



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YIN – YANG – 1 (YY1) EN LA
FISIOPATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS.

PRESENTA:

JESÚS FERNANDO RANGEL SANTIAGO.

TUTOR:

DRA. SARA HUERTA YEPEZ.

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

MIEMBROS DEL COMITÉ:

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología.

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

Facultad de Medicina, UNAM.
Departamento de Microbiología y Parasitología.

México D.F., a 11 de Diciembre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos,

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

A la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, donde se realizó este trabajo de investigación. El presente estudio fue evaluado por el comité de ética de la institución y aprobado bajo el protocolo HIM/2008/015.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que apoyó al sustentante durante sus estudios de doctorado (número de becario 255792).

Al comité tutor:

Dra. Sara Huerta Yopez.

Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

Dra. Yolanda López Vidal.

INDICE.

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Abreviaturas.....	4
4. Antecedentes.....	5
4.1. Tuberculosis pulmonar progresiva.	
4.2. Inmunología de la tuberculosis.	
4.3. Papel de la respuesta Th2 en tuberculosis.	
4.4. Papel de la quimiocina CCL4 en tuberculosis.	
4.5. Papel de la quimiocina CCL5 en tuberculosis.	
4.6. Aspectos relevantes sobre el factor de transcripción YY1.	
5. Justificación.....	14
6. Hipótesis.....	15
7. Objetivos.....	16
7.1. Objetivo General.	
7.2. Objetivos Particulares.	
8. Materiales y Métodos.....	17
8.1. Cultivo Celular	
8.2. Análisis bioinformático de los promotores de CCL4 y CCL5.	
8.3. Ensayos con plásmidos reporteros.	
8.3.1. Clonación de la región promotora de CCL4 y CCL5.	
8.3.2. Deleción de los sitios de unión para YY1 en el promotor de CCL4 y CCL5.	
8.3.3. Secuenciación.	
8.3.4. Ensayos de transfección.	
8.4. Inmunoprecipitación.	
8.5. Ensayos de interferencia.	
8.6. Western blot.	
8.7. Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.	
8.8. Microarreglo de tejidos (MAT).	
8.9. Inmunohistoquímica.	
8.10. Análisis estadístico.	
9. Resultados.....	24
9.1. Estudio de la relación entre YY1 y CCL4.	
9.1.1. YY1 regula la transcripción de CCL4.	
9.1.2. La expresión de YY1 y CCL4 se induce después de la infección con M.tb y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB pulmonar experimental.	

9.1.3.	La expresión de YY1 correlaciona con la inducción de CCL4 durante la TB humana.	
9.1.4.	La carga antigénica de M.tb determina los niveles de YY1.	
9.1.5.	Altos niveles de YY1 correlacionan con la inducción de TGF- β durante la TB progresiva en humanos.	
9.2.	Avances en el estudio de la relación entre YY1 y CCL5.	
9.2.1.	YY1 regula la transcripción de CCL5.	
9.2.2.	La expresión de CCL5 se induce después de la infección con M.tb y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB pulmonar experimental.	
10.	Discusión.....	34
11.	Conclusión.....	40
12.	Figuras.....	41
12.1.	Figura 1. Estrategia de clonación del promotor de CCL4.	
12.2.	Figura 2. YY1 regula transcripcionalmente a CCL4.	
12.3.	Figura 3. La expresión de YY1 y CCL4 se induce tras la infección con M.tb y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB experimental.	
12.4.	Figura 4. Los pacientes con TB expresan niveles incrementados de YY1 y CCL4.	
12.5.	Figura 5. La inducción de YY1 durante la TB progresiva en humanos, correlaciona con la carga de antígenos de M.tb.	
12.6.	Figura 6. La elevada expresión de TGF- β correlaciona con la expresión de YY1 en la TB progresiva en humanos.	
12.7.	Figura 7. Estrategia de clonación del promotor de CCL5.	
12.8.	Figura 8. YY1 regula transcripcionalmente a CCL5.	
12.9.	Figura 9. La expresión de CCL5 se induce tras la infección con M.tb y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB experimental.	
12.10.	Figura 10. Modelo propuesto de la implicación de YY1 en la fisiopatogenesis de la TB pulmonar vía inducción de CCL4, CCL5 y TGF- β .	
13.	Referencias.....	54
14.	Publicación.....	58

1. RESUMEN.

La tuberculosis (TB) es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) y se manifiesta principalmente como una enfermedad pulmonar, representa la segunda causa de muerte por un agente infeccioso a nivel mundial y el 10% de las personas con infección desarrolla la TB progresiva. Se ha descrito que tras la infección, una respuesta inmune de tipo T_H1 se asocia con el control de infección; mientras que la expresión preferencial de citocinas T_H2 conlleva a la progresión de la misma. Por otro lado, estudios mas recientes muestran que algunas quimiocinas como CCL4 y CCL5 también pueden participar en la progresión de la TB; por lo tanto es importante profundizar en el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de las citocinas implicadas en esta enfermedad. De manera importante, se ha descrito que el factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY1) esta implicado en la fisiopatogenia de algunas enfermedades pulmonares como asma y fibrosis idiopática, también se conoce que YY1 regula preferentemente citocinas de tipo Th2 como es la IL-4 y otras citocinas implicadas en la progresión de la TB como IL-10 y TGF-β. Por lo anterior, YY1 puede tener un papel importante en la fisiopatogenia de la TB progresiva, probablemente actuando como un inductor maestro de citocinas implicadas en esta enfermedad; incluyendo la regulación de las quimiocinas CCL4 y CCL5, para las cuales no se ha descrito si YY1 puede regular su expresión.

Basado en esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar si YY1 regula transcripcionalmente a CCL4 y CCL5 y si ésta regulación en conjunto con la inducción de otras citocinas como TGF-β; correlaciona con la progresión de la TB pulmonar.

Para demostrar esto, mediante ensayos con plásmidos reporteros, Inmunoprecipitación de la cromatina y ensayos de interferencia se determinó si YY1 regula transcripcionalmente a CCL4 y CCL5. Adicionalmente, en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva se evaluó la correlación de la expresión de YY1 con la expresión de CCL4 y CCL5 mediante Inmunohistoquímica (IHQ) y patología digital. Finalmente, para evaluar el papel de YY1 durante la infección en humanos, se construyó

un microarreglo de tejidos (MAT) con muestras de tejido pulmonar obtenido de pacientes fallecidos con diagnóstico de tuberculosis y como grupo control se utilizó tejido pulmonar de pacientes fallecidos por causas distintas a tuberculosis o cualquier otra enfermedad pulmonar. Mediante IHQ y patología digital se determinaron los niveles de expresión y la correlación de YY1 con CCL4; además se evaluó la expresión de TGF- β ya que se sabe es un marcador de daño en TB y se determinó su correlación con YY1.

Nuestros datos muestran que YY1 puede tener un papel muy importante en la fisiopatogenia de la enfermedad, mediante la inducción de citocinas involucradas estrechamente en la progresión de la misma. Por lo que a futuro y con estudios más detallados, YY1 podría tomarse como marcador de daño o blanco terapéutico en esta enfermedad.

2. ABSTRACT.

Mycobacterium tuberculosis (*M.tb*) is the etiological agent of pulmonary tuberculosis (TB); this disease remains a worldwide health problem. It has been reported that the profile of secreted cytokines after infection could be related with clearance (T_H1) or progression of infection (T_H2). In addition, some studies have demonstrated chemokines as CCL4 and CCL5 could be involved in the progression of TB. Then, further studies are necessary in order to know the mechanisms regulating the expression of cytokines involved in the disease. Yin-Yang-1 (YY1) plays a major role in the maintenance and progression of some pulmonary diseases; including pulmonary fibrosis; in addition YY1 regulates cytokines related to TB progression such as IL-4 (T_H2 inductor), IL-10 and TGF- β . However, the role of YY1 in TB remains unknown. The aim of this study was to elucidate the role of YY1 in the regulation of CCL4 and CCL5, and its implication in TB. We determined whether YY1 regulates CCL4 and CCL5 using reporter plasmids, ChIP and siRNA assays. Immunohistochemistry and digital pathology were used to measure the expression of YY1, CCL4 and CCL5 in a mouse model of TB. A retrospective comparison of patients with TB and control subjects was used to measure the expression of YY1, CCL4 and CCL5 using tissue microarrays. The expression of TGF- β was also measured since this protein is a very well established damage marker in TB. Our results showed that the expression of CCL4, CCL5 and TGF- β correlated with YY1 expression during experimental or human TB. In conclusion, YY1 could play an important role in TB through induction of specific proteins involved in the progression of this disease. Therefore, treatments that decrease YY1 expression may be a new therapeutic strategy against TB.

3. ABREVIATURAS.

BCG	Bacilo Calmete-Guérin
ICQ	Inmunocitoquímica
IHQ	Inmunohistoquímica
<i>M. tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB	Tuberculosis pulmonar
MAT	Microarreglo de tejidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
YY1	Yin – Yang – 1
CPA	Célula presentadora de antígenos
CD	Célula dendrítica

(Por sus siglas en Inglés)

CCL4	Quimiocina CC Ligando 4
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
GFP	Proteína verde fluorescente
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
siRNA	RNA pequeño de interferencia
TESS	Sistema de búsqueda de elementos de transcripción
WB	Western blot

4. ANTECEDENTES.

4.1 Tuberculosis pulmonar (TB).

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a los pulmones y es la segunda causa de muerte a nivel mundial por un agente infeccioso, antecedida por la infección con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) [1]. En el año 2013 se reportaron 8.6 millones de nuevos casos de TB en todo el mundo y 1.5 millones de personas murieron por esta causa, la incidencia infantil en este mismo año fue de 550,000 nuevos casos y 74,000 muertes. Mas del 95% de las muertes por TB ocurrieron en países con medios y bajos recursos a pesar de que la TB es curable y se puede prevenir [1].

En México para el año 2013 se reportaron 19,445 nuevos casos de los cuales el 85% correspondían a TB pulmonar y 2,166 muertes por este tipo de TB [1]. La personas infectadas tienen a lo largo de su vida un 10% de riesgo de desarrollar la enfermedad progresiva, sin embargo; este riesgo incrementa en la personas cuyo sistema inmune es deficiente como ocurre en casos de infección por VIH, desnutrición o enfermedades inmunosupresoras como diabetes y cáncer entre otros [1].

4.2 Inmunología de la tuberculosis (TB).

La TB es el resultado de la infección con *M.tb*, que primordialmente afecta a los pulmones que se caracteriza por una extensa inflamación local y desarrollo de granulomas. La TB por lo tanto es una condición de inflamación crónica en donde los procesos inflamatorios y reguladores ocurren a la par o por etapas contribuyendo de esta manera al establecimiento y progresión de la enfermedad [2]. El agente infeccioso *M.tb* llega a los alvéolos pulmonares mediante la inhalación de partículas de aerosol de 2-5µm que contienen a la micobacteria. En el microambiente pulmonar *M.tb* entra en contacto con las células epiteliales de las vías aéreas, neumocitos alveolares tipo II, macrófagos

alveolares, células dendríticas y neutrófilos; una vez que se da este contacto, las células contribuyen a la respuesta inmune temprana mediante la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas con el objetivo de eliminar a *M.tb* o en su defecto incrementar los mecanismos microbicidas de los macrófagos infectados [3]. Además, las células dendríticas infectadas migran a los nódulos linfáticos locales para dar inicio a la respuesta inmune adaptativa requerida para el arresto del crecimiento de la bacteria y su entrada a una fase de latencia [3]. Todos estos eventos son orquestados mediante la expresión de citocinas con múltiples funciones que influyen dramáticamente a las células vecinas. Actualmente se ha reportado un vasto número de citocinas que pueden ejercer un efecto pro o anti-inflamatorio y que tienen un papel importante en la resolución de la infección (Tabla 1) [3].

Tabla 1.

Citocinas producidas durante la infección con *M.tb* [3].

Cytokine	Main producers	Targets/role
IL-12	DC	Th1 polarization
IL-23	DC, macrophages	Th1 and Th17 polarization
IL-27	DC	Th1 polarization
IFN- β	DC	Anti-bacterial activity, stimulation of NK T cells, Th1 polarization
TNF- α	AEC, alveolar Type II pneumocytes, NK T cells, macrophages, alveolar macrophages, DC, neutrophils, CD4 ⁺ (Th1) and CD8 ⁺ T cells	Proinflammatory factor, induction of chemokines, activation of macrophages, granuloma formation
IL-1 β	Macrophages, DC	Proinflammatory, recruitment and activation of phagocytic cells, Th17 polarization
IL-18	Macrophages, DC	Proinflammatory, activation of NK T cells, stimulation of IFN- γ secretion from Th1 cells
IL-6	Macrophages, DC	Proinflammatory, Th17 polarization
TGF- β	Macrophages, DC, Tregs	Anti-inflammatory
IL-10	Neutrophils, Macrophages, DC, Tregs	Anti-inflammatory
IFN- γ	AEC, alveolar Type II pneumocytes, NK T cells, CD4 ⁺ (Th1) and CD8 ⁺ T cells, γ/δ T cells, CD1-restricted T cells	Activation of macrophage, induction of NO synthesis and bacterial killing
IL-17	CD4 ⁺ (Th17) T cells, γ/δ T cells	Proinflammatory, recruitment of neutrophil, activation of macrophage
IL-22	CD4 ⁺ (Th17; Th22) T cells, NK T cells	Proinflammatory

La red de citocinas y el gradiente establecido en respuesta a la infección por la micobacteria actúan a nivel local y sistemático sobre numerosas células blanco para controlar el proceso infeccioso, sin embargo; el patógeno pueden utilizar la señalización mediada por citocinas en el hospedero para favorecer su proliferación e invasión de tejidos del hospedero [3].

La producción de citocinas es iniciada por diferentes células de la respuesta inmune que interactúan con el patógeno. En estas células, múltiples patrones de reconocimiento

(PRRs) como TLRs (Receptores tipo Toll) o CLR (receptor de lectina tipo-C) entre otros; pueden censar y reconocer varios factores codificados por *M.tb* como pueden ser componentes de la pared celular, moléculas secretadas o ácidos nucleicos [3]. La bacteria fagocitada por los macrófagos alveolares induce la activación de señales inflamatorias y en consecuencia la liberación de quimiocinas promoviendo el influjo de monocitos, macrófagos y neutrófilos de los vasos sanguíneos adyacentes al sitio de infección [3]. Los fagocitos reclutados al sitio de infección constituyen un nicho celular durante la primera etapa de la infección donde se da inicio a la formación de los granulomas, que se puede describir como una estructura carente de forma definida compuesta de macrófagos, monocitos y neutrófilos donde la bacteria crece ininterrumpidamente con periodos de duplicación de aproximadamente 28 horas [3]. En este periodo de tiempo se da lugar a la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ , adicionalmente también se liberan β -defensinas, surfactantes y otras moléculas que pueden matar directamente al patógeno; de manera importante, el epitelio pulmonar y los fibroblastos pulmonares expresan la quimiocina CXCL18 en respuesta a la infección lo que promueve rápidamente el reclutamiento de neutrófilos, denotando el papel tan relevante de las quimiocinas en esta enfermedad. Este fenómeno es importante debido a que los neutrófilos tienen la función esencial de fagocitar al patógeno opsonizado y eliminarlo, sin embargo; también pueden servir como vehículo de dispersión de la micobacteria si el neutrófilo no es capaz de eliminarla después de fagocitarla [3, 4].

