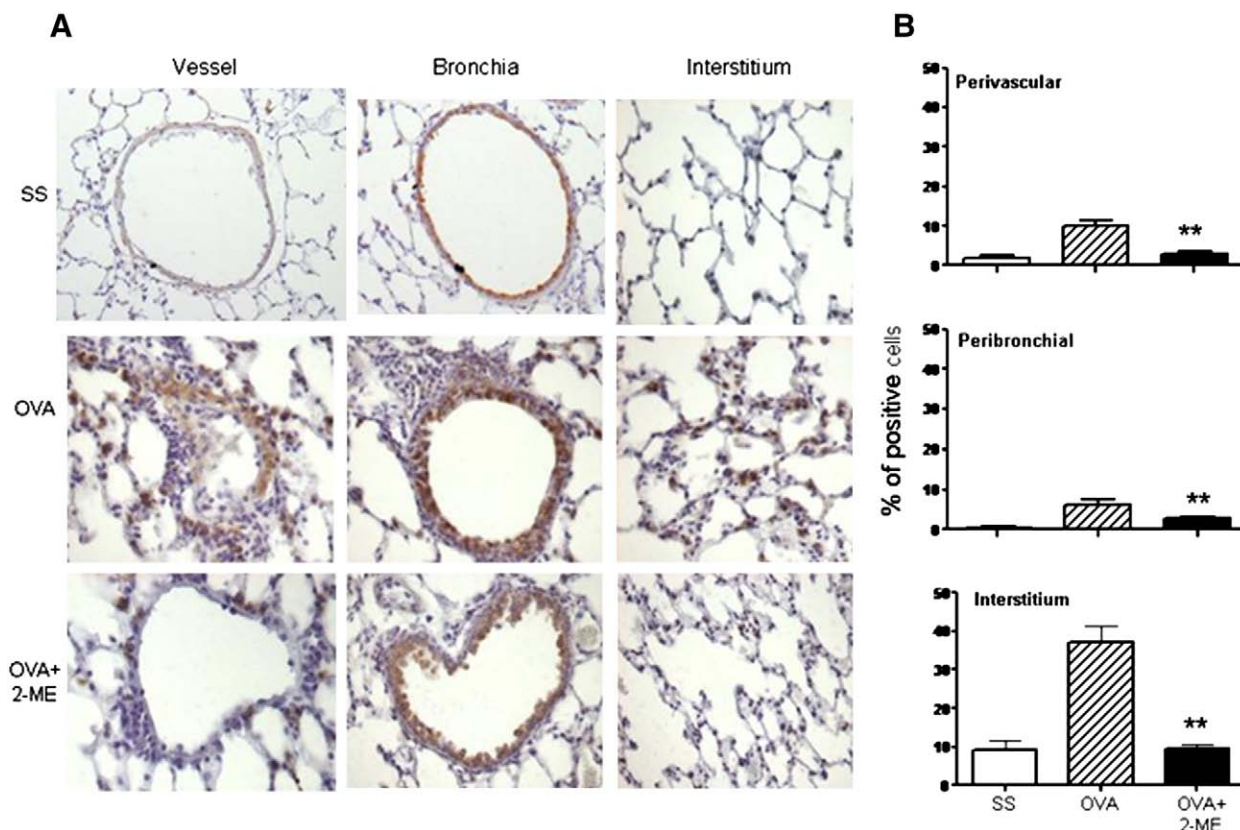


Figure 7 2-ME treatment reduces VEGF expression in lung tissue. (A) Immunohistochemical comparison of VEGF expression in lung tissue obtained from OVA-sensitized/challenged mice, in the absence or presence of 2-ME administered IT at a dose of 30 mg/kg, and saline-treated mice. Compared with OVA treatment alone (middle panel), OVA-sensitized/challenged mice administered 2-ME have a marked reduction in the cellular infiltration of VEGF positive numbers cells (perivascular, peribronchial and interstitium) (bottom panel); the control saline-treated mice have very few positive cells. (B) Percentage of VEGF immunostained cells in several lung compartments, in the absence or presence of 2-ME treatment. Lung sections from five mice from each experimental group were immunostained with anti-VEGF and analyzed under light microscopy (40 \times). The percentage positive cells were measured in surrounded cellular infiltrate in venules, bronchi and interstitium using an image analyzer (five venules or five bronchi from five to eight lung sections were analyzed for each experimental group). Results are expressed as averages and standard deviations of positive cells. (Upper) Perivascular infiltrate, (middle) peribronchial infiltrate, (lower) interstitium. ** $p < 0.05$ presence of 2-ME vs. absence of 2-ME (ANOVA).

($2.2 \pm 0.1\%$ versus $7.5 \pm 1.2\%$), and the interstitium ($9.3 \pm 2.2\%$ versus $38.7 \pm 4.5\%$).

In order to determine the effect of 2-ME treatment on collagen IV expression (as a marker of fibrosis) in our experimental murine model of allergic airway inflammation, we performed immunohistochemistry to measure the expression of this protein. The results were very similar to those observed for VEGF expression. Fig. 8 shows very low immunoreactive collagen IV localized in epithelial layers around the vessels and bronchioles in the SS group (Fig. 8A, upper panels). In contrast, the OVA-exposed mice showed a very significant increase in the expression of this protein in both the perivascular and also in the peribronchial areas, and these increases were very significant in the interstitium areas (Fig. 8A, middle panels). The 2-ME treatment dramatically decreased collagen IV expression in the allergen-induced asthmatic lungs (Fig. 8A, bottom panels). To quantify the expression of collagen IV, we counted the percent of collagen IV positive cells in several lung areas. Fig. 8B shows that the mean percentage of collagen IV positive cells in the OVA group

mice significantly increased with $17.2 \pm 3.2\%$ (perivascular area), $10.1 \pm 1.4\%$ (peribronchial) and $36.7 \pm 6.5\%$ (interstitium), compared with the SS group with $2.8 \pm 0.8\%$ (perivascular area), $2.5 \pm 0.2\%$ (peribronchial) and $4.1 \pm 1.5\%$ (interstitium). In contrast, treatment with 2-ME resulted in a significant reduction in collagen IV expression as compared with the OVA group in the perivascular area ($4.2 \pm 0.3\%$ versus $17.2 \pm 3.2\%$), peribronchial ($3.5 \pm 0.1\%$ versus $10.1 \pm 1.4\%$), and the interstitium ($6.7 \pm 1.2\%$ versus $36.7 \pm 6.5\%$). The above results, altogether, demonstrate that 2-ME inhibits significantly the expression of HIF-1 α , VEGF and collagen VI in the OVA asthma murine model.

2-ME inhibits circulating IgE anti-OVA antibody in the sera of OVA allergic mice

We examined whether the marked reduction in eosinophil recruitment into the airways of OVA-challenged mice conferred by 2-ME was associated with a defect in sensitization to OVA and resulting in a defect in IgE production.

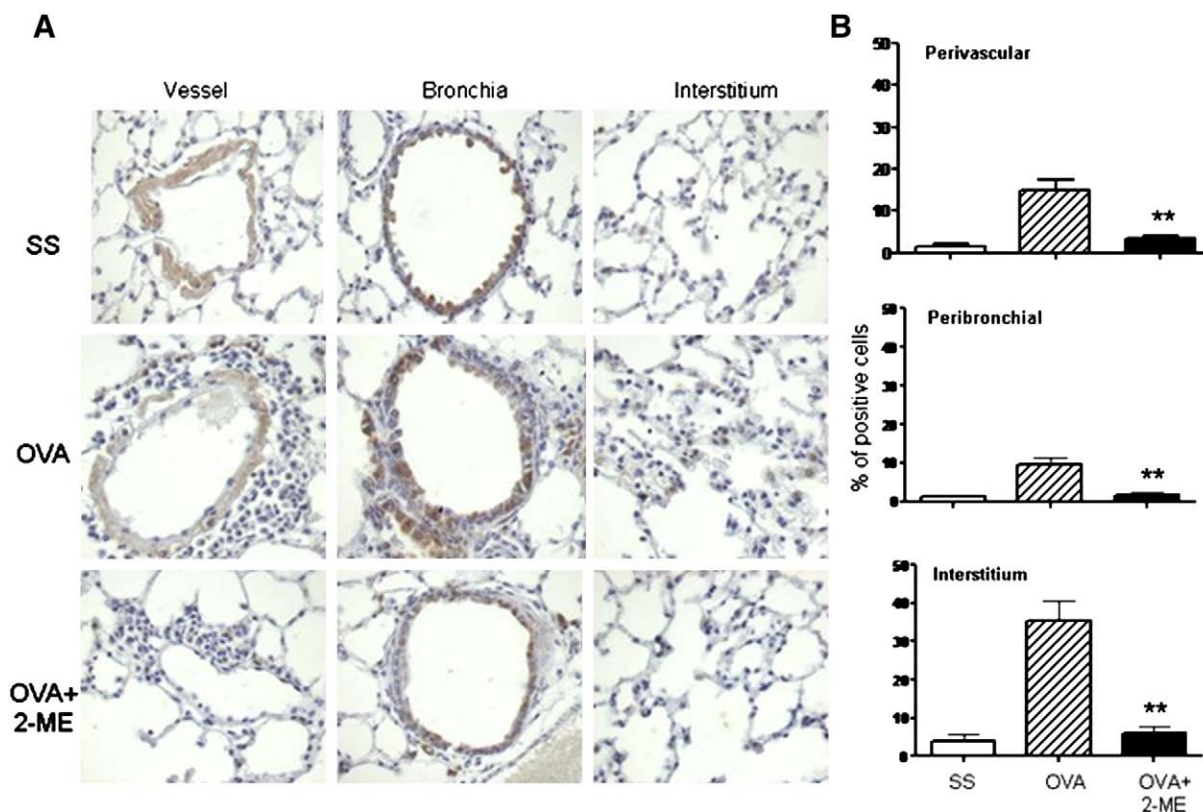


Figure 8 2-ME treatment reduces the collagen IV expression in lung tissue. (A) Immunohistochemical comparison of collagen IV expression in lung tissue obtained from OVA-sensitized/challenged mice, in the absence or presence of 2-ME administered IT at a dose of 30 mg/kg, and saline-treated mice. Compared with OVA treatment alone (middle panel), OVA-sensitized/challenged mice administered 2-ME have a marked reduction in the cellular infiltration collagen IV positive numbers cells (perivascular, peribronchial and interstitium) (bottom panel); the control mice have very few positive cells (top panel). (B) Percentage of collagen IV immunostained cells in several lung compartments, in the absence or presence of 2-ME treatment. Lung sections from five mice from each experimental group were immunostained with anti-collagen IV antibodies and analyzed under light microscopy (40 \times). The percentage of positive cells was measured in surrounded cellular infiltrates in venules, bronchi and interstitium using an image analyzer (five venules or bronchi from five lung sections were analyzed for each experimental group). Results are expressed as averages and standard deviations of positive cells. (Upper) Perivascular infiltrate, (middle) peribronchial infiltrate, (lower) interstitium. ** $p < 0.05$ presence of 2-ME vs. absence of 2-ME (ANOVA).