La inmunidad protectora contra *M.tb* es asociada con la actividad de células presentadoras de antígeno (CPAs) a linfocitos TCD4+ y TCD8+ en los nódulos linfáticos principalmente por células dendríticas (CD), mientras que los macrófagos y las CD pueden mediar la expansión de células T de memoria en el pulmón infectado [5]. La producción de IL-12 e INF de tipo I (INF- β) por CD es considerado un proceso crítico para la polarización de linfocitos T CD4+ hacia un perfil T_H1 [6]. Un aspecto importante que determina el resultado de la respuesta inmune contra *M.tb*, es la cinética y concentración de citocinas liberadas en el pulmón infectado y en los nódulos linfáticos, generando un gradiente de citocinas y una única combinación de factores solubles en cada sitio. De

manera particular, las citocinas pro-inflamatorias de tipo T_H1 como $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6 e IL-8 y citocinas anti-inflamatorias como IL-10 se secretan rápidamente en niveles elevados sostenidos en los macrófagos infectados mientras que las CD mantienen niveles casi imperceptibles de estas citocinas [3].

La expresión diferencial de citocinas tiene una implicación altamente importante en la resolución de la infección, como se mencionó anteriormente las citocinas de tipo T_H1 se asocian con el control de la infección mientras que el establecimiento de un perfil preferencial de tipo T_H2 se asocia con la progresión de la tuberculosis.

4.3 Papel de la respuesta T_H2 en tuberculosis.

A lo largo de la co-evolución con su hospedero natural, *M.tb* ha desarrollado una serie de estrategias para evadir la respuesta inmune. Uno de los eventos mas efectivos que contribuyen a la restricción del crecimiento de *M.tb* es la diferenciación de los macrófagos hacia tipos celulares especializados, incluyendo células gigantes multinucleadas, macrófagos espumosos y macrófagos epiteloideos que forman el granuloma en respuesta a citocinas pro-inflamatorias como $IFN-\gamma$ [7]. A pesar de que la micobacteria queda confinada en el granuloma y es sometida a condiciones de estrés para su eliminación, las micobacterias pueden persistir en granulomas caseosos durante años [3].

Las células T $CD4+$ generadas tras la infección con *M.tb* están involucradas de manera crucial en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos $CD4+$ vírgenes pueden diferenciarse en al menos cuatro tipos de células T cooperadoras o T_H por sus siglas en Inglés (T helper) como son T_H1 , T_H2 , T_H17 y T reguladoras o T_{REG} , en respuesta a diferentes agentes infecciosos [8]. De manera interesante, la respuesta T_H2 está bien definida por algunos grupos de investigación como primordial para el desarrollo y progresión de la TB por lo que es tema de estudio en este trabajo. La Interleucina-4 (IL-4) es la principal inductora de un fenotipo T_H2 , además posee funciones inhibitorias de la respuesta T_H1 en conjunto con $TGF-\beta$ e IL-10 por lo que juegan un papel muy importante en la falla del sistema inmune para controlar la infección por *M.tb* [9]. Las citocinas T_H2 en principio están involucradas en la terminación de la respuesta inflamatoria y de esta

manera evitar el daño de los tejidos, sin embargo; se ha visto que pacientes con TB activa con extensivo infiltrado pulmonar y cavitación muestran una respuesta inmune T_H2 que predomina sobre la respuesta T_H1 [10].

Las citocinas T_H2 pueden inhibir el proceso de autofagia, el cuál es un proceso biológico fundamental para incrementar la degradación intracelular de *M.tb* [11]; además una respuesta T_H2 conlleva a la producción de inmunidad mediada por anticuerpos que generalmente falla en conferir resistencia contra la infección por *M.tb* dada su característica de patógeno intracelular [12].

El estudio del perfil de citocinas que se establecen en personas infectadas con *M.tb*, ha sido de mucho interés desde hace décadas, sin embargo la investigación se ha visto limitada por las características de esta enfermedad, a pesar de ello; ha sido posible determinar que existen citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- β implicadas en la progresión de la TB [9]; muchos de estos datos han sido corroborados mediante la utilización de modelos animales, los cuales han sido fundamentales para el entendimiento de la TB. En este sentido, IL-4 es principalmente conocida por ser la responsable de la inducción de un fenotipo T_H2 en los linfocitos T y por su actividad biológica sobre la proliferación celular y apoptosis [13]. Adicionalmente, se ha visto que niveles incrementados de IL-4 correlacionan directamente con la persistencia de la micobacteria, antagonizando la respuesta inmune protectora del hospedero y contribuyendo a la necrosis del tejido pulmonar, induciendo niveles altos de cavitación en pacientes con TB progresiva [14]. Por otro lado, se sabe que la IL-10 actúa inhibiendo la producción de citocinas pro-inflamatorias y la acción de las CPAs impidiendo la activación de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II por sus siglas en Inglés) [15], además de que está ampliamente reportado que IL-10 se produce en altas concentraciones en pacientes con TB progresiva y que se relaciona directamente con el bloqueo de la respuesta T_H1 en estos pacientes [16, 17]. También se ha descrito que el TGF- β que se produce tras la infección con *M.tb* tiene implicaciones muy importantes en esta enfermedad pues inhibe la síntesis y actividad de citocinas de tipo T_H1 ; la expresión de TGF- β en células del granuloma puede resultar en la desactivación de mecanismos

microbicidas en los macrófagos y también en el desarrollo de fibrosis, una de las características inmunopatológicas principales de esta enfermedad [18-20].

De manera muy relevante para este trabajo, se ha reportado que el balance de citocinas de tipo T_H1 o T_H2 puede verse afectado por quimiocinas expresadas por diversas estirpes celulares. Algunas quimiocinas inflamatorias como CCL5, CXCL9 y CXCL10 atraen selectivamente células T_H1 circulantes en sangre hasta el sitio de infección, mientras que otras quimiocinas como CCL3 y CCL4 pueden promover inmunidad de tipo T_H2 [21, 22].

4.4 Papel de la quimiocina CCL4 en tuberculosis.

Una de las quimiocinas que se ha reportado tiene un papel importante durante la infección por *M.tb* es CCL4 ("Chemokine CC Ligand 4" o también conocida como MIP-1 β "macrophage inflammatory protein-1 β "), se sabe que está involucrada en la formación del granuloma y que altas concentraciones de la misma se relaciona con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas [23, 24]. Se ha descrito que CCL4 participa en la patogenia de algunas enfermedades pulmonares como fibrosis pulmonar idiopática [25] y en TB pulmonar existen estudios consistentes donde se ha mostrado que pacientes con TB progresiva muestran niveles incrementados de CCL4 en lavado bronco-alveolar comparado con sujetos control; de manera muy interesante fue la única quimiocina que se encontró selectivamente incrementada (5 veces mas alta) cuando fue comparada con otras quimiocinas (entre ellas CCL5) en dichos pacientes [22]. Además la expresión de CCL4 en conjunto con IL-4 correlaciona directamente con las formas mas severas de TB pulmonar [22]. Un estudio reciente en donde se evaluaron 33 posibles biomarcadores en saliva y suero de pacientes con sospecha de TB progresiva, demostró que CCL4 se perfila con un posible marcador pronóstico de la enfermedad [26]. Cabe destacar que actualmente se ha estudiado poco sobre la regulación transcripcional de CCL4, por ejemplo; se ha reportado que NF- κ B puede regular su transcripción, al igual que el factor de transcripción ICER [27].

4.5 Papel de la quimiocina CCL5 en Tuberculosis.

CCL5 (“Chemokine CC Ligand 5” o también conocida como RANTES; Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) es otra quimiocina que ha mostrado tener un papel importante durante la infección con *M.tb*, es producida por una variedad de estirpes celulares como células T y macrófagos; CCL5 puede quimio-atraer selectivamente monocitos/macrófagos y linfocitos T_H1 hasta el sitio de infección ayudando a la resolución de la misma [28]. Por otro lado, CCL5 también puede tener efectos contrarios al mantener procesos inflamatorios y en consecuencia generar daño tisular; altos niveles de expresión de esta quimiocina están relacionados con enfermedades como artritis, dermatitis atópica, nefritis y colitis entre otros [28, 29]. En TB, se ha descrito el papel importante de esta quimiocina en la formación del granuloma [30], sin embargo; diversos estudios han mostrado que la expresión de CCL5 puede estar asociada con la susceptibilidad a la TB, principalmente cuando existen polimorfismos en dicho gen [31, 32]. Sobre la regulación transcripcional de CCL5 se ha descrito que el factor KLF13 puede activar su expresión [33].

A pesar de que el estudio inmunológico de la TB ha permitido conocer el papel tan importante que tienen algunas citocinas y quimiocinas como las que se revisaron en párrafos anteriores en la progresión de esta enfermedad, poco se conoce sobre los mecanismos que conllevan a la expresión de las misma durante el curso de la infección; por lo tanto, es importante elucidar el papel de los factores de transcripción en la fisiopatogenia de la TB.

De manera interesante, nuestro grupo de investigación esta interesado desde hace varios años en el estudios de los factor de transcripción YY1, el posee características muy específicas que lo perfilan como un factor clave en el desarrollo de la TB progresiva.

4.6 Aspectos relevantes sobre el factor de transcripción YY1.

El factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY1) es una proteína con un papel fundamental en procesos biológicos normales como embriogénesis, diferenciación y proliferación celular entre otros; YY1 ejerce su actividad biológica mediante su capacidad de activar o reprimir la transcripción según el contexto en el que se une a la región promotora de sus genes blanco [34] y de manera muy interesante se ha demostrado que YY1 está involucrado en la progresión y severidad de algunas enfermedades pulmonares como la fibrosis idiopática (FI) [35] y asma [36]. La FI es una enfermedad letal para la que no existe un tratamiento efectivo y no tiene cura, se presenta por inhalación constante de agentes como sílice o asbesto. Recientemente se ha descrito que YY1 tiene un papel fundamental en la FI ya que una actividad desregulada de YY1 está directamente relacionada con la sobreexpresión de las proteínas α -SMA, colágeno y TGF- β , en consecuencia se genera una alta diferenciación de fibroblastos que conlleva al desarrollo de la enfermedad [35]. Por otro lado, en el caso del asma, si bien no es una enfermedad con alta mortalidad, presenta alta incidencia en todo el mundo y no tiene cura; en este caso se ha reportado que YY1 está directamente vinculado con la severidad esta enfermedad [37]. Específicamente, pacientes asmáticos presentan polimorfismos en las regiones promotoras de IL-10 y TGF- β , esto induce que el factor de transcripción YY1 se una con mayor afinidad a estos promotores y genere una alta expresión de estas proteínas, lo que correlaciona directamente con la severidad del asma [37]. Estos datos nos permiten conocer la relevancia de este factor de transcripción en el desarrollo de enfermedades pulmonares.

Adicionalmente, se ha descrito que YY1 regula transcripcionalmente algunas quimiocinas como CXCL12 [38] así como receptores de quimiocinas como CXCR4 [39]. Otro aspecto importante de considerar es que YY1 regula preferentemente citocinas de tipo T_H2 [40]; en este sentido, existe evidencia sólida de que YY1 puede activar la transcripción de citocinas implicadas en la progresión de la TB. Por ejemplo, YY1 regula transcripcionalmente a IL-4 uniéndose de manera directa a la región promotora de esta citocina que es la inductora principal de la respuesta inmune de tipo Th2 [41].

Consistente con estos datos, se ha reportado que el factor de transcripción YY1 se puede unir físicamente al factor de transcripción GATA-3 (uno de los mas importantes para la diferenciación Th2) y de esta manera incrementar la eficiencia y actividad de GATA-3 para activar la diferenciación celular a un fenotipo Th2 [42].

Sabemos que a la fecha no se ha investigado el papel de YY1 en el desarrollo de la TB progresiva, sin embargo; un estudio realizado empleando microarreglos de RNA, demostró que YY1 es uno de los genes que se activan en macrófagos de ratón y de humano tras la infección con *M.tb* [43]. Por lo anterior, resulta razonable pensar que YY1 puede tener un papel importante en la fisiopatogenia de la TB progresiva, probablemente fungiendo como un inductor maestro de citocinas implicadas en esta enfermedad; incluyendo las quimiocinas CCL4 y CCL5, para las cuales no se ha descrito si YY1 puede regular su expresión.

5. JUSTIFICACIÓN.

La TB progresiva sigue siendo un problema importante de salud mundial, a pesar de que ha sido ampliamente estudiada no se han podido encontrar estrategias de diagnóstico y tratamiento que lleven a la erradicación de esta enfermedad. Los avances científicos han permitido conocer que existen elementos de la respuesta inmune que está directamente relacionados con la resolución de la infección. Específicamente se ha descrito que una respuesta inmune de tipo T_H1 confiere protección al hospedero, mientras que el establecimiento de una respuesta inmune de tipo T_H2 se relaciona con la progresión de la tuberculosis. Algunas de las citocinas que están implicadas en la fisiopatogenia de la TB son IL-4, IL-10 y TGF- β , por otro lado, se ha descrito que la quimiocinas CCL4 y CCL5 tiene un papel importante en la respuesta inmune contra *M.tb* pero cuando se expresan en niveles altos puede contribuir a la progresión de la enfermedad. Particularmente, la quimiocina CCL4 podría tener un papel muy importante incluso llegando a ser un marcador pronóstico de TB; por lo tanto estudiar el mecanismo por el cual se lleva a cabo su expresión durante la infección resulta importante. En este sentido, el factor de transcripción YY1 podría ser un factor clave en la progresión de la enfermedad por diversos motivos; 1) Se ha reportado que YY1 tiene un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades pulmonares como la fibrosis idiopática y el asma, 2) Se sabe que YY1 puede regular la transcripción de IL-4, IL-10 y TGF- β , 3) YY1 activa la transcripción de genes de la respuesta tipo T_H2 preferentemente y 4) YY1 regula la expresión de algunas quimiocinas y sus receptores. Cabe destacar que el papel de YY1 en la progresión de la TB no ha sido estudiado previamente. Por lo anterior resulta razonable pensar que YY1 tiene un papel importante durante la infección con *M.tb*, induciendo la expresión de citocinas como CCL4 y CCL5 además de otras ya descritas.

6. HIPÓTESIS.

El factor de transcripción YY1 participa en la fisiopatogenia de la tuberculosis mediante la inducción de citocinas relacionadas a la progresión incluyendo a las quimiocinas CCL4 y CCL5.

7. OBJETIVOS.

7.1 Objetivo general:

Estudiar el papel del factor de transcripción YY1 en la regulación transcripcional de CCL4 y CCL5, así como la implicación de esta regulación en la fisiopatogenia de la tuberculosis pulmonar progresiva.

7.2 Objetivos particulares:

1. Determinar si YY1 regula transcripcionalmente a las quimiocinas CCL4 y CCL5.
2. Evaluar la expresión del factor de transcripción YY1 en la progresión de la tuberculosis progresiva experimental en un modelo murino.
 - 2.1. Determinar la correlación entre la expresión de YY1 con CCL4 y CCL5 durante la tuberculosis progresiva experimental.
3. Evaluar la expresión del factor de transcripción YY1 en la progresión de la tuberculosis progresiva en humanos.
 - 3.1. Determinar la correlación entre la expresión de YY1 y la expresión de CCL4, CCL5 y TGF- β durante la tuberculosis progresiva en humanos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivo celular.