Circulating levels of OVA-specific IgE were measured by ELISA in the sera of allergic mice before and after treatment with 2-ME. Fig. 9 shows that 2-ME caused a slight but significant decrease of specific IgE antibody.

Discussion

The present findings provide for the first time evidence that intratracheal (IT) administration of 2-ME was effective in preventing the pathogenesis of asthma in a murine model of atopic asthma. Administration of 2-ME markedly diminished the inflammatory pulmonary response, eosinophil infiltration in the lung tissue, goblet cell hyperplasia with airway occlusion with mucus and reduction in collagen IV expression. The above findings also correlated with inhibition of circulating level of anti-ovalbumin IgE antibody. In addition, 2-ME inhibited HIF-1 expression concomitantly with inhibition of VEGF expression in the same tissues. It has been well documented that VEGF and HIF-1 α are intimately involved in the pathogenesis of asthma and 2-ME has been reported to inhibit both HIF-1 α and VEGF [16,19]. The present findings

corroborate these results in our murine airway inflammation model. Currently, 2-ME is being clinically tested in several diseases, including cancer, diabetes, rheumatoid arthritis, etc [3,16,20]. In addition, the present findings suggest the potential therapeutic application of 2-ME in the treatment of asthmatic patients with airway inflammation.

Epithelial goblet cells and mucus-secreting sub-mucosal glands are the major sources of luminal mucus. Goblet cell hyperplasia is a feature of the airways inflammation in asthma [3]. 2-ME significantly reduced the allergen-induced goblet cell hyperplasia and mucus occlusion observed in OVA-sensitized/challenged mice. Muz et al. [8] have reported that cysteinyl leukotrienes receptor blockade significantly reduced the allergen-induced goblet cell hyperplasia and mucus occlusion in the airway in OVA-sensitized/challenged mice. Similar findings were previously reported by Henderson et al. [21]. The present findings demonstrate that the mucus in epithelial goblet cell hyperplasia is decreased after 2-ME treatment.

Smooth muscle invasion is usually increased in large and/or small airways in both fatal and non-fatal cases of asthma

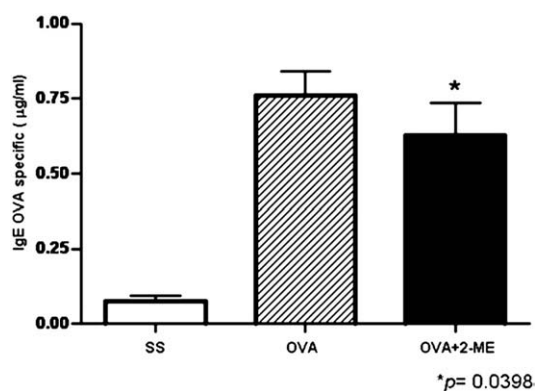


Figure 9 Intratracheal administered of 2-ME reduces IgE. ELISA for serum IgE levels was performed as described in Materials and methods. We analyzed the IgE serum levels ($\mu\text{g/ml}$) in the experimental and control groups. Each column represents the mean and S.M.E. of five to eight mice in each group. * $p < 0.05$ in comparison with the control group (*U* Mann Whitney).

[22]. In asthma, remodeling is usually present in biopsies as shown by collagen deposits on the reticular basement membrane [22]. Airway thickening beneath the basement membrane occurs with deposits of collagen and other extracellular matrix proteins including: fibronectin, tenascin and laminin [1]. The additional reticulin is largely produced after activation of myofibroblasts leading to fibrosis of the airways [23]. Collagen deposition occurs in the connective tissue layer surrounding the blood vessels and alveolar interstitial. The present findings demonstrate the airway collagen deposition/fibrin is specifically reduced in the 2-ME treated mice.

Exaggerated levels of VEGF are present in persons with asthma. However, the role of VEGF in normal and asthmatic lungs has been documented. Lee et al. [24] generated lung targeted VEGF transgenic mice and evaluated the role of VEGF in TH-2 mediated inflammation. In these mice, induction of VEGF resulted in an asthma-like phenotype with inflammation, parenchymal and vascular remodeling, edema, mucus, metaplasia, hyperplasia and airway hyper-responsiveness. VEGF also enhances respiratory antigen sensitization [24]. In this setting, VEGF was produced by the epithelial cells and by the TH-2 cells suggesting that VEGF regulation may be therapeutic in asthma. Clinical studies suggest, a role for angiogenesis in the development and persistence of chronic asthma. Suzaki et al. [25], studied the use of endostatin which is a potent anti-angiogenic factor in the OVA model, OVA-challenged mice induced immunocalization of numerous VEGF positive cells around airways and also increased serum level of VEGF. Treatment with endostatin inhibited the airway hyper-responsiveness, pulmonary allergic inflammation, production of IgE specific anti-OVA antibodies and inhibited induction of inflammation. Our findings herein with 2-ME-induced inhibition of VEGF corroborate the role of VEGF in asthma. VEGF regulates angiogenesis and also induces inflammation and remodeling.

The blood vessels formed in asthmatic airways are involved in inflammation and airway remodeling processes in current asthma. VEGF and angiopoitin-1 (Ang-1) are angiogenic factors involved in the formation of blood vessels. VEGF has been reported to contribute to non-specific airway

hyper-responsiveness, has chemotactic effect on eosinophils and enhances airway smooth muscle cell proliferation. Further, TH-2 cells have receptors for VEGF and TH-2-associated cytokines increase VEGF expression. A study examined the relationship between VEGF level and clinical characteristics of VEGF expression and its association with HIF-1 expression. Bronchoscopy was performed in 30 patients and VEGF levels were assessed in alveolar lavage and HIF-1 α and HIF-2 α were examined by immunohistochemistry. The results demonstrated that the levels of VEGF were elevated compared to control. The same was found for HIF-1 α and HIF-2 α . The findings demonstrated that VEGF expression correlated significantly with HIF-1 α and HIF-2 α [23]. Our findings here are in agreement with this report.

2-ME is a naturally occurring metabolite of 17 beta-estradiol which has anti-proliferative, anti-angiogenic and anti-tumor activity. The anti-angiogenic effect of 2-ME has been suggested to be due in part to the inhibition of HIF [6]. HIF is a transcription factor which mediates the adaptation of cells and tissues to low oxygen concentration by upregulating genes involved in angiogenesis and glycolysis [26]. The oxygen-dependent regulation of HIF-1 α occurs at the level of protein stability. In normoxia, HIF-1 α is targeted for rapid degradation [27]. Mabeesh et al. [6], reported that 2-ME inhibits HIF-1 α protein cell disease and proposed that this effect is at the expense of microtubule disruption by 2-ME. Hagen et al. [11], however, reported that 2-ME prevents HIF-1 α stabilization and rapid degradation. 2-ME exhibited anti-proliferative and cytotoxic effects in head and neck squamous cell lines [16]. 2-ME inhibited HIF-1 α DNA binding and affected the expression of downstream genes such as BH3 interactin domain death agonist (BID) and VEGF.

Several mechanisms have been proposed for 2-ME activity including those mediated by its ability to bind to the colchicine-binding site of tubulin and the inhibition of superoxide dismutase enzymatic activity [18,28]. 2-ME destabilizes microtubules at doses that are efficacious *in vivo*. 2-ME blocks HIF-1 α nuclear accumulation and HIF-1 activity by oxygen and proteasome-independent pathways [6,11]. This mechanism is shared by other microtubule-targeting drugs, such as taxol. 2-ME depolymerizes microtubules and downregulates HIF-1 α protein levels and HIF transcriptional activity in an oxygen and proteasome-independent manners. The mechanism by which 2-ME inactivates HIF-1 α is not fully understood. It has been reported that 2-ME induces superoxide radicals [29] and HIF-1 α is shown to be downregulated by oxygen reactive species [30]. 2-ME anti-angiogenic activity is not solely attributed to its inhibition of VEGF but also to other effects. Pharmacological inhibitors of HIF-1 α regulated genes are more advantageous than HIF-1 gene inactivation for therapeutic application [31].

Long-acting β -agonists produce broncho-dilation and improve asthma symptoms, effects that are maintained with regular use over time. However, monotherapy with beta agonists has consistently been shown to be inferior to inhaled corticosteroids, which can reduce the underlying inflammation associated with the disease. For these reasons, inhaled corticosteroids are recommended as first line maintenance treatment for asthma. For patients whose condition is inadequately controlled with inhaled corticosteroids alone, the addition of a longer acting β agonist is recommended as

symptoms are improved. However, much controversy exists in the use of β agonists in patients with asthma ever since its application over 50 years ago. Regular β agonists usage is associated with tolerance to the drug and a worsening of disease control. Several deaths have been reported with the long-acting β agonists Salmeterol and there was a four fold increased risk for asthma related death. The FDA in July of 2005 issued a strong warning of increased risk that should be placed on the labels of all long-acting β agonists with a recommendation that they be used only after other drugs have failed. A meta analysis pooled from 19 treatments with 33,826 patients from long-acting β agonists increased exacerbation and life threatening conditions compared with placebo [32]. Similar results were found with Salmeterol and Formoterol and in both children and adults. Concomitant inhaled corticosteroids do not adequately protect against these effects.

Our present findings here demonstrate that 2-ME is an effective agent in the treatment of airway inflammation associated with asthma. 2-ME is currently in clinical trials for other diseases and thus toxicity studies are being performed [33, 34]. A phase 2 trial of 2-ME was conducted in 60 patients with multiple myeloma (MM). 2-ME was administered orally at 1000 mg/daily for the first 39 patients and increased to 800 mg twice daily for the remaining patients. No partial responses were observed, although minor responses and prolonged, stable disease were noted. Plasma level of 2-ME was not adequate [33]. Another study investigated the maximum tolerated dose (MTD) and toxicity of 2-ME administered orally in 20 patients with solid tumors. The MTD for 2-ME was not reached and the trial was closed due to low plasma concentration of 2-ME relative to the doses administered. The investigators are currently examining new formulation of 2-ME with improved bio-availability [34]. A clinical study compared the therapeutic effect of 2-ME alone or in combination with docetaxel in patients with metastatic breast cancer. 2-ME alone or in combination with docetaxel was well tolerated [35]. Although these studies were not promising for 2-ME administered orally, we propose that the preferred route of 2-ME administration in asthma is via inhalation using different carriers. Further, this study suggests that HIF-1 α and VEGF are biomarkers in the development and response to treatment in asthma.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Fogarty and by the Jonsson Comprehensive Cancer Center at UCLA. The authors also acknowledge the assistance of Erica Keng and Maggie Yang in the preparation of the manuscript.

References

- [1] J.A. Elias, Z. Zhu, G. Chupp, R.J. Homer, Airway remodeling in asthma, *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 1001–1006.
- [2] J. Bousquet, P.K. Jeffery, W.W. Busse, M. Johnson, A.M. Vignola, Asthma from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) 1720–1745.
- [3] P.K. Jeffery, Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (2001) 528–538.
- [4] M.J. Abramson, A.J. Crockett, P.A. Frith, C.F. McDonald, COPDX: an update of guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease with a review of recent evidence, *Med. J. Aust.* 184 (2006) 342–345.
- [5] V.S. Pribluda, E.R. Gubish Jr., T.M. Lavalley, A. Treston, G.M. Swartz, S.J. Green, 2-Methoxyestradiol: an endogenous anti-angiogenic and antiproliferative drug candidate, *Cancer Metastasis Rev.* 19 (2000) 173–179.
- [6] N.J. Mabjeesh, D. Escuin, T.M. Lavalley, V.S. Pribluda, G.M. Swartz, M.S. Johnson, M.T. Willard, H. Zhong, J.W. Simons, P. Giannakakou, 2-ME inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF, *Cancer Cell* 3 (2003) 363–375.
- [7] K. Kitagaki, T.R. Businga, J.N. Kline, Oral administration of CpG-ODNs suppresses antigen-induced asthma in mice, *Clin. Exp. Immunol.* 143 (2006) 249.
- [8] M.H. Muz, F. Deveci, Y. Bulut, N. Ilhan, H. Yekeler, T. Turgut, The effects of low dose leukotriene receptor antagonist therapy on airway remodeling and cysteinyl leukotriene expression in a mouse asthma model, *Exp. Mol. Med.* 38 (2006) 109–118.
- [9] J. Folkman, Angiogenesis-dependent diseases, *Semin. Oncol.* 28 (2001) 536–542.
- [10] C.G. Lee, H. Link, P. Baluk, R.J. Homer, S. Chapoval, V. Bhandari, M.J. Kang, L. Cohn, Y.K. Kim, D.M. McDonald, J.A. Elias, Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung, *Nat. Med.* 10 (2004) 1095–1103.
- [11] T. Hagen, G. D'Amico, M. Quintero, M. Palacios-Callender, V. Hollis, F. Lam, S. Moncada, Inhibition of mitochondrial respiration by the anticancer agent 2-methoxyestradiol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 923–929.
- [12] M.A. Goldberg, T.J. Schneider, Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4355–4359.
- [13] J.A. Forsythe, B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, G.L. Semenza, Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, *Mol. Cell Biol.* 16 (1996) 4604–4613.
- [14] M. Hedtjarn, C. Mallard, S. Eklind, K. Gustafson-Brywe, H. Hagberg, Global gene expression in the immature brain after hypoxia–ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24 (2004) 1317–1332.
- [15] S.H. Yezep, R.H. Pando, L.S. Argumedo, M.V. Paredes, A.H. Cueto, A. Isibasi, C.R. Bonilla, Therapeutic efficacy of an *E coli* strain carrying an ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OMPC in a murine model of allergic airway inflammation, *Vaccine* 21 (2003) 566–578.
- [16] J.L. Ricker, Z. Chen, X.P. Yang, V.S. Pribluda, G.M. Swartz, W.C. Van, 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 α , tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 8665–8673.
- [17] A. Tomkinson, G. Cieslewicz, C. Duez, K.A. Larson, J.J. Lee, E.W. Gelfand, Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163 (2001) 721–730.
- [18] R.J. D'Amato, C.M. Lin, E. Flynn, J. Folkman, E. Hamel, 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 3964–3968.
- [19] C. Chen, Q. Hu, J. Yan, J. Lei, L. Qin, X. Shi, L. Luan, L. Yang, K. Wang, J. Han, A. Nanda, C. Zhou, Multiple effects of 2-ME and D609 on the cortical expression of HIF-1 α and apoptotic genes in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model, *J. Neurochem.* 102 (2007) 1831–1841.
- [20] A.C. Issekutz, K. Sapru, Modulation of adjuvant arthritis in the rat by 2-methoxyestradiol: an effect independent of anti-

- angiogenic action, *Int. Immunopharmacology* 8 (2008) 708–716.
- [21] W.R. Henderson Jr., L.O. Tang, S.J. Chu, S.M. Tsao, G.K. Chiang, F. Jones, M. Jonas, C. Pae, H. Wang, E.Y. Chi, A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 108–116.
- [22] N. Carroll, J. Elliot, A. Morton, A. James, The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma, *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 (1993) 405–410.
- [23] C.E. Brewster, P.H. Howarth, R. Djukanovic, J. Wilson, S.T. Holgate, W.R. Roche, Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3 (1990) 507–511.
- [24] S.Y. Lee, S. Kwon, K.H. Kim, H.S. Moon, J.S. Song, S.H. Park, Y.K. Kim, Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 97 (2006) 794–799.
- [25] Y. Suzaki, K. Hamada, M. Sho, T. Ito, K. Miyamoto, S. Akashi, H. Kashizuka, N. Ikeda, Y. Nakajima, M. Iwase, I. Homma, L. Kobzik, H. Kimura, A potent antiangiogenic factor, endostatin prevents the development of asthma in a murine model, *J. Allergy Clin. Immunol.* 116 (2005) 1220–1227.
- [26] G.L. Semenza, HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia, *J. Appl. Physiol.* 88 (2000) 1474–1480.
- [27] A.C. Epstein, J.M. Gleadle, L.A. McNeill, K.S. Hewitson, J. O'Rourke, D.R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M.I. Wilson, A. Dhanda, Y.M. Tian, N. Masson, D.L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe, *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell* 107 (2001) 43–54.
- [28] M. Cushman, H.M. He, J.A. Katzenellenbogen, C.M. Lin, E. Hamel, Synthesis, antitubulin and antimetabolic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 2041–2049.
- [29] D. Chauhan, G. Li, M. Sattler, K. Podar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, N. Munshi, T. Hideshima, K.C. Anderson, Superoxide-dependent and -independent mitochondrial signaling during apoptosis in multiple myeloma cells, *Oncogene* 22 (2003) 6296–6300.
- [30] Z.Z. Yang, A.Y. Zhang, F.X. Yi, P.L. Li, A.P. Zou, Redox regulation of HIF-1 α levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 284 (2003) F1207–F1215.
- [31] D.G. Nagle, Y.D. Zhou, Natural product-based inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), *Curr. Drug Targets* 7 (2006) 355–369.
- [32] S.R. Salpeter, N.S. Buckley, T.M. Ormiston, E.E. Salpeter, Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths, *Ann. Intern. Med.* 144 (2006) 904–912.
- [33] S.V. Rajkumar, P.G. Richardson, M.Q. Lacy, A. Dispenzieri, P.R. Greipp, T.E. Witzig, R. Scholssman, C.F. Sidor, K.C. Anderson, M.A. Gertz, Novel therapy with 2-methoxyestradiol for the treatment of relapsed and plateau phase multiple myeloma, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 6162–6167.
- [34] W.L. Dahut, N.J. Lakhani, J.L. Gulley, P.M. Arlen, E.C. Kohn, H. Kotz, D. McNally, A. Parr, D. Nguyen, S.X. Yang, S.M. Steinberg, J. Venitz, A. Sparreboom, W.D. Figg, Phase I clinical trial of oral 2-methoxyestradiol, an antiangiogenic and apoptotic agent, in patients with solid tumors, *Cancer Biol. Ther.* 5 (2006) 22–27.
- [35] J. James, D.J. Murry, A.M. Treston, A.M. Stornio, G.W. Sledge, C. Sidor, K.D. Miller, Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of 2-methoxyestradiol alone or in combination with docetaxel in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer, *Invest. New Drugs* 25 (2006) 41–48.



Contribución de la hipoxia en la remodelación del tejido pulmonar en procesos asmáticos

Guillermina J. Baay Guzmán,^{*,**,*} Ángeles Hernández Cueto,^{*,**} Sara Huerta Yopez^{**}

RESUMEN

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas que inevitablemente se asocia con remodelación pulmonar como mecanismo de reparación tisular. Los cambios estructurales por la remodelación junto con el proceso inflamatorio persistente ocasionan obstrucción del flujo de aire, lo que paradójicamente produce hipoxia en el tejido pulmonar afectado. Uno de los cambios más importantes que sufre el pulmón durante la remodelación es la angiogénesis, ésta es necesaria por el incremento en la masa pulmonar. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es el principal mediador de la angiogénesis y se sabe que puede ser regulado por el factor inducible en hipoxia (HIF-1), provocando un rápido incremento en la expresión de VEGF en condiciones de hipoxia. El factor de transcripción HIF-1 es un heterodímero constituido por dos subunidades: HIF-1 α (inducible en hipoxia) y HIF-1 β (constitutivo). HIF-1 se activa principalmente en la hipoxia y media la transcripción de genes blanco en respuesta a la disminución de oxígeno por unión a elementos que responden en hipoxia. Estudios recientes revelan la asociación de la expresión de HIF en la angiogénesis inducida por los eventos de remodelación que ocurren en los procesos de asma. Se cree que la angiogénesis puede estar modulada por el factor de transcripción HIF, como se ha descrito para otras enfermedades en donde existen eventos de hipoxia y angiogénesis. El propósito de esta revisión es mostrar un panorama general de los trabajos publicados en los últimos años acerca de los mecanismos de hipoxia y remodelación del tejido pulmonar a fin de comprender mejor la fisiopatogénesis del asma.