Línea celular	Características	Condiciones de cultivo
PC3	(ATCC: CRL-1435) obtenida a partir de adenocarcinoma de próstata grado IV, crecimiento adherente.	Medio RPMI ADV (GIBCO, Invitrogen USA), suplementado con L-glutamina, piruvato, penicilina, antibiótico-antimicótico y SFB 3%. Temperatura 37°C y 5% de CO ₂ .

8.2 Análisis bioinformático de los promotores de CCL4 y CCL5.

La predicción de los sitios de unión para YY1 en el promotor del gen de CCL4 y CCL5 se realizó mediante el programa TESS (Transcription Element Search System) el cual conjuga las bases de datos de TRANSFAC v6.0, JASPAR 20060301, IMD v1.1 y CBI/GibbsMat v1, se analizaron 2000 nucleótidos río arriba de la secuencia ATG del promotor de los genes de interés.

8.3 Ensayos con plásmidos reporteros.

8.3.1 Clonación de la región promotora de CCL4 y CCL5.

Se clonaron 1000 pares de bases (pb) de la región promotora de la quimiocina CCL4 y 1300 pb de la quimiocina CCL5 que contienen los sitios hipotéticos de unión para YY1 en el plásmido reportero pLGFP, éste plásmido tiene como principales características la expresión de la proteína verde fluorescente como gen reportero y resistencia a la Kanamicina. El promotor se amplificó mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) a partir de DNA genómico de células mononucleares de sangre periférica.

Para clonar el promotor de CCL4 se diseñaron oligonucleótidos específicos con sitios de restricción para las enzimas Xba I y Xho I que sirvieron para la inserción del promotor amplificado, para el promotor de CCL5 los oligonucleótidos se diseñaron con las enzimas Nhe I y Xho I. La funcionalidad de los promotores clonados se evaluó mediante transfección en la línea celular PC3.

8.3.2 Delección de sitios de unión para YY1 en la región promotora de CCL4 y CCL5.

La delección de los sitios hipotéticos de unión para YY1 en la región promotora de las quimiocinas de interés se realizó mediante el sistema comercial de mutagénesis sitio dirigida QuikChange® II (stratagene). Este método emplea una DNA polimerasa *Pfu* ultra de alta fidelidad, la mutación es oligo-dirigida replicando ambas cadenas de la construcción. La extensión de los oligos genera un plásmido mutado con extremos cohesivos. Seguido de la reacción de PCR el producto fue tratado con la enzima Dpn I. La enzima endonucleasa Dpn I es específica para DNA metilado y hemimetilado y se usa para digerir el DNA parental y seleccionar el DNA sintetizado que contiene la mutación. Entonces el producto digerido es transformado en las células ultracompetentes XL10-Gold. El porcentaje de eficiencia de este sistema para generar la delección es mayor al 80%.

8.3.3 Secuenciación.

Una vez seleccionadas las colonias resistentes a la Kanamicina, la mutación fue comprobada por secuenciación empleando el BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

8.3.4 Ensayos de transfección.

De manera general, los ensayos de transfección se realizaron en células PC3 utilizando como agente transfectante Lipofectamina 2000 (Invitrogen), partiendo de 2×10^5

células/pozo (en placas de 12 pozos Corning), las células fueron mantenidas en un ambiente de 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Los valores de expresión de GFP se determinaron con el equipo BD FACSCalibur Flow Cytometer.

8.4 Inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP).

El ensayo se llevó a cabo con DNA extraído de células PC3 con el sistema comercial MAGnify™ CHIP System (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las perlas magnéticas Dynabeads® unidas a proteínas A/G se acoplaron al anticuerpo anti-YY1 (Santa Cruz) a 4°C durante 1h. El entrecruzamiento de DNA y las proteínas se realizaron con una solución de formaldehído al 3%, posteriormente se cosecharon las células y se procedió a lisar con buffer con inhibidor de proteasas, empleando 50 µL por cada millón de células.

La cromatina se fragmentó en un rango de 100 pb – 1000 pb usando un sonicador ultrasónico empleando 8 pulsos de 40” a 60% de amplitud. Se tomaron 5 µL de la cromatina fragmentada y se analizaron los fragmentos en un gel de agarosa al 1%. Una alícuota se usó como el control positivo denominado “input”. El complejo formado DNA-proteína se preparó en 500 µL de buffer de elución y la reversión del entrecruzamiento se dio a 65°C durante 4 h. La región de interés inmunoprecipitada fue amplificada por PCR y los productos se analizaron por electroforesis. Para la fotodocumentación se empleó el sistema de documentación de geles (Bio-Rad Laboratories).

8.5 Ensayos de interferencia.

Las células PC3 se cultivaron en placas de 12 pozos 24 horas previas al ensayo, partiendo de un total de 2×10^5 células por pozo. Se empleó un RNA de interferencia comercial dirigido contra YY1 (IDT, Integrated DNA Technologies) y un control negativo (IDT) a una concentración de 100 nM respectivamente, células PC3 fueron transfectadas empleando como agente transfectante Lipofectamina 2000 durante 3.5 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación las células se mantuvieron en cultivo

bajo las condiciones antes descritas y la expresión de las proteínas de interés se evaluó por inmunocitoquímica (ICQ) y western blot a las 48 horas.

8.6 Western Blot.

Se obtuvieron las proteínas de extractos totales de las células PC3 tratadas con el interferente empleando una mezcla de buffer de lisis e inhibidores de proteasas (Roche). Las proteínas fueron separadas en un gel SDS – PAGE al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa, entonces las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés YY1 (Santa Cruz), CCL4 (Peprtech) o CCL5 (Pharmigen) toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Anticuerpos secundarios fueron incubados durante 2 horas antes de la documentación de la membrana con el equipo Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR). Posteriormente las membranas fueron tratadas con buffer al 2% de SDS, 100 mM de 2 – mercaptoetanol y 50 mM de Tris pH 6.8 y re-incubadas con beta actina (45 kDa) como gen de referencia, seguido por un anticuerpo secundario. La cuantificación de las bandas se realizó empleando canales simples con el software de análisis provisto por LI-COR.

8.7 Modelo Murino de Tuberculosis Pulmonar Progresiva.

Se emplearon ratones machos de la cepa Balb/c de 4 - 6 semanas de edad, a los cuales se les inocularon 2.5×10^5 bacterias de la cepa H37Rv por vía endo-traqueal. Se realizó una cinética de sacrificio a los 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días después de la infección. Tras la infección, en este modelo murino se pueden apreciar dos etapas, la primer etapa denominada etapa temprana se compone desde el día de infección hasta el día 21 en donde se puede identificar infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por monocitos/macrófagos y linfocitos, particularmente al día 14 se da inicio a la formación de estructuras similares a granulomas, estos granulomas alcanzan su máximo grado de madurez al día 21. Durante la etapa temprana se expresan un grupo muy característico de citocinas en el tejido pulmonar de los ratones como son INF-g, TNF-a e IL-12 en otras, importantemente la carga bacilar se mantiene baja. Sin embargo, debido al diseño de

este modelo, a partir del día 28 se puede identificar la etapa progresiva, esta etapa se caracteriza porque el infiltrado inflamatorio se mantiene de manera crónica conllevando al establecimiento de neumonía, daño tisular como necrosis y fibrosis; este fenómeno se explica porque a partir del día 28 la expresión de citocinas cambia, expresando de manera preferencial citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- β entre otros, además; la carga bacilar incrementa de manera descontrolada conllevando a la muerte de los individuos infectados [44]. Estos procedimientos se realizaron bajo las más estrictas normas de seguridad, empleando campanas de flujo laminar bioseguridad tipo III (BSLIII). Los tejidos pulmonares de los ratones fueron embebidos en parafina y ocupados para realizar preparaciones en laminillas de vidrio y se evaluó la expresión de proteínas por inmunohistoquímica (IHQ).

8.8 Microarreglo de tejidos (MAT).

Una de las herramientas de análisis global utilizada para la validación de la expresión, tanto de ácidos nucleicos como de proteínas, de manera *in situ*, son los microarreglos de tejido. Estos, permiten analizar posibles marcadores en forma masiva, debido a que se puede analizar un gran número de muestras clínicas bajo las mismas condiciones experimentales de manera paralela, lo que representa un gran ahorro de tiempo y recursos.

Para la construcción del microarreglo de tejidos se tomaron secciones de 5 micras de cada muestra parafinada para la tinción de hematoxilina y eosina con el fin de identificar la región de interés. Posteriormente, empleando el equipo CHEMICON's Advanced Tissue Arrayer (ATA 100 Chemicon) que utiliza una aguja calibre 0.5 mm mediante la cual se extraerán cilindros de parafina de 3 mm de altura de un bloque de parafina de 2.5 X 2.5 cm “en blanco”, delimitándose una matriz de 5 x 5 elementos. Una vez elaborada la matriz, se utilizó una aguja de calibre 0.4mm para obtener cilindros de tejido de cada una de las muestras de tejido embebidas en parafina (bloque donador), se tomó como guía el corte teñido con hematoxilina y eosina. Cada uno de estos cilindros que contienen el tejido fueron implantados en el bloque en blanco que ya había sido previamente

perforado (bloque receptor) y una vez completada la matriz de 360 tejidos (cada tejido por triplicado), se impregnó una pequeña cantidad de parafina líquida sobre el arreglo para igualar la altura de los cilindros. Posteriormente, el arreglo se calentó en un horno a 60°C por 15 minutos para homogeneizar la parafina de los cilindros inyectados con la del bloque en blanco y eliminar los huecos entre los cilindros de las muestras y el bloque receptor. Finalmente el arreglo se enfrió durante 5 minutos en hielo y se obtuvieron cortes de 5 micras con un microtomo rotatorio. El MAT empleado en este estudio contiene 44 muestras de tejido pulmonar de pacientes fallecidos que en algún momento de su vida fueron diagnosticados con tuberculosis (**grupo TB**) y que tras la autopsia se hizo la confirmación de TB por análisis microscópico y tinción Zielh Neelsen. Como **grupo control** se colectaron 25 muestras de tejido pulmonar de pacientes que murieron por causas distintas a la tuberculosis y que en su historial clínico no presentaron alguna enfermedad pulmonar.

8.9 Inmunohistoquímica.

Secciones de 4 micras del microarreglo de tejidos, fueron preparadas en laminillas y desparafinadas en xilol, rehidratados a través de series de alcohol y teñidos mediante inmunohistoquímica sencilla o doble. Brevemente, se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio a 0.01M, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se incubó por 30 minutos en 1% de solución de peróxido de hidrógeno. Posteriormente, se bloqueó durante 1 hora en una dilución de PBS con suero normal de cerdo al 2%. Las laminillas fueron incubadas con anticuerpos primarios durante 18 horas a 4°C. Después de lavar, se incubó con un segundo anticuerpo conjugado a biotina, seguido de una incubación con estreptavidina conjugada a HRP (Universal LSAB+ KIT/HRP, DAKO Cytomation), por último se la adición diaminobenzidina (DAB) y se contratiñó con hematoxilina. Después de deshidratar las preparaciones se cubrieron con resina.

La foto-documentación y análisis de expresión se realizó mediante patología digital con el digitalizador de imágenes Scanscope CS (Aperio, San Diego, CA. USA). Brevemente, las laminillas fueron digitalizadas a una magnificación de 40X, obteniendo imágenes con

una resolución de 0.45 píxeles/ μm . entonces se seleccionaron secciones de 500 μm por cada tejido, eligiendo áreas representativas y entonces la expresión fue analizada usando el software Sprectrum V11.1.2.752 (Aperio). El algoritmo empleado cuantifica la expresión total o nuclear según sea requerido directamente en el tejido dando una escala cuantitativa de intensidad categorizada como 0 (sin tinción), 2+ (tinción moderada) y 3+ (tinción fuerte), basada en la identificación de color café como tinción específica de las proteínas de interés y de color azul (hematoxilina, de contraste). Los datos fueron procesados mediante el programa de análisis estadístico GraphPad Software, Inc.

8.10 Análisis estadístico.

Se efectuó un análisis exploratorio de la expresión de las citocinas y el factor de transcripción para de identificar la naturaleza de su distribución. Aquellas variables continuas que no tuvieron una distribución normal fueron sometidas a distintas transformaciones hasta obtener una distribución normal, cuando no fue posible se analizaron con métodos no paramétricos. Se elaboraron tablas y gráficos con medidas de resumen (proporciones e intervalos de confianza al 95%, para datos categóricos, promedios y desviación estándar o sus equivalentes no paramétricos, medianas e intervalos intercuartílicos) de toda variable y de acuerdo con la variable dependiente. Para las variables continuas se evaluaron las asociaciones con la prueba t de student o Tuckey o prueba de Mann Whitney según corresponda, también para las categóricas con X^2 . Asimismo, Se estimó la correlación entre la expresión del factor de transcripción YY1 con cada una de las citocinas estudiadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Los análisis de los datos se hicieron con el apoyo del programa GraphPad Software, Inc.

9. RESULTADOS

9.1 ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE YY1 Y CCL4.

9.1.1. YY1 regula la transcripción de CCL4

Mediante análisis bio-informático de TESS (Transcriptional Element Search System) se determinaron 2 sitios hipotéticos de unión para YY1 en la región promotora de CCL4 ubicados a -950 y -260 pares de bases (pb) río arriba del sitio de inicio de la transcripción (**Figura 1A**). Posteriormente se amplificó la región promotora de CCL4 mediante PCR y se clonó en el plásmido reportero pLGFP que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando las enzimas de restricción Xba I y Xho I para insertar el fragmento de interés, de esta manera se obtuvo el plásmido que denominamos pCCL4 (**Figura 1B**), la comprobación de la clonación del promotor de CCL4 en el plásmido reportero se llevó a cabo mediante ensayos de restricción con la enzimas Nhe I (ubicada a 200 pb en la región promotora de CCL4) y Not I (ubicada a 1402 pb en la secuencia de pLGFP); sustrayendo un fragmento de 1300pb indicando la inserción de un fragmento de 1000pb (**Figura 1C**). Tomando como base la construcción pCCL4 se realizó la delección de los sitios hipotéticos de unión para YY1 en la región promotora de CCL4, obteniendo las siguientes construcciones: 950mut y 260mut en las cuales se eliminó el sitio indicado en su nombre; la construcción 950/260mut carece de los dos sitios de unión para YY1. Todas las construcciones fueron validadas mediante secuenciación (dato no mostrado).

La funcionalidad de la región promotora se evaluó mediante transfección en células PC3, Como se puede observar en la **Figura 2A**, pCCL4 presenta una diferencia estadísticamente significativa con respecto al plásmido vacío (pLGFP) utilizado como control negativo, indicando que el promotor de CCL4 clonado es funcional. De manera importante se observa que existe una disminución significativa en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las construcciones que contienen la delección sencilla con respecto al promotor completo ($p = 0.0035$), siendo muy similar el efecto en ambos casos. Cabe

destacar que la doble delección de los sitios de unión para YY1 tiene un efecto más dramático sobre la actividad del promotor de CCL4.

Para conocer si YY1 puede unirse a los sitios putativos determinados por TESS en la región promotora de CCL4, realizamos ensayos de ChIP. En la **Figura 2B** se puede observar el grupo denominado INPUT, que corresponde al control positivo ya que la amplificación de los sitios -950 y -260 se realizó mediante PCR en cromatina completa de células PC3. De manera interesante se muestra que en el grupo YY1 existe un enriquecimiento del amplicón, lo que demuestra que este factor de transcripción es capaz de unirse al promotor de CCL4 en los sitios evaluados para activar su transcripción, ya que la amplificación de las regiones de interés se realizó con cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo específico para YY1. El grupo IgG corresponde al control negativo, donde la amplificación se realizó empleando cromatina inmunoprecipitada con un anticuerpo irrelevante.