Palabras clave: asma, remodelación de vías aéreas, VEGF, hipoxia, factor inducible en hipoxia-1 (HIF-1).

ABSTRACT

Asthma is a chronic airway inflammatory disease that is associated with pulmonary remodelling of respiratory tissue. During asthma, lung structure changes due to persistent inflammation and causes obstruction of the air flow, which leads to a paradoxical hypoxic condition in the affected pulmonary tissue. Angiogenesis, which is one of the main components of the remodelling process, is mainly regulated by the vascular endothelial growth factor (VEGF), although other less influential factors are also involved. It is known that VEGF is up-regulated by hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) during hypoxia. The transcription factor HIF-1 is a dimeric protein composed of two subunits: HIF-1 α (inducible by hypoxia) and HIF-1 β (constitutive). HIF-1 activates the transcription of genes during hypoxia by translocating to the nucleus and binding to hypoxia response elements (HREs) on the promoter regions of target genes. Recently the expression of HIF has been documented during angiogenesis in lung remodelling during asthma, thus suggesting that it may play a role in this process. The objective of this review is to give to the reader an overview of the literature in hypoxia and its role in remodelling and the pathogenesis of asthma.

Key words: asthma, airway remodelling, VEGF, hypoxia, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).

* Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS.

** Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez, SS.

*** Universidad Nacional Autónoma de México. División de Posgrado, Facultad de Medicina.

Correspondencia: Guillermina J. Baay Guzmán. Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Centro Médico Nacional La Raza. Calzada Vallejo y Jacarandas s/n, colonia La Raza, CP 02990, México, DF.

Recibido: octubre, 2007. Aceptado: diciembre, 2007.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.actualizacionmedica.com.mx

El asma ha sido una de las enfermedades pulmonares obstructivas de mayor prevalencia en los últimos años, sobre todo en ciudades industrializadas;¹ este trastorno crónico por hipersensibilidad de tipo I o inmediata, mediada por IgE, afecta las vías aéreas generando daño y reparación del tejido pulmonar, los cuales están mediados por mecanismos de inflamación y remodelación respectivamente, pero ambos casos generan obstrucción reversible del flujo de aire

hacia los bronquios, con hiperreactividad aérea persistente.²

El origen del asma es multifactorial. Uno de los principales causantes es la atopia, que se define como la predisposición genética del individuo^{2,3} 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.⁴ Esta respuesta se ve exacerbada por la contribución de factores de tipo no alérgicos como: la dieta materno-infantil, las infecciones respiratorias, la contaminación ambiental y el estado ocupacional.⁵

PATOGENIA DEL ASMA

Para poder entender la patogenia del asma es necesario identificar los factores que inician, intensifican y modulan la respuesta inflamatoria en las vías aéreas y saber cómo estos procesos inmunológicos y biológicos producen los cambios característicos de la enfermedad. El desarrollo clínico del asma es un proceso complejo, en el que participan la predisposición genética del individuo a la sensibilidad al alérgeno y el desequilibrio entre la inmunidad celular (Th1) y la inmunidad humoral (Th2). Este desequilibrio entre Th1 y Th2 está dado por el microambiente generado por estas células, así por ejemplo IFN- γ regula positivamente hacia una respuesta inmunitaria celular del tipo Th1 y desregula la respuesta Th2 y cuando existe un microambiente rico en IL-4 se regula hacia Th2 y se suprime Th1.⁶⁻⁸ En las enfermedades alérgicas predomina la IL-4, favoreciendo la respuesta Th2.⁹

Se ha reportado que las personas atópicas tienen concentraciones anormales de la inmunoglobulina IgE circulante y eosinofilia; además de mutaciones en el brazo largo del cromosoma 5. El cromosoma 5q contiene los genes que codifican para las citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y GM-CSF, así como el cromosoma 11q con un locus que codifica la cadena β del receptor de IgE de alta afinidad. Otros estudios demuestran que la concentración del antígeno también se involucra en la respuesta Th1/Th2, ya que a bajas concentraciones se produce una respuesta de

tipo Th1 y a altas concentraciones del antígeno hay un incremento de IL-4 y una respuesta Th2.¹⁰

La respuesta alérgica podría dividirse en etapas: 1) la de sensibilización y 2) la de respuesta a exposiciones posteriores al alérgeno, de la que habrá dos fases. La primera es inmediata, se manifiesta en segundos y alcanza su máxima respuesta en una hora, se distingue por ser un fenómeno anafiláctico, es decir, en el que participa la IgE. La segunda fase es la tardía, que puede ser más intensa que la primera al paso de cuatro a seis horas y se distingue por ser un fenómeno inflamatorio.

Para tener una respuesta de tipo alérgico es necesario que un individuo atópico tenga una primera exposición al alérgeno, lo que se conoce como sensibilización y consiste en que el alérgeno, al ser inhalado y tener contacto en las vías aéreas con las células dendríticas MHCII específico al alérgeno, migra a los nódulos linfáticos periféricos para el procesamiento y presentación de antígeno a los linfocitos T y B.¹¹ Enseguida se da una respuesta en la que participan citocinas y moléculas coestimuladoras. De acuerdo con el microambiente que se tiene se da una respuesta de tipo Th2 produciendo citocinas como IL-4, IL-13 e IL-5. Las dos primeras son fundamentales para el reclutamiento de linfocitos B y para el cambio de isotipo de inmunoglobulina en las células plasmáticas.¹² Participan señales coestimuladoras, en donde también intervienen integrinas y moléculas de adhesión intracelular.¹³ Los anticuerpos IgE sintetizados por las células plasmáticas son secretados y se unen a sus receptores Fc de alta afinidad (Fc ϵ RI) localizados en los mastocitos en tejido y en basófilos circulantes, así como en los receptores de baja afinidad (Fc ϵ RII) ubicados en eosinófilos, protagonistas esenciales en el infiltrado inflamatorio y reclutados por IL-5. Esta primera exposición al alérgeno no produce ningún tipo de reacción, en la segunda exposición y en las subsecuentes se establece una respuesta alérgica, ya que al inhalar el alérgeno éste se entrecruza directamente con IgE específicas unidas a las células inflamatorias, activándolas y produciendo la desgranulación de éstas y con ello la liberación de mediadores inflamatorios preformados como: la

histamina, la heparina, la serotonina, la triptasa y las citocinas Th2, estableciendo así la fase temprana en unos minutos. Esta fase se distingue por: contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular (vasodilatación) e hipersecreción de moco.¹⁴ La fase tardía de la reacción (cuatro a seis horas después) está dada por la producción de derivados del ácido araquidónico, como leucotrienos y prostaglandinas, que provocan contracción sostenida del músculo liso, vasodilatación y agregación plaquetaria. Además, hay secreción de citocinas y quimiocinas responsables de la obstrucción de las vías aéreas por reclutamiento de eosinófilos mediadores de la inflamación crónica alérgica, linfocitos Th2 CD4, macrófagos y neutrófilos.¹⁵ Con esto se produce una reacción inflamatoria sostenida.¹⁶ Los eosinófilos, por su parte, contribuyen al mantenimiento de la respuesta alérgica y del daño al tejido. La diferenciación selectiva de los eosinófilos se debe a IL-5. Este hecho se demostró en un estudio con ratones transgénicos con sobreexpresión de IL-5, en ellos se mantuvo una eosinofilia marcada, en tanto que la eliminación de IL-5 en ratones expuestos al antígeno mostró una disminución significativa de la eosinofilia pulmonar.¹⁵ Se sabe también que los eosinófilos son reclutados por quimiocinas producidas por los mastocitos y los linfocitos T como eotaxina 1 y 2, además de la liberación de mediadores: proteína mayor básica, neurotoxina derivada de eosinófilos, peroxidasa, proteínas catiónicas, leucotrienos, RANTES. Estos mediadores originan daño directo en el pulmón por la citotoxicidad en las células epiteliales, hiperreactividad aérea, vasodilatación, contracción del músculo liso, secreción de moco, desgranulación de mastocitos y reclutamiento de más eosinófilos, manteniendo así la respuesta Th2. Con estas reacciones la inflamación alérgica es un ciclo de reclutamiento de células inflamatorias y de daño tisular crónico, lo que provoca cambios estructurales en el tejido y disminuye la funcionalidad del pulmón.

REMODELACIÓN PULMONAR

Se cree que la obstrucción del flujo de aire hacia los bronquios ocasionada por asma es reversible.

Sin embargo, se ha visto que esta reversibilidad está limitada por la cronicidad de la enfermedad, ya que se involucran procesos de remodelación que tratan de reparar el tejido dañado. Esta remodelación ocasiona la cicatrización del pulmón provocando el endurecimiento y la pérdida de la flexibilidad del bronquio, lo que afecta el flujo de aire. La funcionalidad pulmonar se refleja en la capacidad respiratoria del paciente, la cual puede medirse por el volumen espiratorio forzado en un segundo o FEV₁ (por sus siglas en inglés de *forced expiratory volume of 1 second*). En los pacientes asmáticos el FEV₁ disminuye a largo plazo.¹⁷ Aunado al tiempo de progresión de la enfermedad y la cronicidad, la capacidad de revertir el daño por remodelación en el funcionamiento pulmonar depende de la detección temprana y el tratamiento adecuado del asma.¹⁸⁻²⁰

Para ello es necesario entender mejor el proceso de remodelación pulmonar, que es la reparación del tejido pulmonar dañado y se da por dos procesos: 1) la regeneración del parénquima dañado para restablecer la estructura y funcionamiento normales del tejido, y 2) el reemplazo del tejido dañado por tejido fibro-conectivo, el cual puede ser o no funcional.¹⁹ Sin embargo, la remodelación pulmonar paradójicamente contribuye al desarrollo de la enfermedad y a su expresión clínica, ya que existen varios grados de severidad, lo cual es directamente proporcional con el depósito de colágeno, proteoglicanos y del estado de hipersensibilidad. Debido a la importancia de la remodelación en el funcionamiento pulmonar y su significado clínico, los esfuerzos se han centrado en este proceso como un blanco terapéutico con la intención de reducir la severidad del asma. Múltiples grupos de trabajo en este campo se han esforzado por esclarecer la fisiopatogenia de la enfermedad. El primer paso fue entender cuáles eran los cambios estructurales en el tejido para después comprender cuáles son los mecanismos por los que se dan estas alteraciones.

CAMBIOS ESTRUCTURALES

Los cambios estructurales que se dan en el pulmón son:²⁰

1) Infiltrado de células inflamatorias como eosinófilos, linfocitos y neutrófilos, 2) desgranulación

de mastocitos, 3) engrosamiento de la membrana basal, 4) pérdida de la integridad de las células epiteliales, 5) hiperplasia e hipertrofia del músculo liso bronquial, 6) hiperplasia de células caliciformes, 7) obstrucción del lumen bronquial por producción excesiva de moco, 8) fibrosis subepitelial y 9) proliferación de la microvasculatura o angiogénesis. Todos estos cambios pueden observarse en las vías aéreas de bajo y alto calibre,²¹ causando el incremento de la masa pulmonar neta de 50 a 300%.²² El estudio de estas alteraciones se ha hecho en resecciones pulmonares o autopsias de pacientes con asma fatal, que se distinguen por la remodelación excesiva de las vías aéreas, aunque estos especímenes no son tan frecuentes;²¹ la mayor parte de los estudios en tejido de pacientes se basa en biopsias endobronquiales,²³ expectoración y lavados bronquioalveolares.^{24,25}

Algunos de los datos provenientes de estos estudios en los cambios estructurales se mencionan a continuación: el engrosamiento de la pared de los bronquios los hace rígidos, por lo que tienen mayor resistencia al paso del aire, disminuyendo su distensibilidad y por lo tanto su funcionamiento.²⁶ A esto se agregan las alteraciones en las células caliciformes que forman parte del epitelio bronquial, que aumentan en número y en función, lo que genera hipersecreción de moco y reduce la tensión superficial, también se altera la distribución de estas células productoras de moco, pues en condiciones fisiológicas normales se encuentran sólo en las vías aéreas de tipo cartilaginoso, pero en los asmáticos llegan a observarse en los bronquiolos periféricos.²⁷

Otros estudios demuestran que el grado de remodelación o fibrosis es proporcional al grado de severidad del asma.²⁸ El estrato epitelial está en la membrana basal y se ha observado que tiene engrosamiento, que aparentemente es resultado de la fibrosis subepitelial en la lámina reticular y se extiende por el estrato de la submucosa, los cambios por fibrosis subepitelial pueden encontrarse en todos los grados de severidad del asma.¹ Dicha fibrosis subepitelial se debe al incremento en el depósito de colágeno tipo I, II y V, fibronectina, tensina, lumican y biglican.²⁹⁻³² Agregado a la fibrosis, están implicadas moléculas de adhesión, citocinas y otros

mediadores inflamatorios que mantienen la inflamación. La hiperplasia e hipertrofia de los miocitos también favorecen el engrosamiento del tejido en la fase crónica de la enfermedad.³³

Las citocinas IL-6 e IL-11 se encuentran altamente expresadas en el tejido y en lavados bronquioalveolares de pacientes con asma. Estas citocinas disminuyen la inflamación inducida por el antígeno en el tejido, como una respuesta antiinflamatoria; sin embargo, a su vez inducen daño. Los ratones transgénicos que sobreexpresan IL-6 o IL-11 desarrollan fibrosis subepitelial intensa.³⁴ Se cree que estas citocinas bloqueadoras de la inflamación en tejido son promotoras de la fibrosis subepitelial y la hiperplasia de los miocitos.

Existen datos que sugieren la participación de citocinas fibrogénicas en la remodelación, pertenecientes a la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), las cuales aumentan su expresión de manera significativa en lavados bronquioalveolares de pacientes asmáticos. Estas citocinas son producidas en altas concentraciones por eosinófilos y fibroblastos.³⁵ La matriz metaloproteasa (MMP) 9 es la encontrada con más frecuencia en los sitios de cicatrización. Esta MMP se ha encontrado en grandes cantidades en esputo y en biopsias de pacientes asmáticos.³⁶

La integridad del epitelio depende de varias moléculas de adhesión, una de ellas es la $\alpha 6\beta 4$ integrina, que predomina en la capa de células basales, mientras que en sujetos sanos son las proteínas desmosomales 1 y 2.³⁷ En las células epiteliales de pacientes asmáticos hay un incremento en la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico y de CD44, moléculas que participan en la reparación epitelial bronquial. Esto es directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad.^{38,39}

Las células del músculo liso que incrementan su masa por hipertrofia e hiperplasia sólo se consideraban células broncoconstrictoras,⁴⁰ pero se ha demostrado que además tienen funciones inmunomoduladoras, pues expresan citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión que causan inflamación en la submucosa e hiperreactividad.^{41,42} El cartílago de las vías aéreas tiene la función de proporcionar cierta rigidez y estructura a las paredes de las mismas, no obstante, en la remodelación en pacientes asmáticos

hay disminución en el volumen cartilaginosa por degradación, lo que genera broncoconstricción, a veces sostenida e intratable.⁴³

Uno de los cambios más importantes en el asma es la angiogénesis, que es el proceso de crecimiento y proliferación de los vasos sanguíneos de neoformación. Este proceso contribuye al edema,⁴⁴ además de tener un papel preponderante en la remodelación, pues al incrementarse la masa pulmonar neta por los cambios antes descritos, es necesario aumentar la vasculatura para oxigenar el tejido en crecimiento, sin olvidar que ya de por sí existe una deficiencia en el funcionamiento pulmonar, lo que ocasiona un estado de hipoxia en el tejido afectado.

Concretamente, la hipoxia fisiológica o patológica es una causa más de remodelación pulmonar y es un potente estímulo para la activación de la expresión de factores angiogénicos y citocinas, liberados por células endoteliales,⁴⁵⁻⁴⁷ como son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la prostaglandina E2 y la angiotensina⁴⁸⁻⁵¹ y se han estudiado tanto en modelos de hipoxia como en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. De todos los mediadores descritos, el VEGF es el principal regulador de la angiogénesis como mediador de la fibrosis y además participa en el engrosamiento de las membranas basales de las células epiteliales de las vías aéreas en pacientes asmáticos. Además, CD34 se expresa en células pluripotenciales capaces de diferenciarse en las células necesarias para la remodelación del tejido pulmonar, como es el caso del asma. En consecuencia la expresión de VEGF y CD34 puede usarse como marcador de angiogénesis.⁵²

EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR Y SU IMPORTANCIA EN LA REMODELACIÓN PULMONAR

Originalmente el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se describió como factor de permeabilidad vascular⁵³ porque facilita el edema, es decir, aumenta la permeabilidad vascular con fil-

tración de proteínas del plasma dentro del intersticio como un fenómeno osmótico, alterando la matriz extracelular. El tejido pulmonar es muy rico en VEGF, muchas células pulmonares lo producen y también responden a él. Durante el desarrollo embrionario el VEGF es esencial para la formación del pulmón, y en los adultos participa en el mantenimiento de la integridad pulmonar. En situaciones patológicas se incrementa participando de forma activa en diferentes enfermedades pulmonares agudas y crónicas como: asma, hipertensión pulmonar y enfisema.⁵⁴

Hay varios reportes de su participación en los procesos de remodelación en asma, como el que informa que los receptores de VEGF se encuentran en células endoteliales, pero en pacientes asmáticos se han reportado también en células epiteliales,⁵⁵ así como en monocitos.^{56,57} Por otra parte, el VEGF es producido por células epiteliales y por linfocitos Th2,⁵⁸ por lo que en consecuencia existirá un incremento de la vasculatura⁵⁹ principalmente en las vías aéreas de pequeño y mediano calibre. Este tipo de alteración se acentúa en el asma en comparación con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica,⁶⁰ además de haber sobreexpresión de VEGF en las paredes bronquiales⁵² y en esputo.^{61,62} Otros datos importantes que relacionan el VEGF con la remodelación pulmonar es que sus niveles de expresión se correlacionan con los de la matriz metaloproteasa (MMP) 9 y la inhibición de los receptores de VEGF disminuye los síntomas de la patofisiología, así como la expresión de MMP-9.⁶³ Asimismo, se ha reportado que inhibir directamente este factor de crecimiento con un anticuerpo bloqueador disminuye la inflamación pulmonar, pero al utilizar un inhibidor de la angiogénesis, como la endostatina, no sólo disminuye la inflamación, también la hiperreactividad, la producción de IgE, los mediadores inflamatorios^{64,65} y, por tanto, los signos y síntomas.⁶⁶

Se ha observado que así como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) permite el incremento de la vasculatura, también la reduce sustancialmente, que en el tejido normal permite el restablecimiento de la estructura normal, pero cuando hay asma sus funciones se potencian por

otros factores,⁶⁷ y se convierte en un factor de regulación de la angiogénesis en el asma, esencial para el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. La expresión de VEGF puede ser modulada por diferentes factores, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, TNF α , TGF β , factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento epidermal, IL-1, IL-6, IL-13 y por hipoxia.

En estados de hipoxia las concentraciones de ARNm de VEGF se incrementan rápidamente⁶⁸ y mediante técnicas de microarreglos de ADN se observó que la hipoxia sobrerregula la expresión de diversos factores angiogénicos, como la angiopoyetina, el factor de crecimiento de plaquetas y los VEGF, con lo que se induce la proliferación celular de la vasculatura pulmonar⁶⁹ y se sabe que el factor inducible en hipoxia 1 (HIF-1) regula la expresión de VEGF.⁷⁰⁻⁷² Estos resultados se obtuvieron de diversos estudios en tejidos en hipoxia y algunos en hipoxia pulmonar, pero no se tiene bien estudiada esta relación en el asma.

Todos los estudios citados permiten establecer una mejor caracterización de la remodelación pulmonar; sin embargo, todavía no se aclara totalmente cómo contribuye la remodelación a la progresión de la enfermedad y su comportamiento clínico.

HIPOXIA Y FACTOR INDUCIBLE EN HIPOXIA 1

La hipoxia es la disminución de oxígeno tisular que se manifiesta cuando las concentraciones de oxígeno son menores a las requeridas para el mantenimiento fisiológico de la tensión de O₂ en los tejidos.⁷³ Como consecuencia, es necesario un control endógeno de la homeostasia del oxígeno para su mantenimiento intracelular, mediante la activación de vías metabólicas alternas que no requieran oxígeno molecular. La hipoxia puede ser transitoria durante el ejercicio, en sepsis o en tejidos traumatizados; o bien puede haber hipoxia crónica debido a la altura o en zonas tisulares menos oxigenadas, como la médula renal. En situaciones patológicas puede observarse en: enfermedades pulmonares, insuficiencia cardíaca, isquemia tisular, anemia y en tumores.