Para corroborar la importancia que tiene YY1 en la expresión de CCL4, se trataron células PC3 con un siRNA específico para este factor de transcripción. Mediante ICQ (**Figura 2C**) se determinó la expresión (en color café) de las proteínas de interés, se puede observar una disminución de la expresión de YY1 en las células tratadas con el siRNA tanto en núcleo como en citoplasma en comparación con las células no tratadas (STx) o las tratadas con el control negativo (Scr); en consecuencia, la expresión de CCL4 también disminuye. La cuantificación de la expresión de YY1 y CCL4 bajo las diferentes condiciones en el ensayo de interferencia se realizó mediante western blot, en la **Figura 2D** se muestran que existe una disminución estadísticamente significativa en la expresión de YY1 ($p = 0.0009$) en las células tratadas con el interferente (siRNAYY1) con respecto a aquellas células que no fueron tratadas (STx) o tratadas con una secuencia no específica para YY1 (Scr). Como efecto de la disminución en YY1, la expresión de CCL4 decrece significativamente ($p = 0.0005$).

En conclusión los resultados in vitro demuestran que YY1 regula transcripcionalmente a CCL4 uniéndose de manera directa a su promotor.

9.1.2. La expresión de YY1 y CCL4 se induce después de la infección con *M.tb* y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB pulmonar experimental.

Para conocer como se encuentran los niveles de expresión de YY1 y CCL4 durante diferentes etapas de la TB progresiva, empleamos un modelo murino de TB muy bien caracterizado [44]. En la **Figura 3A** se muestra un esquema del modelo empleado que se describe con detalle en la sección de materiales y métodos. En la **Figura 3B** (panel izquierdo) se presentan microfotografías representativas de la expresión de YY1 a lo largo de la cinética de tiempo en el modelo murino, se observa que en los ratones no infectados (D0) existen niveles basales de YY1 que incrementan a partir del día 1 post infección y se mantienen hasta el día 21. Para el día 28 la expresión de YY1 incrementa significativamente y alcanza su máximo de expresión al día 60 ($p < 0.0001$). En la fotocomposición se aprecian claramente los cambios morfológicos que sufre el tejido pulmonar del ratón debido a la infección con *M.tb*, en el recuadro se muestra una magnificación de áreas representativas donde se puede observa la tinción específica para YY1 (en color café), de manera interesante se observo que la tinción fue principalmente citoplásmica durante la etapa temprana de la enfermedad (D1-D21) mientras que en la etapa progresiva fue primordialmente a nivel nuclear (D28-D60). Las imágenes permiten observar que los macrófagos vacuolados que contienen a la *M.tb* son la estirpe celular que expresa la mayor cantidad de YY1. La expresión de YY1 fue evaluada mediante la tecnología de patología digital, esta estrategia nos permite llevar a cabo el estudio automatizado cuantitativo de la expresión de proteínas en tejido mediante una imagen digitalizada disminuyendo así la variabilidad del análisis y minimizando el tiempo empleado (**Figura 3B** panel derecho).

De manera contraria a lo observado en la expresión de YY1, se encontró que la expresión de CCL4 no sigue una cinética bien definida (**Figura 3C** panel derecho). Los ratones no infectados (D0) muestran niveles basales de la quimiocina, que incrementan considerablemente en el día 3 y en el día 14; durante los días 1, 3 y 21 la expresión es moderada y de manera muy importante los picos máximos de expresión de CCL4

también se dan durante la etapa progresiva de la TB experimental (D28 y D60) ($p < 0.0001$). En la **Figura 3C** (panel derecho) se muestran microfotografías representativas de los cambios morfológicos que sufre el ratón post infección, en el recuadro se muestra una magnificación de áreas representativas donde se puede apreciar la tinción específica para CCL4 en color café a nivel citoplásmico y de membrana celular. Las macrófagos vacuolados representan la estirpe celular que expresa la mayor cantidad de CCL4 al igual que lo observado para YY1. El análisis de la expresión de CCL4 también se realizó mediante la tecnología de patología digital en donde observamos que existe un aumento significativo de la expresión de esta quimiocina sobretodo en la etapa progresiva de la enfermedad (**Figura 3C**, panel izquierdo).

Con el objetivo de conocer si YY1 puede está involucrado en la regulación transcripcional de CCL4 *in vivo* realizamos un análisis de correlación de Pearson. De manera interesante los resultados muestran que la expresión de CCL4 correlaciona con la expresión de YY1 de manera positiva ($r = 0.6508$, $p = 0.0019$) (**Figura 3D**).

Estos datos en conjunto muestran que YY1 y CCL4 se expresan tras la infección con M.tb, y que ambas proteínas están incrementadas significativamente durante la etapa progresiva de la TB experimental. Además la expresión de YY1 correlaciona de manera directa y positiva con la expresión de CCL4 lo que sugiere fuertemente que YY1 podría regular la expresión de CCL4 in vivo.

9.1.3. La expresión de YY1 correlaciona con la inducción de CCL4 durante la TB humana.

Para consolidar los datos obtenidos en nuestro estudio *in vitro* e *in vivo* analizamos la expresión de YY1 y CCL4 en un microarreglo de tejidos (MAT) que contiene 44 muestras *post mortem* de tejido pulmonar de pacientes que algún momento de su vida fueron diagnosticados con TB y 25 muestras *post mortem* de tejido pulmonar de personas fallecidas por causas distintas a la TB o enfermedades pulmonares. Las características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el MAT se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes incluidos en el MAT

		Pacientes TB	Controles
Número		44	25
Edad promedio (años)		56.97 (24-83)	52.52 (20-76)
Sexo*	Masculino	72.7	52
	Femenino	27.3	48
Diagnóstico*	TB Miliar	47.1	No aplicable
	TB No Miliar	52.9	
Factores relacionados a TB*	Alcoholismo	36.3	20
	Tabaquismo	34.09	20
	Diabetes	31.81	20
Ocupación*	Sin ocupación	34.09	16
	Hogar	20.45	44
	Oficios	31.82	40
	Campo	13.64	0

* Valores expresados en (%).

Como ya se menciona, la expresión de las proteínas de interés se realizó mediante la tecnología de microarreglo de tejidos y patología digital. Como criterio de inclusión para los pacientes con TB pulmonar se consideró que las muestras fueran positivas para la tinción Zielh- Neelsen. En la **Figura 4A** se muestran microfotografías representativas del tejido pulmonar, en donde se pueden observar las diferencias histológicas entre los pacientes con TB y el grupo control por tinción con Hematoxilina/Eosina, es notorio que el tejido pulmonar infectado muestra cambios estructurales importantes como un elevado infiltrado inflamatorio y formación de granulomas, en comparación con el tejido pulmonar de un paciente control en donde se observa una estructura normal del pulmón.

También se muestra una microfotografía representativa de la identificación de los bacilos en el tejido infectado teñidos con Zielh-Nielsen. En la **Figura 4B** se muestran microfotografías de secciones representativas de cada grupo (control y TB) donde se puede apreciar la tinción específica para YY1 y CCL4 (en color café) respectivamente. En una mayor magnificación se puede observar de forma mas clara que los pacientes con TB expresan altas concentraciones de esta quimiocina, también se observan las diferencias morfológicas entre ambos grupos; en la **figura 4C** se muestra una doble tinción para YY1 en color café y CCL4 en color rojo donde se aprecia claramente que la

expresión de YY1 es predominantemente nuclear y que las células que tienen este factor de transcripción activo también expresan altas concentraciones de CCL4.

Finalmente cuando realizamos la cuantificación de las proteínas de interés mediante patología digital (**Figura 4D**, gráficas) encontramos que la expresión total de YY1 es estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p < 0.0001$). De manera muy importante, la expresión nuclear de YY1 muestra una clara diferencia ($p = 0.0085$) con respecto a la expresión nuclear encontrada en el grupo control; la expresión con localización nuclear de YY1 biológicamente implica que el factor de transcripción se encuentra activo y llevando a cabo la transcripción de sus genes blanco. Respecto a la expresión de CCL4 encontramos que la expresión total de la quimiocina se encuentra incrementada de manera estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p = 0.0037$). El análisis de correlación de Pearson entre la expresión nuclear de YY1 y la expresión de CCL4, demostró que existe una correlación positiva ($r = 0.2917$, $p = 0.0399$), en la expresión de ambas proteínas.

Estos resultados muestran que YY1 se encuentra sobre expresado y activo en los pacientes con TB progresiva, lo cual sugieren fuertemente que este factor de transcripción podría regular la expresión de CCL4 durante la infección por M.tb en humanos y esto podría tener implicación en la fisiopatogenesis de esta enfermedad.

9.1.4. La carga antigénica de M.tb determina los niveles de YY1

Debido a que el papel de YY1 en TB no ha sido estudiado anteriormente, nos dimos a la tarea de evaluar si la carga de antígenos de micobacteria induce la expresión de YY1; para ello se hizo la detección de antígenos de *M.tb* por IHQ empleando un anticuerpo que identifica una variedad de anticuerpos específicos del patógeno. Una vez realizada la tinción y cuantificación en el MAT, encontramos que el grupo de pacientes con TB presenta una mayor cantidad de antígenos de *M.tb* en comparación con el grupo control ($p < 0.0001$) (**Figura 5A**).

Entonces realizamos un análisis de correlación de Pearson, analizando la expresión de antígenos en el grupo de pacientes con TB con la expresión nuclear de YY1; los resultados muestran que la elevada presencia de antígenos de *M.tb* correlaciona de manera directa y positiva con la inducción de YY1 durante la infección en humanos ($r = 0.3427$, $p = 0.0352$).

*Estos hallazgos son importantes ya que muestran que YY1 se induce tras la infección con *M.tb* y sugieren fuertemente que los niveles altos de YY1 están en función de la carga de antígenos bacterianos en los pacientes con TB.*

9.1.5. Altos niveles de YY1 correlacionan con la inducción de TGF- β durante la TB progresiva en humanos.

Con el objetivo de corroborar si YY1 tiene implicación en la fisiopatogenesis de la TB pulmonar, evaluamos la expresión de TGF- β en el MAT descrito anteriormente. Esto resulta de suma importancia debido a que se sabe que TGF- β es un marcador de daño en la TB, ya que es supresora de la respuesta T_H1 y responsable de la generación de fibrosis durante la infección [45-48]. También se sabe que YY1 regula de manera transcripcional la expresión de esta citocina en otras enfermedades pulmonares como fibrosis idiopática y asma [35, 37].

En el panel derecho de la **Figura 6A** se presentan microfotografías representativas de los pacientes con TB y del grupo control, se observa claramente que los sujetos infectados tienen una mayor expresión de TGF- β . Cuando se realizó la cuantificación de esta citocina mediante patología digital encontramos que los pacientes con TB expresan niveles significativamente altos de TGF- β con respecto al grupo control ($p < 0.0001$). Por último mediante un análisis de correlación de Pearson se muestra que la expresión nuclear de YY1 correlaciona de manera directa y positiva con la expresión de TGF- β ($r = 0.6560$, $p < 0.0001$).

Estos datos sugieren fuertemente que el factor de transcripción YY1 podría regular la transcripción de TGF- β durante la TB progresiva en humanos y fortalece el papel de este factor de transcripción en la fisiopatogenia de esta enfermedad.

9.2 AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE YY1 Y CCL5.

Con el objetivo de profundizar en el papel importante que puede tener el factor de transcripción YY1 en la progresión de la TB y una vez demostrado que YY1 puede regular transcripcionalmente a CCL4 nos dimos a la tarea de estudiar si YY1 puede regular también la transcripción de CCL5 y la implicación de este mecanismo en la fisiopatogenia de la TB. Siguiendo la misma dinámica con la que se abordó el estudio de la relación entre YY1 y CCL4, se muestran los avances obtenidos en el estudio de la relación entre YY1 y CCL5.

9.2.1. YY1 regula la transcripción de CCL5

Mediante análisis bio-informático de TESS se determinaron 4 sitios hipotéticos de unión para YY1 en la región promotora de CCL5 ubicados a -1030, -840, -490 y -280 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (**Figura 7A**). La región promotora de CCL5 fue clonada en el plásmido reportero pLGFp utilizando las enzimas de restricción Nhe I y Xho I, obteniendo denominado pCCL5 (**Figura 7B**), la comprobación de la clonación del promotor de CCL5 en el plásmido reportero se llevó a cabo mediante ensayos de restricción con la enzima BamH I, que tiene un sitio consenso a 750 pb dentro del promotor clonado y un sitio a 50 pb en el sitio de multiclonación (SMC) del plásmido reportero, obteniendo un fragmento de 800pb indicando la inserción de un fragmento de 1300pb (**Figura 7C**). Tomando como base la construcción pCCL5 se realizó la delección de los 4 sitios hipotéticos de unión para YY1 en la región promotora de CCL5, obteniendo las siguientes construcciones: 1030mut, 840mut, 490mut y 280mut; cuyo nombre indica cual sitio fue eliminado del promotor de CCL5, todas las construcciones fueron validadas mediante secuenciación (datos no mostrados) y el efecto de la delección se evaluó mediante transfección en la línea celular PC3.

Como se puede observar en la **Figura 8A**, la región promotora de CCL5 presenta una disminución significativa en la actividad de las construcciones que contienen la delección del sitio de unión para YY1 (** $p = 0.0025$), excepto en la construcción 280mut, que aunque muestra una disminución; esta no es significativa.

Para conocer si YY1 activa la transcripción de CCL5 uniéndose de manera directa a la región promotora de la quimiocina, realizamos ensayos de ChIP. En la **Figura 8B** se muestra el grupo denominado INPUT (control positivo), en donde la amplificación del sitio -490 se realizó mediante PCR en cromatina completa de células PC3. De manera interesante se muestra que en el grupo YY1 existe un enriquecimiento del amplicón, lo que demuestra que este factor de transcripción es capaz de unirse al promotor de CCL5 al menos en el sitio evaluado, ya que la amplificación de la región de interés se realizó con cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo específico para YY1. El grupo IgG corresponde al control negativo, donde la amplificación se realizó empleando cromatina inmunoprecipitada con un anticuerpo irrelevante; aún queda por identificar si se puede unir a los tres sitios restantes.

Para corroborar la importancia que tiene el factor de transcripción YY1 en la expresión de CCL5 se realizaron ensayos de inhibición de YY1 mediante transfección con un RNA de interferencia para YY1. La cuantificación se realizó mediante western blot, en la **Figura 8C** se muestran que tras la inhibición de YY1 existe una disminución estadísticamente significativa en la expresión de CCL5 ($p = 0.0022$) en las células tratadas con el siRNA-YY1.

Estos resultados in vitro muestran que YY1 regula transcripcionalmente a CCL5 uniéndose de manera directa a su promotor por lo menos en el sitio -490 río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

9.2.2. La expresión de CCL5 se induce después de la infección con *M.tb* y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB pulmonar experimental.