Respuesta a la hipoxia mediada por el factor inducible en hipoxia 1 (HIF-1)

La respuesta generada por hipoxia puede sintetizarse en tres etapas: 1) la detección de la hipoxia o sensor a cambios de oxígeno, 2) la regulación de genes, y 3) una etapa efectora en donde se da la expresión de genes y los cambios funcionales que éstos involucren.⁷⁴ Dicha respuesta es modulada por el factor inducible en hipoxia 1 (HIF-1), este factor de transcripción activa genes que facilitan la adaptación y supervivencia de las células y el mantenimiento de estados de normoxia o concentraciones normales de oxígeno (-21% O₂) ante la hipoxia (1% O₂).^{75,76}

Hasta la fecha se ha reportado que este factor regula la transcripción de más de 100 genes implicados en procesos de angiogénesis, eritropoyesis, metabolismo energético, glucólisis, apoptosis, crecimiento celular, supervivencia y movilidad celular. El HIF-1 es fundamental en la angiogénesis embrionaria y para la formación de la placenta.^{77,78} El HIF-1 fue descrito en 1991 por el grupo de Semenza al identificarse los elementos que responden a hipoxia en el gen de la eritropoyetina, responsable de la eritropoyesis en el que observaron la secuencia consenso de unión al ADN 5'-(A/G) CGTG-3'.^{79,80}

Características estructurales del factor inducible en hipoxia 1

El HIF-1 es un heterodímero constituido por dos subunidades α y β homólogas en sus extremos N-terminal, ya que poseen los dominios de unión a ADN básico hélice-bucle-hélice (bHLH) y un dominio de dimerización Per/Arnt/Sim (PAS).^{76,81} La proteína Per está implicada en la regulación del ritmo circadiano en *Drosophila* y en mamíferos.^{82,83} ARNT (translocador del receptor para arilo hidrocarburos) funciona como un receptor intracelular para los xenobióticos y participa en la detoxificación celular.⁸⁴ Sim es el factor del desarrollo neuronal de *Drosophila* y su homólogo en mamíferos^{85,86} forma una subclase de la familia de factores de transcripción bHLH.

Hasta el momento se han descrito tres diferentes miembros de la familia de HIF: HIF-1 α ,⁸⁰ HIF-2 α ,⁸⁷ HIF-3 α ⁸⁸ y una variante de este último es IPAS⁸⁹ y HIF-1 β . HIF-1 α es la más estudiada de

las subunidades α , está en todas las células cuando hay hipoxia, HIF-2 α es homólogo en su secuencia de aminoácidos de la subunidad 1 α en 48% y se encuentra en células endoteliales, en la carótida y en el pulmón;^{90,91} HIF-3 α se describió después y se expresa en pocos tejidos uniéndose también a los elementos que responden a hipoxia,⁸⁸ y el último miembro descrito de esta familia, el IPAS (inhibidor de PAS), es un proceso de corte de la subunidad 3 α , su función es la de regulador negativo de HIF-1 α uniéndose a éste y evitando su unión al ADN; IPAS predomina en las células de Purkinje del cerebelo y en el epitelio corneal, pero puede inducirse por hipoxia en el corazón y el pulmón,^{89,92,93} HIF-1 β dimeriza con todas las subunidades α .

Factor inducible en hipoxia 1 α (HIF-1 α)

HIF-1 α es la subunidad inducible en hipoxia, tiene una vida media de uno a dos minutos en condiciones de normoxia⁹⁴ debido a que sus concentraciones de proteína sólo se incrementan en estados de hipoxia, dificultando la detección de la proteína;⁹⁵ sin embargo el ARNm puede encontrarse de forma constitutiva y no se altera por los cambios de oxígeno.⁹⁶ El peso molecular de HIF-1 es de 120-130 kDa 826 aa y tiene siete regiones o dominios que son: en el extremo N-terminal entre 17-30 aa tiene el dominio básico en el que está un motif o secuencia consenso para la señal de localización nuclear, fundamental para su translocación nuclear de la proteína; entre los 31-71 aa está el dominio hélice-bucle-hélice (HLH), seguido por el dominio de PAS (85-298 aa) que contiene dos unidades internas homólogas denominadas A (85-158 aa) y B (228-298 aa);⁷⁶ los dominios bHLH/PAS son esenciales para la dimerización con HIF-1 β y la unión al ADN. En su extremo carboxilo terminal tiene dos dominios transactivadores (TADs) y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), los TADs N-terminal y C-terminal se localizan en 531-575 y 786-826 aa, respectivamente⁹⁷ y el ODD⁹⁸ en 401-603 aa, el cual tiene dos motif *PEST-like* que son secuencias ricas en prolinas (P), ácido glutámico (E), serinas (S) y treoninas (T) que son comunes en proteínas de vida corta,⁹⁹ las prolinas (P402) y (P564) son fundamentales para

la hidroxilación y fosforilación de la proteína. Por último, tiene un motif NLS C-terminal (718-721 aa), pero éste está protegido por la supresión del NLS-N y por la subunidad B de PAS.¹⁰⁰

Factor inducible en hipoxia 1 β (HIF-1 β)

El HIF-1 β es una proteína de 91-94 kDa (774-789 aa) previamente identificada como ARNT (translocador del receptor para arilo hidrocarburos)¹⁰¹ y es la subunidad constitutiva, pues no se afectan las concentraciones de ARNm ni de proteína por hipoxia,^{102,103} además, no sólo dimeriza con HIF-1 α teniendo un papel importante en la señalización de hipoxia,^{104,105} también se une a otros miembros de la familia bHLH-PAS como el receptor para arilo hidrocarburos (AHR) para formar el receptor de dioxina,^{106,107} misma que se une a elementos responsables de xenobióticos.¹⁰⁸

El requerimiento de oxígeno y Fe²⁺ para la hidroxilación de las prolinas puede explicar la estabilidad de HIF-1 α que se observa en condiciones de hipoxia o después del tratamiento con agentes que eliminan o compiten por el Fe²⁺. Estudios recientes encontraron que el oxígeno está implicado en la formación de especies reactivas de oxígeno y en la fosforilación y nitrosilación de proteínas. Estos cambios pueden afectar de manera directa o indirecta la hidroxilación de HIF-1 α . Se ha reportado que los eosinófilos, neutrófilos y otras células inflamatorias producen radicales libres como: anión superóxido y peroxinitrito.¹⁰⁹

Regulación del factor inducible en hipoxia 1

La actividad de HIF-1 está dada por la regulación postraduccional de su componente inducible HIF-1 α y es un proceso de múltiples pasos^{96,100,110,111} regulado por los cambios de oxígeno.

Degradación del factor inducible en hipoxia 1 α (HIF-1 α)

La proteína HIF-1 α es rápidamente hidroxilada por protil hidroxilasas dependientes de oxígeno y de hierro¹¹² en dos residuos de prolina (P402 y P564) ubicados en el dominio de degradación dependiente de oxígeno,¹¹³ lo que permite la unión de

la proteína von Hippel-Lindau (VHL)¹¹⁴ formando parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando su ubiquitinación.^{98,115} Adicionalmente, existe una acetilación de un residuo de lisina el K532 por una acetiltransferasa llamada arrest-defective-1 (ARD1), con lo que se favorece la interacción de la subunidad α con la proteína von Hippel-Lindau.¹¹⁶ Otra hidroxilación que sufre la proteína es en un residuo de asparagina, el Asn 803, ubicada en el dominio transactivador dada por una asparaginil hidroxilasa conocido como factor inhibidor de HIF-1 (FIH-1), que es un silenciador de la transactivación, pues evita la unión a su coactivador CBP/p300 por impedimento estérico,¹¹⁷ tras lo cual se da la degradación por el proteasoma 26S.¹¹⁸

Activación del factor inducible en hipoxia 1 α (HIF-1 α) durante la hipoxia

La activación de HIF-1 α ocurre durante la hipoxia, en la que es estabilizada y trasladada al núcleo. Al igual que otras proteínas, HIF-1 α necesita ser fosforilada para su activación, su fosforilación se efectúa en los residuos de prolina (P402, P564) y asparagina (N803), permitiendo que la subunidad α sea trasladada al núcleo gracias a la participación de dos motif NLS localizados, uno en el dominio básico hélice-bucle-hélice y el otro en el extremo C-terminal de la proteína, que es decisiva para su importación al núcleo.¹⁰⁰ Una vez trasladada la subunidad α dimeriza con β y sufre un cambio conformacional que le permite la unión a los elementos responsables de hipoxia (HER) que tienen una secuencia consenso 5'-(A/G)CGTG-3', posteriormente se le une el coactivador p300/CBP¹¹⁹ dándose la transcripción de los genes.

Otras vías de estimulación del factor inducible en hipoxia (HIF)

La regulación de HIF-1 es mediada por hipoxia; sin embargo, existen otras vías de estimulación para los niveles de la subunidad α en condiciones de normoxia. Las citocinas y los factores de crecimiento activadores de receptores tirosina cinasa (RKTs) también son capaces de inducir HIF-1 por un incremento en la síntesis de la proteína. Entre ellos están:

la insulina,¹²⁰ el factor de crecimiento similar a la insulina (GFI-2),¹²¹ IL-1 β , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α),¹²² angiotensina, factor de crecimiento epidérmico (EGF),¹²³ trombina,¹²⁴ endotelina 1 (ET-1)¹²⁵ y heregulina (HER2).¹²⁶

ASMA, REMODELACIÓN E HIPOXIA

Los reportes que se tienen del estudio de HIF-1 en el pulmón incluyen inmunohistoquímicas en tejido pulmonar en hipoxia en los que se observa expresión de HIF-1 α en el epitelio bronquial, el músculo liso, el epitelio alveolar y el endotelio vascular; en cultivos celulares de diferentes líneas celulares expuestas a hipoxia hay inducción de la expresión de HIF-1 α y actividad por la unión de HIF-1 al ADN.¹²⁷ El grupo de Beck-Schimmer observó el efecto de la hipoxia en tejido pulmonar de rata, y encontró incremento de macrófagos alveolares en un gradiente de hipoxia (a mayor número de horas, mayor exposición de hipoxia), además de altas concentraciones de ARNm de TNF α , proteína inflamatoria de macrófagos beta (MIP-1 β o CCL4) y proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1 o CCL2), así como HIF-1 α y molécula de adhesión intracelular ICAM-1, lo que indica que al disminuir los niveles de oxígeno alveolar se induce la inflamación¹²⁸ y se produce vasoconstricción.¹²⁹ Algunas de las quimiocinas y factores de crecimiento que participan en la inflamación de las vías aéreas intervienen durante la remodelación pulmonar en asmáticos, por lo cual es de interés la relación quimiocinas-HIF-1.