En la **Figura 9A** (panel izquierdo) se presentan microfotografías representativas de la expresión de YY1 a lo largo de la cinética de tiempo en el modelo murino, se observa que en los ratones no infectados existen niveles basales de CCL5, al D1 estos niveles incrementan significativamente post infección se induce la expresión de CCL5, de manera general los niveles de expresión de CCL5 son elevados a lo largo de toda la cinética, de manera interesante la mayor expresión se presenta en el día 60 y solo presenta un incremento estadísticamente significativo con los días 1 y 3 de la etapa temprana (* $p = 0.0039$). En la fotocomposición se aprecian claramente los cambios morfológicos que sufre el tejido pulmonar del ratón debido a la infección con *M.tb*, en el recuadro se muestra una magnificación de áreas representativas donde se puede observar la tinción específica para CCL5 en color café, los macrófagos vacuolados que contienen a la *M.tb* son la estirpe celular que expresa la mayor cantidad de esta quimiocina.

Con el objetivo de conocer si YY1 puede estar implicado en la regulación de la expresión de CCL5 *in vivo*, realizamos un análisis de correlación de Pearson (**Figura 9B**). De manera interesante los resultados muestran que la expresión de CCL5 correlaciona con la expresión de YY1 de manera positiva ($r = 0.6462$, $p = 0.0070$).

Estos datos muestran que muy probablemente YY1 es un regulador transcripcional de CCL5 y que muy probablemente puede inducir la expresión de esta quimiocina durante la tuberculosis experimental. Finalmente es importante mencionar que aún queda por realizar el estudio de la expresión de CCL5 en el MAT de tejido pulmonar humano infectado con *M.tb*, sin embargo; los avances logrados hasta el momento en el estudio de esta quimiocina, permiten reforzar nuestra teoría de que YY1 puede fungir como una proteína maestra capaz de activar la transcripción de una variedad de citocinas implicadas en la progresión de la TB.

10. DISCUSIÓN

La TB progresiva sigue siendo un problema de salud mundial y a pesar de los grandes esfuerzos y avances en el desarrollo de estrategias de diagnóstico y tratamiento sigue teniendo una alta incidencia y mortalidad, siendo la segunda causa de muerte en todo el mundo por un agente infeccioso [1, 49]. Debido a que esta enfermedad ha sido ampliamente estudiada, se ha descrito que la contención de la infección está directamente relacionada con el establecimiento de una respuesta celular de tipo T_H1 [17], mientras que la expresión de citocinas tipo T_H2 correlaciona directamente con la progresión de la enfermedad [22, 44]. Algunas citocinas como IL-4 [13], IL-10 [16, 50] y TGF- β [20, 46] están directamente implicadas en la fisiopatogenia de la TB ya que altos niveles de estas citocinas resulta en daño del tejido pulmonar debido al desarrollo de necrosis, fibrosis y neumonía, entre otros. Por otro lado, algunas quimiocinas como CCL4 y CCL5 pueden tener un papel dual durante el curso de la infección con *M.tb*, su función biológica es reclutar células inflamatorias hasta el sitio de infección y participa en la formación del granuloma [51], sin embargo; la expresión sostenida de CCL4 y CCL5 da lugar al establecimiento de inflamación crónica [51-53]. Por esto, es importante conocer como se está regulando la expresión de CCL4 y CCL5 durante la TB progresiva.

Entre los muchos factores de transcripción que se encuentran activos durante la TB, YY1 muestra una serie de características que lo posicionan como un factor clave en la progresión de la TB. Diversos estudios han demostrado que el factor de transcripción YY1 está involucrado en la fisiopatogénesis de algunas enfermedades pulmonares como son la fibrosis idiopática (FI) y el asma [35, 37], en ambos casos; altos niveles de expresión de YY1 correlacionan directamente con el desarrollo y grado de severidad de estas enfermedades. Por otro lado, se sabe que YY1 regula preferentemente la expresión de citocinas de tipo Th2 [41, 42], este aspecto es muy relevante dado que la inducción de una respuesta Th2 conlleva a la progresión de la TB. Adicionalmente, YY1 tiene la capacidad de activar la transcripción de IL-4, IL-10 y TGF- β [35, 37, 38, 41, 54] que se relacionan con la progresión de la TB, así como algunas quimiocinas como CXCL12 [38] y algunos receptores de quimiocinas como CXCR4 [55].

A pesar de estas evidencias, el papel de YY1 en la TB progresiva no se ha estudiado anteriormente. Por lo anterior, nuestro primer objetivo en este trabajo fue demostrar si YY1 regula transcripcionalmente a las quimiocinas CCL4 y CCL5, para esto; realizamos ensayos con plásmidos reporteros, CHIP y RNAs de interferencia.

Para la quimiocina CCL4 evaluamos la actividad de la región promotora con y sin los sitios de unión para YY1 (ubicados a -950 y -260 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción), encontramos que al eliminar cada sitio de manera individual o ambos sitios al mismo tiempo, la actividad del promotor disminuye significativamente indicando que YY1 regula la transcripción de CCL4. Es importante mencionar que la delección de los sitios para YY1 no inhibe totalmente la actividad de dicho promotor, lo que muestra que otros factores de transcripción como NF- κ B [56] o ICER [27] pueden inducir la transcripción de esta quimiocina además de YY1, sin embargo; el efecto tan dramático observado en la actividad del promotor de CCL4 cuando no existen los sitios de unión para YY1, sugiere que este factor es muy importante para la expresión de la quimiocina. Por otro lado, para la quimiocina CCL5 se encontraron 4 sitios de unión para YY1 (ubicados a -1030, -840, -480 y -280 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción), cuando evaluamos el efecto de la delección de estos sitios en la actividad del promotor de CCL5, encontramos al eliminar cada sitio la actividad del promotor disminuye de manera general y esta disminución es estadísticamente significativa excepto en el sitio -280. Al igual que para CCL4, otros factores de transcripción pueden regular la transcripción de CCL5 de manera adicional a YY1, uno de ellos podría ser KLF13 [33].

Con el objetivo de conocer si YY1 se une a los sitios determinados hipotéticamente en el promotor de CCL4 para activar su transcripción, realizamos ensayos de CHIP. Los resultados muestran que YY1 tienen la capacidad de unirse directamente al promotor de CCL4 en ambos sitios para regular su expresión. En el caso de la quimiocina CCL5, hasta el momento se ha evaluado mediante CHIP el sitio -490 y encontramos que YY1 se puede unir de manera directa a este promotor al menos en este sitio, aún queda por analizar los tres sitios restantes. Estos datos son importantes, ya que se sabe que YY1

puede activar la expresión de sus genes blanco, de manera directa o actuando como cofactor con otros factores de transcripción [34]. Para corroborar la importancia que tiene YY1 es importante en la expresión de CCL4 y CCL5, inhibimos la expresión de YY1 en células PC3 con un RNA de interferencia pequeño (siRNA) específico para este factor de transcripción, los datos obtenidos por western blot muestran que la inhibición de YY1 conlleva a una disminución significativa de CCL4 y CCL5.

Una vez demostrado que YY1 regula de manera directa la transcripción de CCL4 y CCL5, evaluamos la expresión de las proteínas de interés en un modelo murino de TB pulmonar progresiva. En este modelo se presentan dos etapas muy bien caracterizadas que son muy similares a lo que sucede en la TB humana. Durante la etapa temprana se genera un perfil de citocinas de tipo Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-12 entre otros), la cantidad de bacterias en los pulmones de los ratones infectados se mantiene baja y en consecuencia se confiere un cierto grado de protección. Sin embargo, debido al fondo genético de los animales de experimentación, a partir del día 28 se da lugar a la etapa progresiva donde el perfil de citocinas predominante es de tipo Th2; la carga bacilar incrementa significativamente en los pulmones y se genera daño tisular como necrosis, neumonía y fibrosis, que en conjunto conllevan a la muerte del individuo [44].

De manera muy interesante encontramos que YY1 se induce tras la infección con *M.tb* y que su expresión es mayor durante la etapa progresiva de la TB experimental, además de manera relevante durante la etapa progresiva, la expresión de YY1 es primordialmente nuclear; esto es muy importante dado que YY1 al ser un factor de transcripción debe traslocar a núcleo para regular sus genes blanco (lo que se traduce en actividad del factor de transcripción). Por lo tanto nuestros resultados sugieren que YY1 se encuentra sobre-expresado y activo durante la etapa progresiva de la enfermedad.

Por otro lado, al evaluar la expresión de CCL4 encontramos que durante la etapa temprana presenta elevados niveles de expresión (D3 y D14) a diferencia de YY1 que muestra una cinética de expresión muy bien definida, sugiriendo que existen otros factores de transcripción que regulan preferentemente su expresión durante los primeros

21 días del modelo murino, como por ejemplo NF- κ B. A pesar de que CCL4 se expresa en niveles incrementados durante la etapa temprana, durante la etapa progresiva alcanza sus niveles más altos de expresión, al día 60 la expresión de la quimiocina presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás días en la etapa temprana a excepción de día 3.

Respecto a CCL5, su expresión se induce tras la infección con M.tb y se mantiene con niveles elevados desde la etapa temprana y hasta la etapa progresiva; los días 1 y 7 presentan la menor expresión con respecto a los demás días en la cinética y de manera interesante, los niveles mas altos de esta quimiocina también se dan al día 60 (etapa progresiva) en el modelo murino.

Como se esperaba, YY1, CCL4 y CCL5 están incrementados durante la etapa progresiva de la TB pulmonar experimental. Para conocer si YY1 puede estar implicado en la inducción de estas quimiocinas *in vivo*, realizamos un ensayo de correlación de Pearson; los resultados muestran que la expresión de YY1 correlaciona de manera directa y positiva con los niveles de CCL4 y CCL5 durante la tuberculosis experimental. Estos datos sugieren fuertemente que YY1 podría tener una implicación importante en la progresión de la enfermedad mediante la inducción de estas quimiocinas.

Finalmente, era necesario evaluar si los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* eran consistentes con lo que sucede con los pacientes con TB progresiva, para ello evaluamos la expresión de YY1 y CCL4 en un microarreglo de tejidos que incluye 44 muestras *post mortem* de tejido pulmonar obtenido de pacientes que en algún momento de su vida fueron diagnosticados con TB. Como grupo control se incluyeron 25 muestras *post mortem* de pacientes que fallecieron por causas distintas a enfermedades pulmonares y que al análisis en microscopio no reflejaban alteraciones histológicas en el pulmón. La identificación de las proteínas se hizo por IHQ y el análisis de expresión se realizó por patología digital, es importante destacar que las tecnologías de microarreglo de tejidos y patología digital son en conjunto herramientas muy poderosas que

disminuyen el error inter-ensayo y de análisis y que incrementan la sensibilidad y precisión, generando datos mas consistentes.

Resulta importante señalar que todos las muestras de pacientes con TB fueron positivas para la tinción Zielh-Neelsen y que en todos los casos estos pacientes mostraban alteraciones histológicas en pulmón como fibrosis, necrosis, áreas extensivas neumónicas, cavitación, diseminación a otros órganos, entre otros; característicos de la TB, todo lo anterior para asegurar que la enfermedad se encontraba en etapa progresiva.

Consistente con los resultados obtenidos *in vivo*, encontramos que los niveles de YY1 y CCL4 se encuentran incrementados en los pacientes con TB pulmonar con respecto al grupo control, en ambos casos el incremento fue estadísticamente significativo lo que demuestra que la expresión alta tanto de YY1 como de CCL4 se relacionan con la enfermedad. Entre los hallazgos más relevantes encontramos que durante la etapa progresiva, la expresión de YY1 es predominantemente nuclear, esto habla que durante el curso de la TB progresiva este factor de transcripción incrementa su actividad y por lo tanto una mayor inducción de sus genes blanco. También analizamos si existía una correlación entre la expresión nuclear de YY1 y la inducción de altos niveles de CCL4 durante la TB en humanos, encontrando de manera muy importante una correlación directa y positiva entre YY1 y CCL4. Estos datos sugieren fuertemente que YY1 puede estar regulando la expresión de CCL4 en pacientes con TB progresiva y que muy posiblemente la relación YY1-CCL4 puede ser un factor muy importante para la progresión de la enfermedad. Aún queda pendiente analizar la correlación existente entre YY1 y CCL5 durante la TB en humanos.

Los resultados anteriores muestran que YY1 se induce tras la infección con *M.tb*, sin embargo; no existen estudios que demuestren este hecho. Con base en esto, evaluamos si los niveles de YY1 están en función de la cantidad de antígenos encontrados en el tejido pulmonar de pacientes con TB progresiva, los datos obtenidos muestran que existe una correlación directa y positiva entre los elevados niveles de antígenos de *M.tb* y la inducción niveles alto de YY1. Estos datos son consistentes con un estudio realizado por

Seimon en el 2010, en donde encontró que YY1 (entre otros genes) se expresa en macrófagos de ratones y de humanos infectados con *M.tb* [43]. En este estudio se analizaron los genes que se activan en macrófagos infectados con *M.tb* y que entran en apoptosis por la activación de la vía de estrés del retículo endoplásmico a causa de la infección. Empleando microarreglos de RNA, Seimon determinó aquellos genes que se expresan importantemente en macrófagos durante la TB progresiva en humanos, los resultados muestran que YY1 es uno de los mas importantes durante la infección.

Con el propósito de consolidar la relevancia que tiene YY1 durante la TB progresiva, evaluamos la expresión de TGF- β en el MAT. Como se mencionó en el transcurso del trabajo, la importancia de TGF- β en la progresión de la enfermedad está muy bien estudiada; es el responsable directo de la generación de fibrosis que es un uno de los principales problemas durante la TB progresiva y es considerado un marcador de daño [45, 46, 57]. Además TGF- β así como la co-expresión de sus receptores (TGF-R1 and RII) actúan como moduladores negativos de la respuesta inmune en contra de antígenos de la *M.Tb*, lo cual resulta en una mayor replicación bacteriana y por tanto progresión de la enfermedad [58]. Por otro lado, de manera importante se ha descrito que YY1 puede regular la transcripción de esta citocina [35, 37]. En asma por ejemplo, polimorfismos existentes en el promotor de TGF- β inducen una mayor afinidad de YY1 por su sitio de unión, por lo que YY1 induce una mayor expresión de esta citocina y esto se relaciona directamente con la severidad de las crisis asmáticas [36]. Otra enfermedad que es de mucha relevancia es la Fibrosis idiopática, esta enfermedad no tiene cura y tras el diagnóstico los pacientes tienen una sobrevida no mayor a los 3 años, en este caso se sabe que YY1 regula directamente la transcripción de colágeno y también de TGF- β , asociándose directamente con el desarrollo de la enfermedad [35]. Teniendo en cuenta que YY1 regula transcripcionalmente a TGF- β y que la relación YY1-TGF- β está estrechamente relacionada con el desarrollo de enfermedades pulmonares, nos dimos a la tarea de evaluar específicamente si existe una correlación ente la expresión de YY1 y los elevados niveles de TGF- β en la TB progresiva.

Al analizar la expresión de TGF- β encontramos que los pacientes con TB muestran niveles significativamente incrementados con respecto al grupo control y mediante un análisis de Pearson encontramos que la expresión nuclear de YY1 correlaciona con la inducción de TGF- β durante la TB progresiva. Estos datos en conjunto, sugieren fuertemente la importancia que tiene YY1 en la fisiopatogenia de la TB.

11. CONCLUSIÓN.

En conclusión, nuestros resultados en conjunto muestran por primera vez que YY1 regula transcripcionalmente a las quimiocinas CCL4 y CCL5. Los datos obtenidos en el modelo murino de tuberculosis progresiva y en el microarreglo de tejido pulmonar de pacientes con TB, sugieren fuertemente que YY1 puede funcionar como un inductor maestro de alguna citocinas implicadas en la progresión de la enfermedad, como se resume en la **Figura 10**.

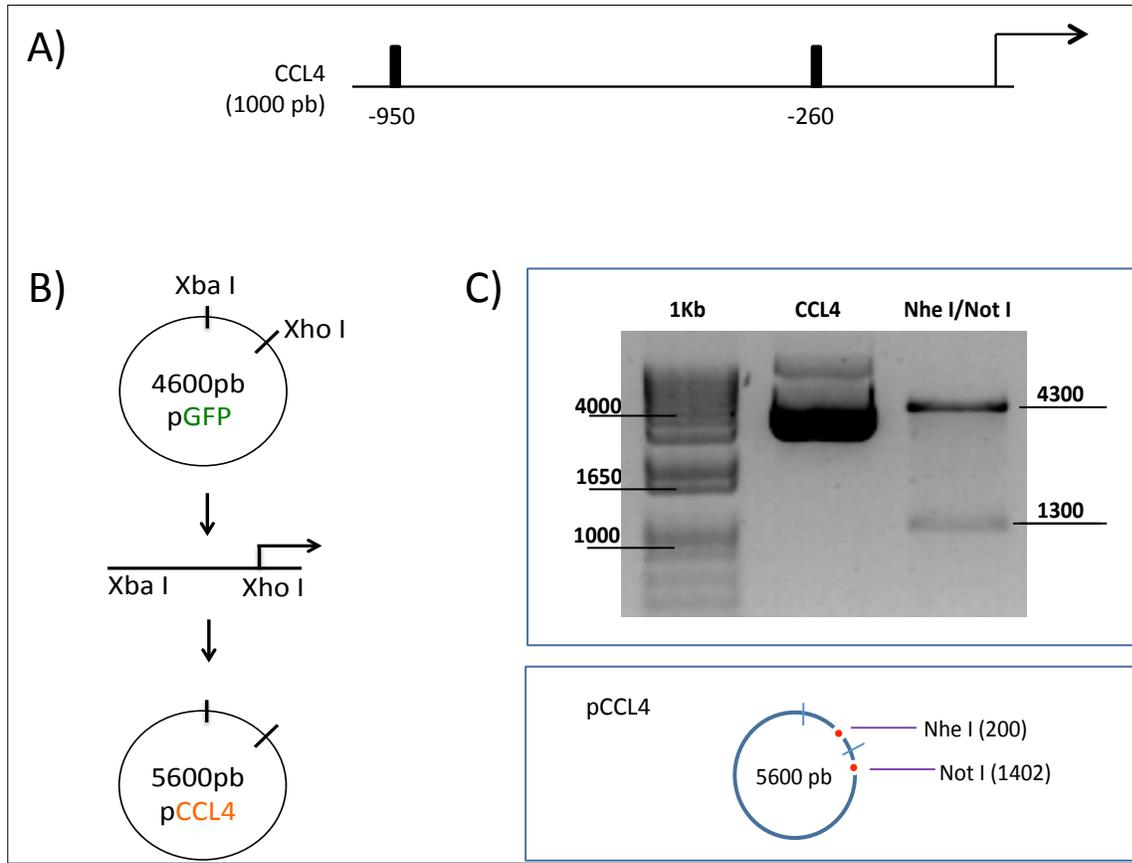
Sabemos que para consolidar el papel de YY1 en la TB progresiva, es necesario realizar ensayos de inhibición de YY1 en el modelo murino; esperamos que al disminuir la actividad de este factor de transcripción durante la etapa progresiva, disminuya la expresión de sus genes blanco como IL-4, TGF- β , IL-10, CCL4 y CCL5 y en consecuencia disminuya la severidad de la enfermedad. La inhibición de la expresión de YY1 se llevará a cabo mediante un lentivirus que exprese el RNA de interferencia para la proteína de interés.

Como perspectivas del proyecto se plantea realizar la construcción del lentivirus que exprese el siRNA contra YY1 y probarlo en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

A futuro, YY1 podría ser un marcador pronóstico o blanco terapéutico en pacientes con TB progresiva.

12. FIGURAS

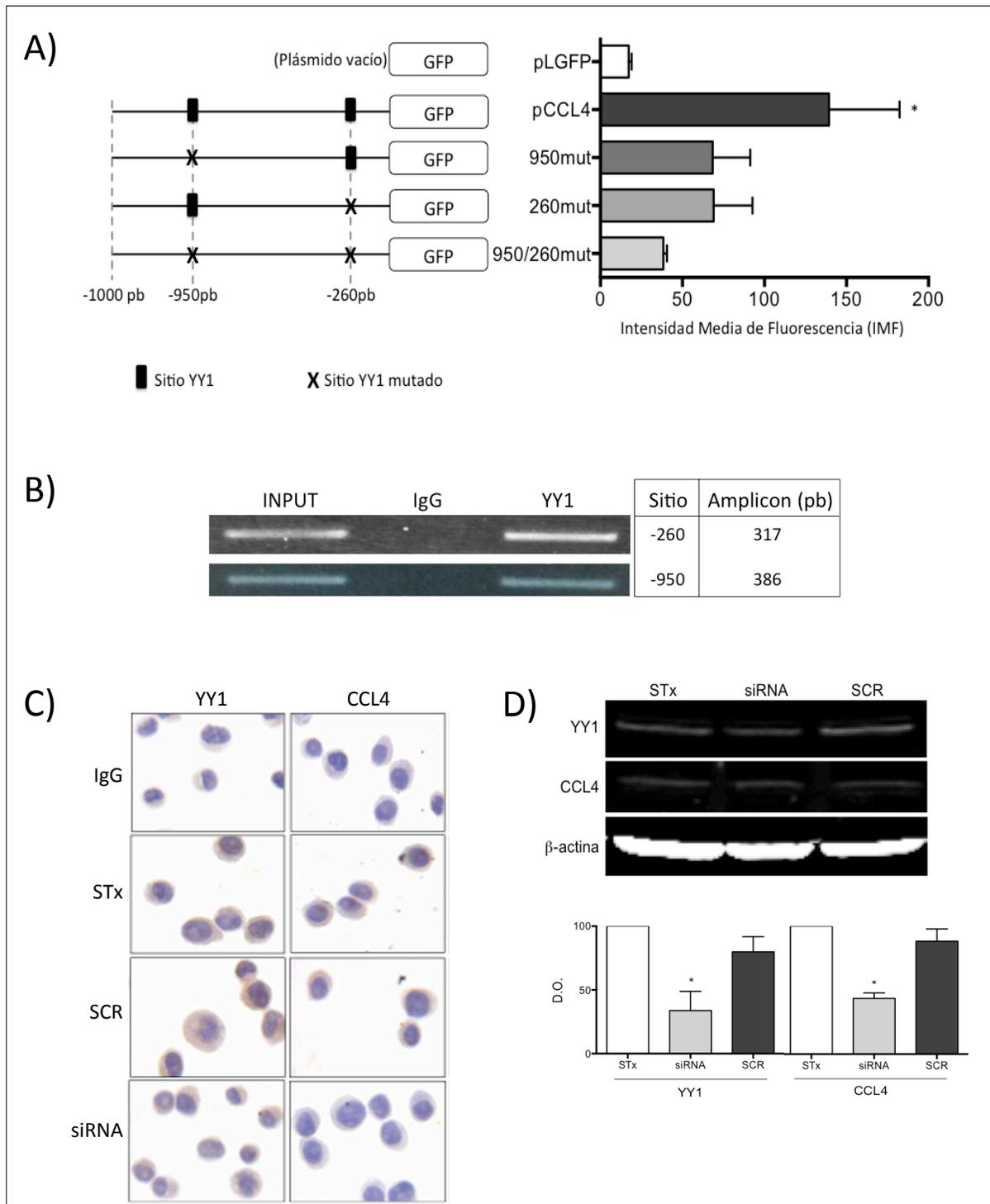
Figura 1.



Estrategia de clonación del promotor de CCL4. A) Mediante análisis de TESS se encontraron dos sitios hipotéticos de unión para el factor de transcripción YY1 ubicados a -950 y -260 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. B) Esquema general para la construcción pCCL4, el promotor de CCL4 conformado de 1000pb se clonó en el plásmido reportero pLGFp que codifica para la proteína verde fluorescente con un tamaño de 4600 pb, al insertar el fragmento de 1000pb de bases correspondiente al promotor de CCL4 se obtuvo la construcción pCCL4 con un tamaño de 5600pb. C) La comprobación de la clonación se hizo mediante ensayos de restricción con las enzimas Nhe I y Not I, que se encuentran en la región promotora de CCL4 y en el plásmido

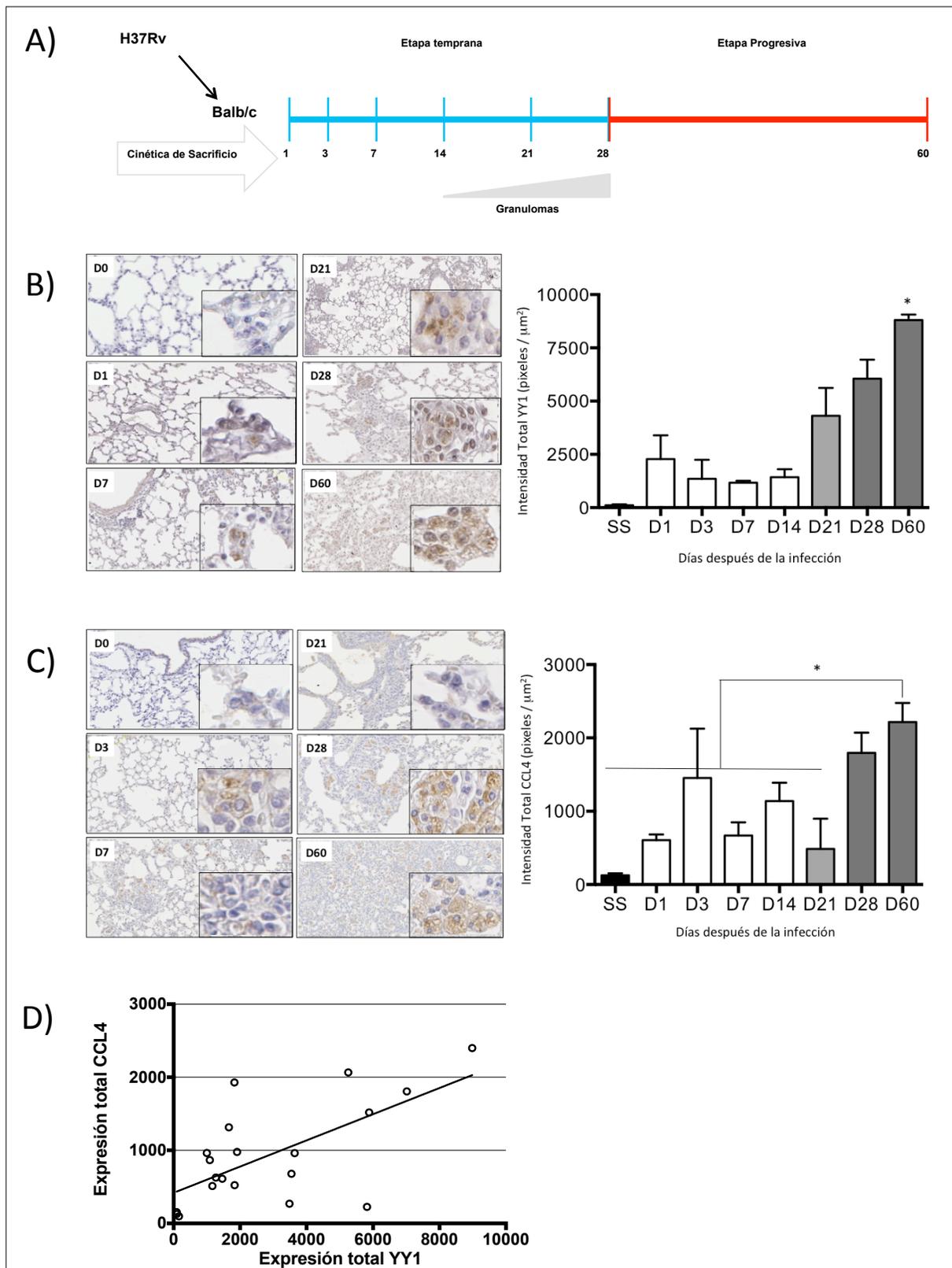
respectivamente; obteniendo un fragmento de aproximadamente 1300 pb. La construcción fue validada por secuenciación.

Figura 2.



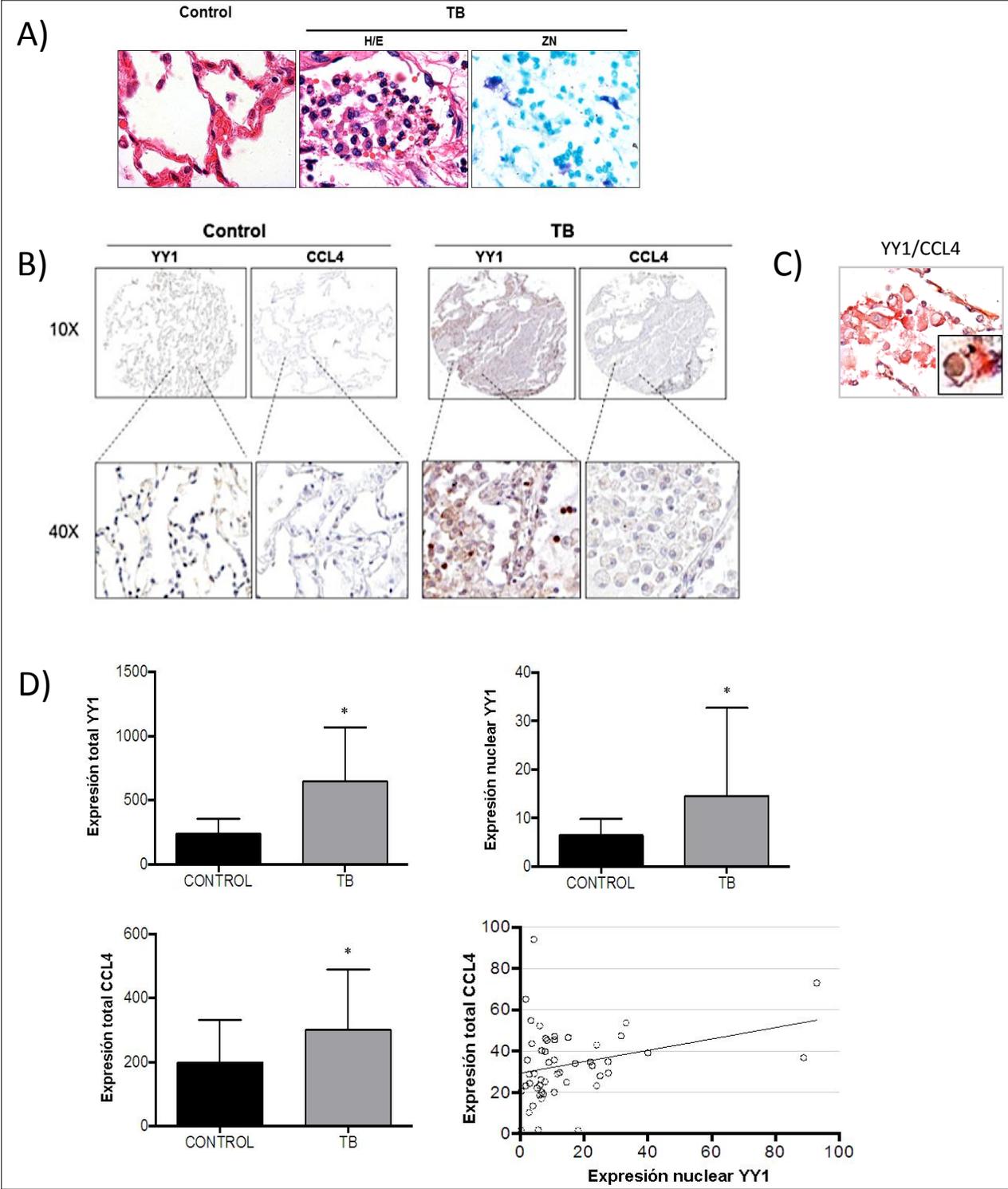
YY1 regula transcripcionalmente a CCL4. (A) Células PC3 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido vacío (pLGFP), el promotor completo (pCCL4), las mutantes sencillas (950mut y 260 mut) o la doble mutante (950/260mut). La actividad del promotor de CCL4 disminuye tras la delección individual de los sitios YY1 y este efecto fue mas dramático con la doble mutante ($p = 0.0035$). Los datos se muestran con desviación estándar de por lo menos tres experimentos independientes. (B) Se inmunoprecipitó cromatina de células PC3 utilizando un anticuerpo específico para YY1 o un anticuerpo anti-IgG de conejo (control negativo). Como control positivo se utilizó cromatina completa (INPUT). Empleando oligonucleótidos específicos se amplificaron las regiones ubicadas a -950 y -260 pb en el promotor de CCL4. La fotografía muestra que YY1 se puede unir de manera directa en ambas regiones para activar la transcripción de CCL4. (C) Mediante ICQ se evaluó el efecto de la inhibición de YY1 mediante un siRNA específico para el factor de transcripción. En color café se muestra la tinción específica para las proteínas de interés. (D) La cuantificación de YY1 y CCL4 en el ensayo de interferencia se hizo mediante western blot, se observa una disminución en la expresión de esta YY1 ($p = 0.0009$). Como consecuencia de la disminución en la expresión de YY1, la expresión de CCL4 también disminuye de manera significativa ($p = 0.0005$).