La quimiocina CXCL12 o factor derivado de células endoteliales 1 (SDF-1) regula el tráfico de células madre hematopoyéticas y linfocitos^{130,131} y está relacionada con la angiogénesis; por ejemplo, en el desarrollo cardiovascular y vasculatura del conducto gastrointestinal,¹³² por esta razón se le ha relacionado con la angiogénesis en la remodelación. Se sabe que las células CD34+ consideradas hematopoyéticas expresan CXCR4, el receptor de CXCL12 con efecto en su proliferación¹³³ y migración¹³⁴ además de inducir angiogénesis;¹³⁵ Asahara y colaboradores encontraron que el SDF-1 aumenta la vascularidad y contribuye en la angiogénesis en

isquemia por el reclutamiento de células progenitoras epiteliales.¹³⁶ También se relaciona CXCL12 con la migración de fibrocitos al pulmón durante la fibrosis pulmonar.¹³⁷ En el año 2004 Ceradini y su grupo, con un modelo murino de isquemia con gradientes de hipoxia, demostraron que la expresión del gen de CXCL12 es regulada por HIF-1 en células endoteliales; fue la primera vez que se describió que HIF-1 regulaba una quimiocina y a su receptor CXCR4.¹³⁸ En un estudio se utilizaron biopsias bronquiales de asmáticos y se observó un incremento en la vasculatura de la mucosa bronquial que se correlacionó con la expresión de CXCL12, lo que sugiere la participación de este último en la remodelación pulmonar por la proliferación de la angiogénesis.¹³⁹ Con estos reportes puede concluirse que CXCL12 es una quimiocina que puede ser regulada por HIF-1 y que participa en la remodelación en asma por medio de la regulación de la angiogénesis, pero no se ha reportado si en el asma también es regulada por este factor de transcripción.

La otra quimiocina que se ha relacionado con la hipoxia es CCL2, que tiene propiedades angiogénicas, tiene actividad en monocitos, macrófagos, células vasculares del músculo liso y fibroblastos, es un importante mediador de la remodelación de la pared de los vasos,¹⁴⁰ además, se sabe que la capacidad angiogénica de esta quimiocina se debe a que induce la expresión del gen del factor de crecimiento del endotelio vascular y éste a su vez induce la angiogénesis.^{141,142} Su receptor, el CCR2, se expresa en fibrocitos y regula el reclutamiento y la activación de estas células en el tejido pulmonar después de sufrir un daño.¹⁴³ En un estudio efectuado en ratas diabéticas se encontró que la hipoxia modula la expresión y producción de CCL2,¹⁴⁴ pero recientemente se describió que MCP-1 es un gen blanco de HIF-1 en hipoxia.¹⁴⁵ Por consiguiente, esta quimiocina también puede estar regulada por HIF-1 en procesos de alergia.

Otro reporte que sugiere fuertemente la participación de este factor de transcripción en el asma es el de Fajardo y colaboradores, quienes estudiaron las alteraciones de las concentraciones de las proteínas inducidas en asma. En un modelo murino de

inflamación alérgica pulmonar detectaron elevadas concentraciones de proteínas asociadas con hipoxia como: enzimas glucolíticas, proteína reguladora de glucosa, 78 kDa, prolil-4-hidroxilasa, peroxiredoxina-1 y arginasa, en comparación con los ratones control en tejido pulmonar y en fluido de lavados-bronqueoalveolares. Estos resultados sugieren la relación entre la inflamación alérgica y los genes regulados en hipoxia.¹⁴⁶

El HIF-1 es fundamental para el desarrollo embrionario y de la placenta por defectos en angiogénesis, razón por la que ratones KO para ambas subunidades no son viables. Sin embargo, es necesario entender el papel de HIF-1 y su relación con la fisiopatogenia en diversas enfermedades. En la enfermedad que más se ha estudiado este factor de transcripción es en el cáncer y se ha visto como un posible blanco terapéutico, con lo que se abre la posibilidad de estudiarlo en otros padecimientos en los que existe hipoxia, como es el caso del asma.

A pesar de que en el asma se tiene bien caracterizada la hipoxia, no fue sino hasta diciembre del 2006 cuando Lee, del grupo de Kim, en Corea, publicó el primer reporte donde se concluyó que HIF-1 α y HIF-2 α se encuentran elevados en biopsias obtenidas por broncoscopia de pacientes asmáticos, en comparación con los controles. Lo mismo sucede con el factor de crecimiento del endotelio vascular, el cual se correlaciona con la expresión de ambas isoformas de HIF.¹⁴⁷ Sin embargo, la participación de este factor de transcripción en la fisiopatogenia del asma no se ha dilucidado por completo, como tampoco la implicación de las moléculas participantes en el proceso inflamatorio y en la remodelación. Los estudios sugieren que HIF-1 participa de forma importante en la fisiopatogenia del asma, pero no se conoce a profundidad el tema.

Nuestro grupo estudió en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar, la expresión de HIF-1 α y su correlación con la expresión de quimiocinas que participan en el asma y además tienen la secuencia consenso para la unión de HIF-1, éstas son: CXCL12 (SDF-1), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) y CCL24 (eotaxina-2). Para el caso de CCL5 y

CCL24 no se tiene alguna asociación con hipoxia o su regulación por HIF-1; sin embargo, tienen el sitio de unión para HIF-1 en sus promotores, por lo que también podrían estar siendo regulados, además de que su participación en el asma induce la quimiotaxis de eosinófilos y se expresa en los epitelios y células mononucleares de las vías aéreas. Además, se estudió la expresión de VEGF-A y VEGF-C, así como la de colágeno tipo IV para saber si existe alguna correlación entre estos factores de remodelación; sin embargo, sería de gran utilidad un modelo que permitiera observar directamente la participación de HIF-1 en el asma inhibiendo su expresión. Ya que los ratones KO no son viables es necesario buscar otras opciones.

Para ello hay dos alternativas: la primera es la inhibición de HIF-1; con una modificación de nuestro modelo se trató un grupo con 2-metoxiestradiol (2ME2) que es un metabolito natural del 17- β estradiol con propiedades antitumorales y antiangiogénicas por la despolimerización de microtúbulos de tubulina en el citoesqueleto, necesarios para la traslocación de la subunidad α al núcleo.¹⁴⁸ Este fármaco ya lo comercializa la compañía Entre Med, se administra por vía oral y no es tóxico. Actualmente se encuentra en estudios clínicos de fase II para el tratamiento del cáncer; sin embargo, se desconoce si el 2ME2 tiene efecto en alguna otra enfermedad, pero ya que la inhibición de la angiogénesis es importante en el tratamiento del cáncer, así como en la remodelación en procesos alérgicos (en los que se ha descrito que hay una sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular como principal mediador de la angiogénesis y su expresión es inducida por hipoxia, regulada por el factor de transcripción inducible en hipoxia), resulta interesante saber cómo actúa este fármaco en el asma y si modifica la fisiopatología de la enfermedad.

La otra alternativa es un modelo animal KO inducible por el sistema Cre-loxP¹⁴⁹ que interrumpe el gen de HIF-1 β o translocador del receptor para arilo hidrocarburos (ARNT) en tejido específico en ratones adultos por eliminación del exón 6 que codifica el dominio básico hélice-bucle-hélice, fundamental para la dimerización con HIF-1 α y la transcripción

de genes. Los ratones floxiados se tratan posteriormente para inducir la expresión de Cre dando como resultado la interrupción del gen ARNT y perdiendo la expresión del ARNm. Estos ratones se han usado para el estudio de la participación de HIF-1 en diferentes cánceres, lo que abre la posibilidad de su estudio en asma.

Estos estudios ayudarán a entender mejor la participación del factor de transcripción HIF-1 en la patología del asma.

REFERENCIAS

- Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest* 2006;129(4):1068-87.
- Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999;402(6760 Suppl):B5-B11.
- Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, 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):4730-7.
- Halonen M, Stern DA, Lohman C, Wright AL, Brown MA, Martínez 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):564-70.
- Venables KM, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *Lancet* 1997;349(9063):1465-9.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-93.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326(5):298-304.
- Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994;265:1701-6.
- Zimmerman B, Feanny S, Reisman J, et al. Allergy in asthma. I. The dose relationship of allergy to severity of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81(1):63-70.
- Varner AE. The increase in allergic respiratory diseases: survival of the fittest? *Chest* 2002;121(4):1308-16.
- Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol* 2000;97(1):43-49.
- Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115(4):257-69.
- Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344(5):350-62.

15. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1592-600.
16. Busse WW, Lemanske RF Jr. Management of asthma exacerbations. *Thorax* 2004;59(7):545-6.
17. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998;339(17):1194-200.
18. Agertoft L, Pedersen S. Effects of long-term treatment with an inhaled corticosteroid on growth and pulmonary function in asthmatic children. *Respir Med* 1994;88(5):373-81.
19. Bousquet J. Relating inflammatory changes in asthma to clinical status. *Respir Med* 2000;94 (Suppl F):S32-S33.
20. Pare PD, Wiggs BR, James A, Hogg JC, Bosken C. The comparative mechanics and morphology of airways in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1189-93.
21. James AL, Maxwell PS, Pearce-Pinto G, Elliot JG, Carroll NG. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1590-5.
22. Elias JA. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S168-S171.
23. Jeffery P, Holgate S, Wenzel S. Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:S1-S17.
24. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(6):1945-50.
25. Batra V, Khurana S, Musani AI, et al. Concentration of cytokines and growth factors in BAL fluid after allergen challenge in asthmatics and their effect on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by human lung fibroblasts. *Chest* 2003;123(3 Suppl):398S-399S.
26. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999;103(6):779-88.
27. 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):1720-45.
28. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344(5):350-62.
29. Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem* 1999;274(13):9038-44.
30. Laitinen A, Altraja A, Kampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:951-8.
31. Karjalainen EM, Lindqvist A, Laitinen LA, et al. Airway inflammation and basement membrane tenascin in newly diagnosed atopic and nonatopic asthma. *Respir Med* 2003;97(9):1045-51.
32. Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy* 1997;27(4):363-71.
33. 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):1421-33.
34. Elias JA. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S168-S171.
35. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999;104(8):1001-6.
36. Vignola AM, Gagliardo R, Guerrero D, et al. New evidence of inflammation in asthma. *Thorax* 2000;55(Suppl 2):S59-S60.
37. Roche WR, Montefort S, Baker J, Holgate ST. Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:S79-S82.
38. Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 2000;14(10):1362-74.
39. Lackie PM, Baker JE, Gunthert U, Holgate ST. Expression of CD44 isoforms is increased in the airway epithelium of asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16(1):14-22.
40. King GG, Pare PD, Seow CY. The mechanics of exaggerated airway narrowing in asthma: the role of smooth muscle. *Respir Physiol* 1999;118(1):1-13.
41. Hakonarson H, Maskeri N, Carter C, Chuang S, Grunstein MM. Autocrine interaction between IL-5 and IL-1beta mediates altered responsiveness of atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J Clin Invest* 1999;104(5):657-67.
42. Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(6 Suppl):S269-S274.
43. Haraguchi M, Shimura S, Shirato K. Morphometric analysis of bronchial cartilage in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(3):1005-13.
44. Tanaka H, Yamada G, Saikai T, et al. Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(12):1495-99.
45. Boussat S, Eddahibi S, Coste A, et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(2):L371-L378.
46. Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int* 1997;51(2):438-43.
47. Kourembanas S, Morita T, Christou H, et al. Hypoxic responses of vascular cells. *Chest* 1998;114(1 Suppl):25S-28S.
48. Eddahibi S, Humbert M, Sediame S, et al. Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1493-9.

49. Christou H, Yoshida A, Arthur V, Morita T, Kourembanas S. Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(6):768-76.
50. Pfeifer M, Blumberg FC, Wolf K, et al. Vascular remodeling and growth factor gene expression in the rat lung during hypoxia. *Respir Physiol* 1998;111(2):201-12.
51. Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995;95(4):1798-1807.
52. Chetta A, Zanini A, Foresi A, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35(11):1437-42.
53. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146(5):1029-39.
54. Voelkel NF, Vandivier RW, Tudor RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(2):L209-L221.
55. Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung *in vitro*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(4):L1001-L1010.
56. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001; 97(3):785-791.
57. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87(8):3336-43.
58. Lee CG, Link H, Baluk P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 2004;10(10):1095-103.
59. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):229-33.
60. Hashimoto M, Tanaka H, Abe S. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD. *Chest* 2005;127(3):965-72.
61. Asai K, Kanazawa H, Kamoi H, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2003;33(5):595-9.
62. Feltis BN, Wignarajah D, Zheng L, et al. Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(11):1201-7.
63. Lee KS, Min KH, Kim SR, et al. Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(2):161-70.
64. Suzuki Y, Hamada K, Sho M, et al. A potent antiangiogenic factor, endostatin prevents the development of asthma in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(6):1220-7.
65. Wang ZH, Lin JT, Nong Y, Zhou TL. The effect of a vascular endothelial growth factor receptor inhibitor on airway inflammation and airway remodeling in a murine model of asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2005;28(11):755-9.
66. Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol* 2002;168(7):3595-600.
67. Baluk P, Lee CG, Link H, et al. Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways. *Am J Pathol* 2004;165(4):1071-85.
68. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
69. Li D, Teng X, Johns RA. Up-regulation of angiogenic factor expression in hypoxia-treated mouse lung demonstrated by DNA array technique. *Chest* 2002;121(3 Suppl):78S.
70. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995;270(22):13333-40.
71. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4604-13.
72. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995;77(3):638-43.
73. Hopfl G, Ogunshola O, Gassmann M. Hypoxia and high altitude. The molecular response. *Adv Exp Med Biol* 2003;543:89-115.
74. Caramelo C, Peña Deudero JJ, Castilla A, et al. Response to hypoxia. A systemic mechanism based on the control of gene expression. *Medicina (B Aires)* 2006;66(2):155-64.
75. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8(5):588-94.
76. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(12):5510-4.
77. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997;386:403-7.
78. Kozak KR, Abbott B, Hankinson O. ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 1997;191(2):297-305.
79. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242:1412-5.
80. Semenza GL, Neffelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(13):5680-4.
81. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270(3):1230-7.
82. Antoch MP, Song EJ, Chang AM, et al. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 1997;89(4):655-67.

83. Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 1997;389:512-6.
84. Poellinger L. Mechanism of signal transduction by the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Generic* 1995.
85. Zelzer E, Wappner P, Shilo BZ. The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes Dev* 1997;11(16):2079-89.
86. Crews ST. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 1998;12(5):607-20.
87. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(9):4273-8.
88. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF 3 alpha. *Gene Expr* 1998;7(3):205-13.
89. Makino Y, Cao R, Svensson K, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001;414:550-4.
90. Park SK, Dadak AM, Haase VH, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson RS. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2 alpha. *Mol Cell Biol* 2003;23(14):4959-71.
91. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* 2003;35(4):331-40.
92. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 alpha locus. *J Biol Chem* 2002;277(36):32405-8.
93. Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, et al. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1 mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem* 2007;282(19):14073-82.
94. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997;272(36):22642-7.
95. Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 alpha. *J Korean Med Sci* 2002;17(5):581-8.
96. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: post-transcriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(11):5667-72.
97. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997;272(17):11205-14.
98. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(14):7987-92.
99. Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 1996;21(7):267-71.
100. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 alpha. *EMBO J* 1998;17(22):6573-86.
101. Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:307-40.
102. Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw ML, Pettersson S, Poellinger L. Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via the E box motif. *J Biol Chem* 1995;270(23):13968-72.
103. Sogawa K, Nakano R, Kobayashi A, et al. Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(6):1936-40.
104. Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, Ratcliffe PJ. The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem* 1996;271(25):15117-23.
105. Gradin K, McGuire J, Wenger RH, et al. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 1996;16(10):5221-31.
106. Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(17):8185-9.
107. Ema M, Sogawa K, Watanabe N, et al. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184(1):246-53.
108. Fujisawa-Sehara A, Sogawa K, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y. Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 1987;15(10):4179-91.
109. Hanazawa T, Antuni JD, Kharitonov SA, Barnes PJ. Intranasal administration of eotaxin increases nasal eosinophils and nitric oxide in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:58-64.
110. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72.
111. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002;295:858-61.
112. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8.
113. Masson N, Ratcliffe PJ. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J Cell Sci* 2003;116:3041-9.
114. Bonicalzi ME, Groulx I, de PN, Lee S. Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2001;276(2):1407-16.

115. Cockman ME, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000;275(33):25733-41.
116. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002;111(5):709-20.
117. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002;16(12):1466-71.
118. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999;274(10):6519-25.
119. Gu J, Milligan J, Huang LE. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α -p300 interaction. A leukine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol Chem* 2001;276(5):3550-4.
120. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J* 1998;17(17):5085-94.
121. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999;59(16):3915-8.
122. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999;94(5):1561-7.
123. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000;60(6):1541-5.
124. Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001;89(1):47-54.
125. Spinella F, Rosano L, Di C, V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 α in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277(31):27850-5.
126. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001;21(12):3995-4004.
127. Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 1998;275:L818-L826.
128. Madjdpour C, Jewell UR, Kneller S, et al. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(2):L360-L367.
129. Hansen TN, Le Blanc AL, Gest AL. Hypoxia and angiotensin II infusion redistribute lung blood flow in lambs. *J Appl Physiol* 1985;58(3):812-8.
130. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(6):2305-9.
131. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829-33.
132. Tachibana K, Hirota S, Lizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-4.
133. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 2000;95(3):756-68.
134. Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 1998;91(12):4523-30.
135. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α . *Am J Pathol* 1999;154(4):1125-35.
136. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107(9):1322-8.
137. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 2004;114(3):438-46.
138. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10(8):858-64.
139. Hoshino M, Aoike N, Takahashi M, Nakamura Y, Nakagawa T. Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma. *Eur Respir J* 2003;21(5):804-9.
140. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol* 2000;190(3):338-42.
141. Parenti A, Bellik L, Brogelli L, Filippi S, Ledda F. Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(5):H1978-H1984.
142. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 2005;105(4):1405-7.
143. Moore BB, Kolodnick JE, Thannickal VJ, et al. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* 2005;166(3):675-84.
144. Marisa C, Lucci I, Di GC, et al. MCP-1 and MIP-2 expression and production in BB diabetic rat: effect of chronic hypoxia. *Mol Cell Biochem* 2005;276(1-2):105-11.
145. Mojsilovic-Petrovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Stanimirovic DB, Zhang W. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of

- monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *J Neuroinflammation* 2007;4:12.
146. Fajardo I, Svensson L, Bucht A, Pejler G. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(5):477-84.
147. Lee SY, Kwon S, Kim KH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97(6):794-9.
148. Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003;3(4):363-75.
149. Tomita S, Sinal CJ, Yim SH, Gonzalez FJ. Conditional disruption of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene leads to loss of target gene induction by the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Endocrinol* 2000;14(10):1674-81.

XVI Curso Internacional de Inmunología y Padecimientos Alérgicos Julio Cueva

AVAL:

Hospital Juárez de México
American College of Allergy, Asthma & Immunology
Academia Mexicana de Cirugía
Consejo Nacional de Inmunología Clínica y Alergia, AC

FECHA: del 14 al 19 de julio del 2008

SEDE: Auditorio Magno del Hospital Juárez de México

INFORMES: Sociedad de Cirugía del Hospital Juárez de México
Av. Instituto Politécnico Nacional 5160, colonia Magdalena de las Salinas, México, DF
Tel.: 5147-7560 al 69 ext. 322 y 324, 4747-7611.
Fax: 5747-7611 y 5754-4473
E-mail: sch62@prodigy.net.mx, primo65@prodigy.net.mx

Costo: \$800.00

PROFESOR TITULAR: Dr. Daniel Aguilar Ángeles
PROFESOR ADJUNTO: Dr. Gustavo Acosta Altamirano
COORDINACIÓN: Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez, Dr. Víctor Zepeda Buitron