Figura 3.



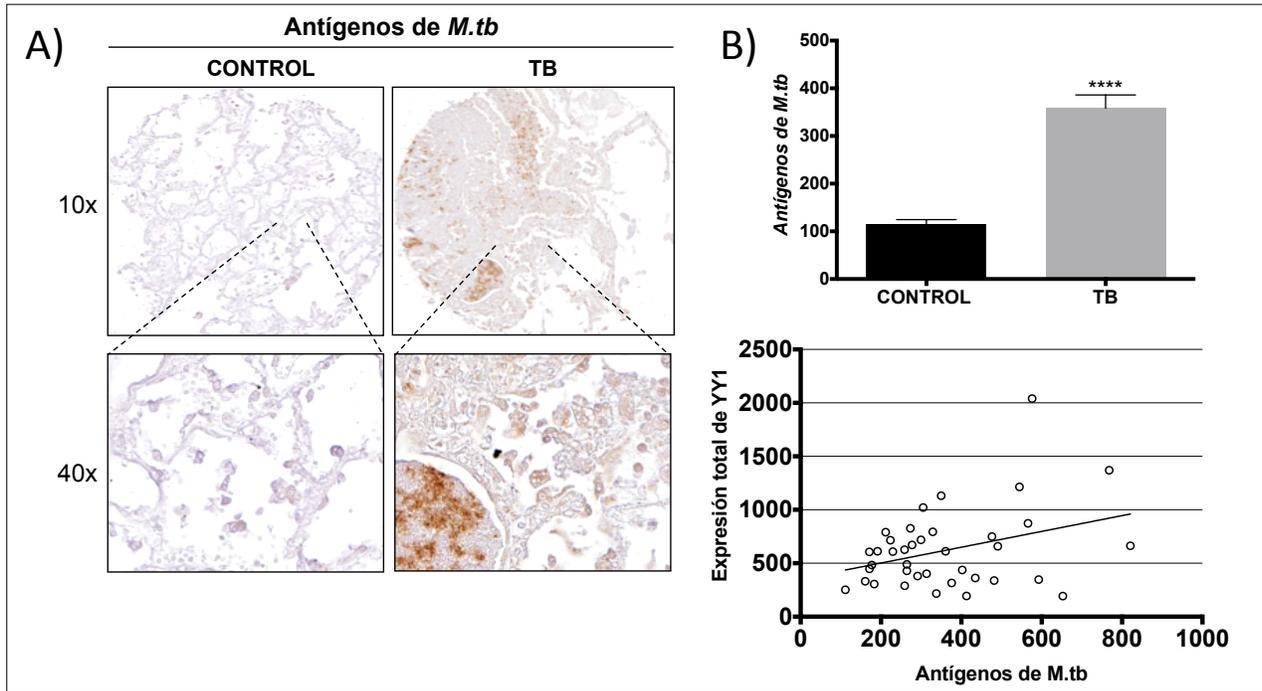
La expresión de YY1 y CCL4 se induce tras la infección con *M.tb* y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB experimental. (A) Esquema del modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva. Mediante IHQ se determinó la expresión de YY1 (B) y CCL4 (C). En el panel izquierdo de las figuras A y B se muestran microfotografías representativas del cambio morfológico que sufre el pulmón a lo largo del modelo murino; en color café se observa la tinción específica para proteína. En el panel derecho de las figuras A y B se muestra la cuantificación de cada proteína por patología digital. El máximo nivel de expresión de YY1 se da durante al D60 ($p < 0.0001$), la expresión de CCL4 es significativa mas alta con respecto a la mayoría de los días de la etapa temprana excepto con el día 3 ($p < 0.0001$). D) El análisis de correlación de Pearson indica que la expresión de CCL4 correlaciona de manera positiva con la expresión total de YY1 durante la etapa progresiva del modelo murino de TB ($r = 0.7903$, $p = 0.0196$).

Figura 4.



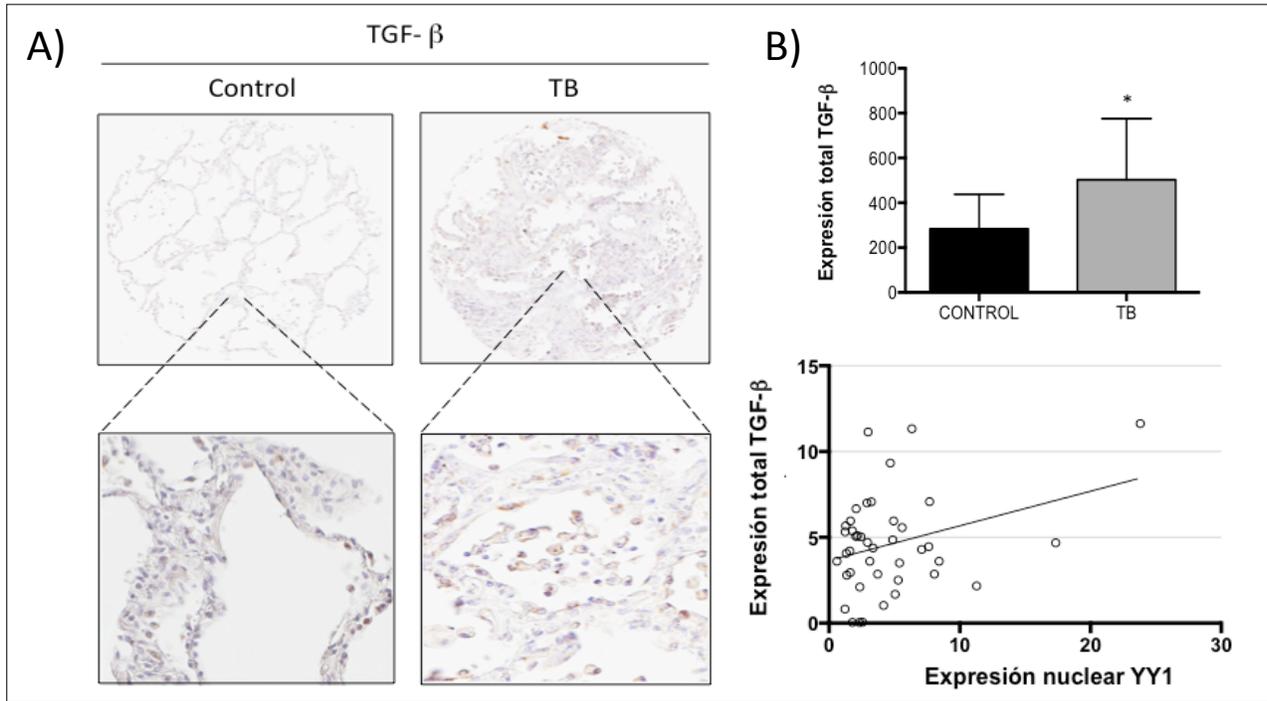
Los pacientes con TB expresan niveles incrementados de YY1 y CCL4. (A) Se muestran microfotografías representativas (40X) de tejido pulmonar de pacientes con TB y tejido pulmonar normal (control) con tinción de Hematoxilina y Eosina, todas las muestras incluidas en este estudio fueron positivas para la tinción Zielh Neelsen. (B) Mediante IHQ se analizó la expresión de las proteínas de interés, en color café se observa la tinción específica de cada proteína. Los pacientes con TB expresan niveles más altos de YY1 y CCL4 con respecto a los pacientes control. (C) Se muestra una doble tinción para YY1 (rojo) y CCL4 (café) en tejido pulmonar de pacientes con TB. (D) Se muestra la cuantificación de la expresión total ($p < 0.0001$) y nuclear ($p = 0.0085$) de YY1, también se muestra la cuantificación de CCL4 ($p = 0.0037$); en todos los casos la expresión de la proteínas de interés es mayor en los pacientes con TB respecto al grupo control. Mediante análisis de Pearson se encontró que existe una correlación positiva entre la expresión de YY1 y la inducción de CCL4 ($r = 0.2917, p = 0.0399$).

Figura 5.



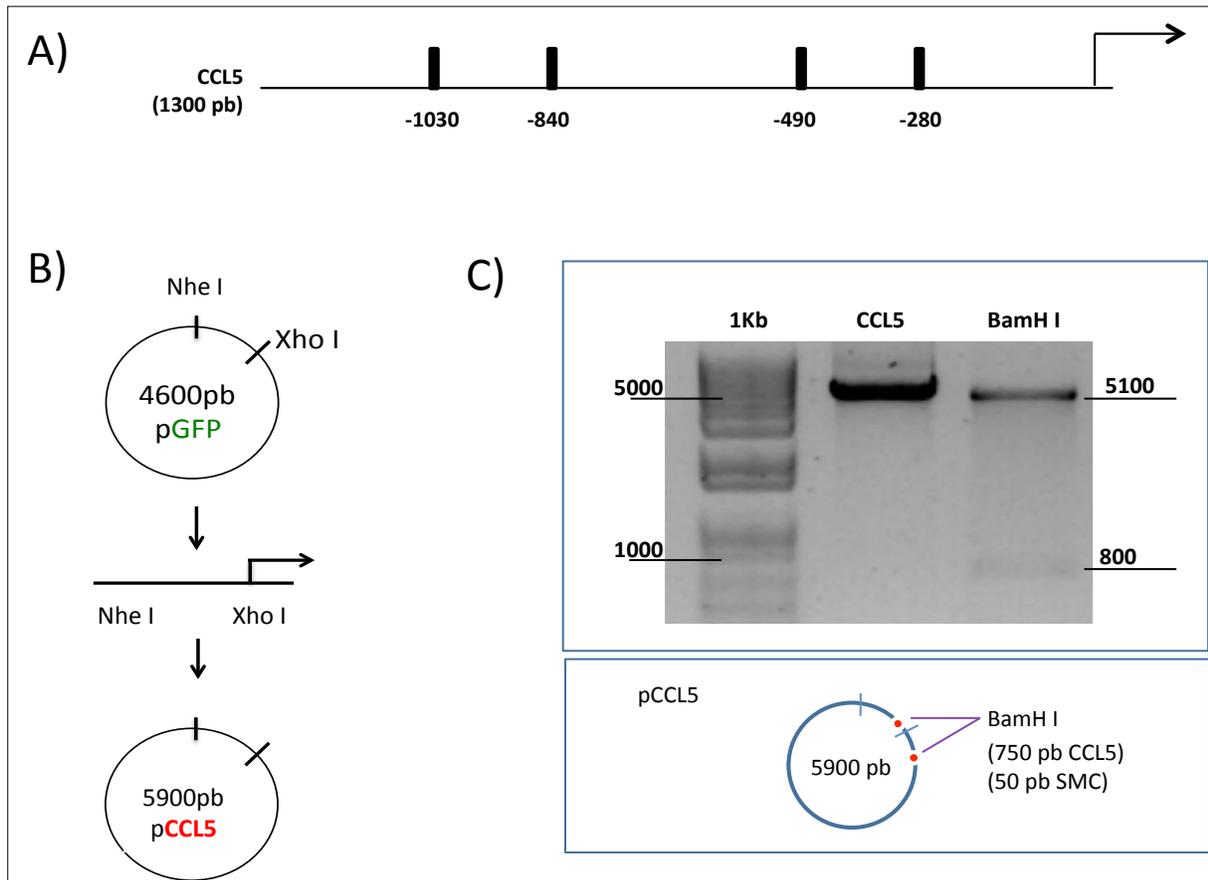
La inducción de YY1 durante la TB progresiva en humanos, correlaciona con la carga de antígenos de *M.tb*. A) Mediante IHQ se analizó la expresión de antígenos de *M.tb* en el MAT. En las microfotografías representativas se muestra en color café la tinción específica para los antígenos de la micobacteria en tejido pulmonar infectado con *M.tb* y en el grupo control. (B) Se muestra la cuantificación de los antígenos de *M.tb* donde se observa que el grupo TB expresa niveles elevados con respecto al grupo control ($p = 0.0001$), mediante un análisis de Pearson se muestra la correlación positiva entre la cantidad de antígenos y la expresión de YY1 ($r = 0.3427$, $p = 0.0352$).

Figura 6.



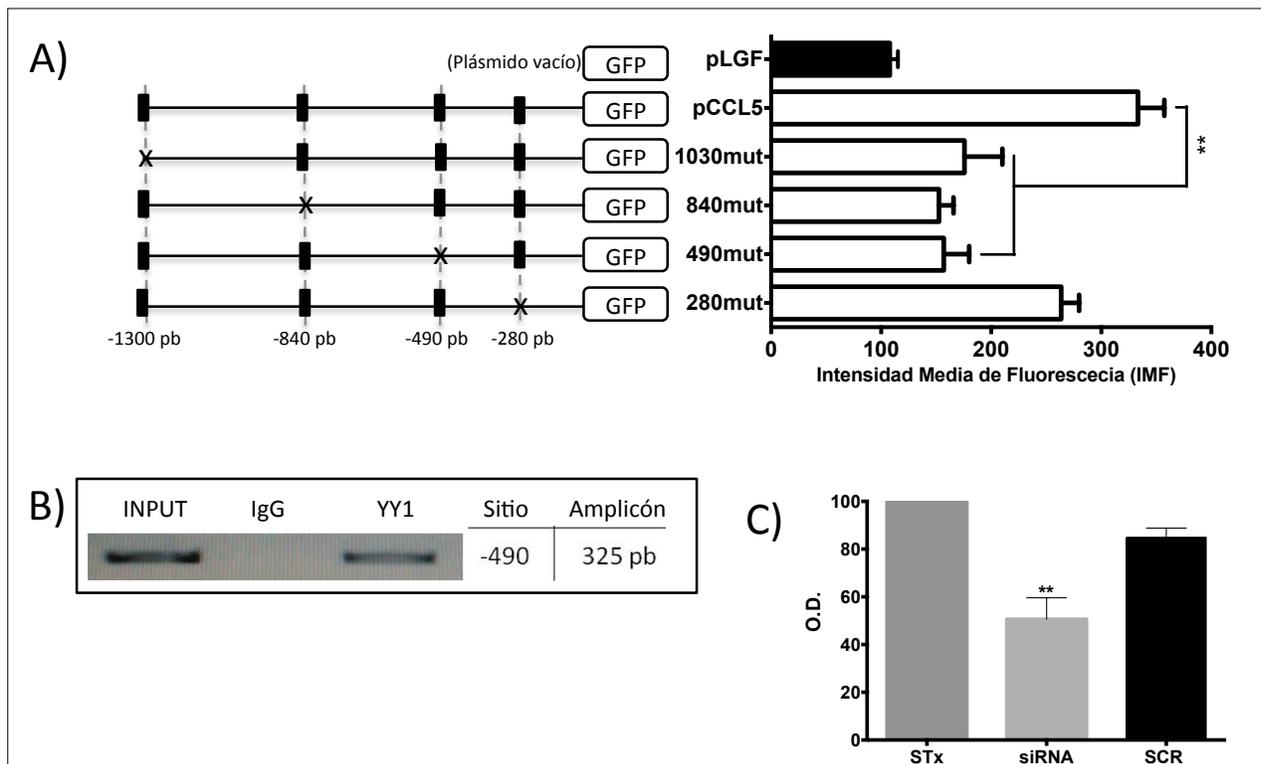
La elevada expresión de TGF-β correlaciona con la expresión de YY1 en la TB progresiva en humanos. A) Mediante IHQ se analizó la expresión de TGF-β en el MAT de TB humana. En las microfotografías representativas se puede observar en color café la tinción específica para la citocina de interés en una sección completa de tejido del grupo control y tejido infectado con *M.tb*, en la magnificación (40x) se observa que en los pacientes con TB los macrófagos son los mayores productores de esta citocina. B) Se muestra la cuantificación de la expresión de TGF-β donde se observa que el grupo TB expresa niveles altos de la citocina con respecto al grupo control ($p = 0.0001$), mediante un análisis de Pearson se muestra la correlación positiva entre la expresión nuclear de YY1 y la expresión de TGF-β ($r = 0.3142$, $p = 0.0427$).

Figura 7.



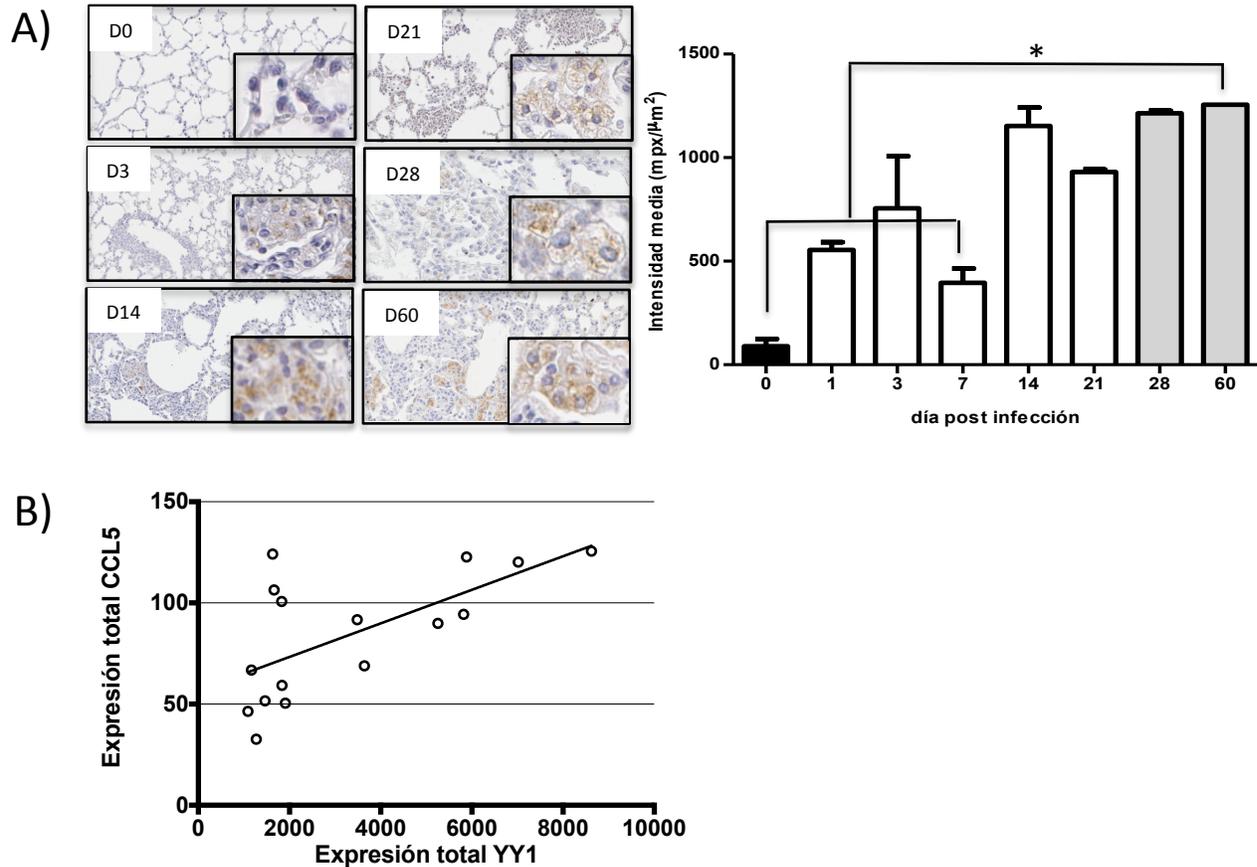
Estrategia de clonación del promotor de CCL5. (A) Mediante análisis de TESS se encontraron dos sitios hipotéticos de unión para el factor de transcripción YY1 ubicados a -1030, -840, -490 y -280 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. (B) Esquema general para la construcción pCCL5, el promotor de CCL5 (1300 pb) se clonó en el plásmido reportero pLGFV que codifica para la proteína verde fluorescente con un tamaño de 4600 pb, al insertar el fragmento de 1300pb se obtuvo la construcción pCCL5 con un tamaño de 5900pb. (C) La comprobación de la clonación se hizo mediante ensayos de restricción con la enzima BamH I, que tiene un sitio consenso en el promotor de CCL5 y otro sitio en el sitio de multiclonación del plásmido; obteniendo un fragmento de aproximadamente 800 pb. La construcción fue validada por secuenciación.

Figura 8.



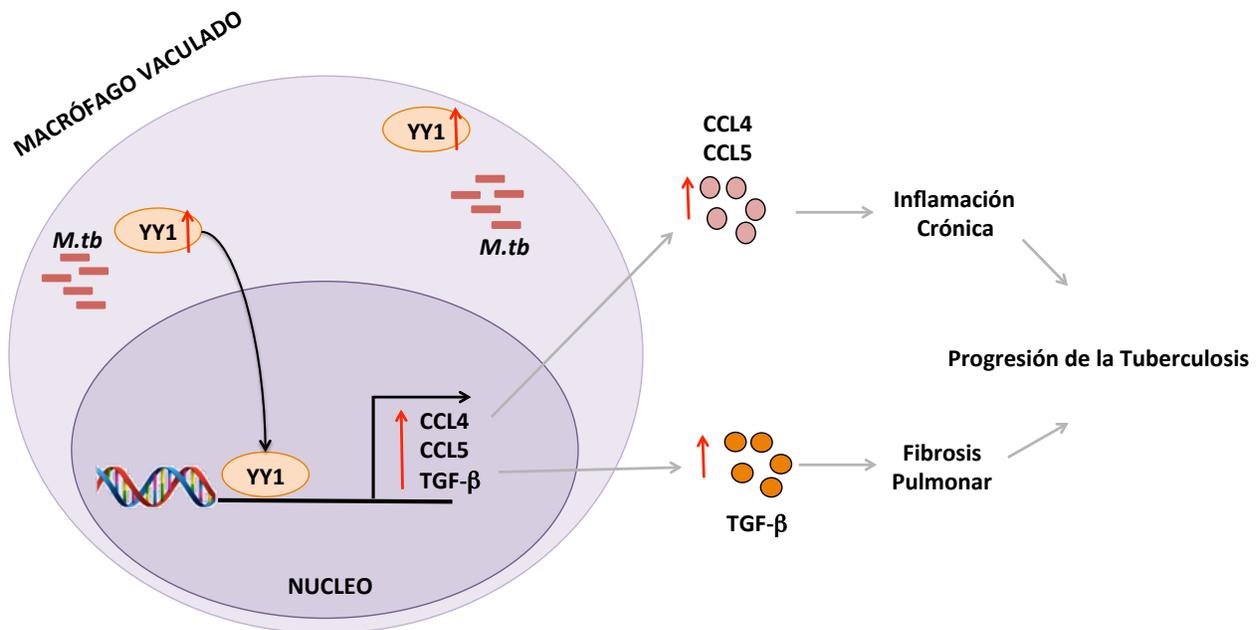
YY1 regula transcripcionalmente a CCL5. (A) Células PC3 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido vacío (pLGF), el promotor completo (pCCL5) y con las mutantes (1030mut, 840mut, 490mut y 280mut). La actividad del promotor de CCL5 disminuye tras la delección individual de los sitios ($p = 0.0025$). Los datos se muestran con desviación estándar de por lo menos tres experimentos independientes. (B) Se inmunoprecipitó cromatina de células PC3 utilizando un anticuerpo específico para YY1 o un anticuerpo anti-IgG de conejo (control negativo). Como control positivo se utilizó cromatina completa (INPUT). Empleando oligonucleótidos específicos se amplificó la región ubicada a -490 pb en el promotor de CCL5. La fotografía muestra que YY1 se puede unir de manera directa en ambas regiones para activar la transcripción de CCL5. (C) La cuantificación de CCL5 en el ensayo de interferencia se hizo mediante western blot, se observa una disminución ($p = 0.0022$) en la expresión de la quimiocina como efecto de la inhibición de YY1.

Figura 9.



La expresión de CCL5 se induce tras la infección con *M.tb* y presenta su máximo nivel durante la etapa progresiva de la TB experimental. (A) Mediante IHQ se determinó la expresión de CCL5. En el panel izquierdo se muestran microfotografías representativas del cambio morfológico que sufre el pulmón a lo largo del modelo murino; en color café se observa la tinción específica para la quimiocina. En el panel derecho se muestra la cuantificación de cada proteína por patología digital. El máximo nivel de expresión de CCL5 se identifica en el D60 ($p = 0.0039$). (B) La expresión de CCL5 correlaciona de manera positiva con la expresión total de YY1 durante la etapa progresiva del modelo murino de TB ($r = 0.6452$, $p = 0.0070$).

Figura 10.



Modelo propuesto de la implicación de YY1 en la fisiopatogenesis de la TB pulmonar vía inducción de CCL4, CCL5 y TGF- β . Los macrófagos vacuolados que contienen grandes cantidades de *M.tb* expresan altas cantidades de YY1 que además de acumularse en citoplasma, se encuentra activo durante la fase progresiva de la enfermedad. Al trasladar al núcleo da lugar a la transcripción de sus genes blanco como son CCL4, CCL5 y TGF- β . Como resultado de la actividad descontrolada de YY1, se generan grandes concentraciones de CCL4, CCL5 y TGF- β que modifican el microambiente en el pulmón, contribuyendo al reclutamiento excesivo de células inflamatorias (inflamación crónica) y a la generación de fibrosis pulmonar respectivamente. Estas alteraciones histológicas contribuyen importantemente al establecimiento y gravedad de la tuberculosis progresiva.

13. REFERENCIAS.

1. WHO *Global Tuberculosis Report 2013*. 2013.
2. Dorhoi, A. and S.H. Kaufmann, *Perspectives on host adaptation in response to Mycobacterium tuberculosis: modulation of inflammation*. Semin Immunol, 2014. **26**(6): p. 533-42.
3. Etna, M.P., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis*. Semin Immunol, 2014. **26**(6): p. 543-51.
4. Wallis, R.S., *Mycobacterial disease attributable to tumor necrosis factor-alpha blockers*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(12): p. 1603-5; author reply 1605-6.
5. Etna, M.P., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokines in TB: A two-edged sword in TB pathogenesis*. Semin Immunol, 2014. **26**(6): p. 543-551.
6. Giacomini, E., et al., *Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7033-41.
7. Silva Miranda, M., et al., *The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?* Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 139127.
8. Paul, W.E. and J. Zhu, *How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 225-35.
9. Bhattacharyya, S., et al., *Dichotomy of cytokine profiles in patients and high-risk healthy subjects exposed to tuberculosis*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5597-603.
10. Sharma, S. and M. Bose, *Role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis*. Asian Pac J Allergy Immunol, 2001. **19**(3): p. 213-9.
11. Harris, J., et al., *T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis*. Immunity, 2007. **27**(3): p. 505-17.
12. Dunlap, N.E. and D.E. Briles, *Immunology of tuberculosis*. Med Clin North Am, 1993. **77**(6): p. 1235-51.
13. Rook, G.A., et al., *IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design*. Trends Immunol, 2004. **25**(9): p. 483-8.
14. van Crevel, R., et al., *Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities*. J Infect Dis, 2000. **181**(3): p. 1194-7.
15. Sabat, R., *IL-10 family of cytokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 315-24.
16. O'Leary, S., M.P. O'Sullivan, and J. Keane, *IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(1): p. 172-80.
17. Pitt, J.M., et al., *Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guerin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN-gamma and IL-17 responses and increases protection to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2012. **189**(8): p. 4079-87.
18. Biancheri, P., et al., *The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013.

19. Massague, J., *TGF-beta signaling in development and disease*. FEBS Lett, 2012. **586**(14): p. 1833.
20. Toossi, Z. and J.J. Ellner, *The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **87**(2): p. 107-14.
21. Yoon, H.A. and S.K. Eo, *Differential polarization of immune responses by genetic cotransfer of chemokines changes the protective immunity of DNA vaccine against pseudorabies virus*. Immunology, 2007. **120**(2): p. 182-91.
22. Ashenafi, S., et al., *Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3*. Clin Immunol, 2014. **151**(2): p. 84-99.
23. Vesosky, B., et al., *CCL5 participates in early protection against Mycobacterium tuberculosis*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(6): p. 1153-65.
24. Ziegler, S.F., et al., *Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7*. J Immunol, 1991. **147**(7): p. 2234-9.
25. Ziegenhagen, M.W., et al., *Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis*. J Investig Med, 1998. **46**(5): p. 223-31.
26. Phalane, K.G., et al., *Differential expression of host biomarkers in saliva and serum samples from individuals with suspected pulmonary tuberculosis*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 981984.
27. Barabitskaja, O., et al., *Suppression of MIP-1beta transcription in human T cells is regulated by inducible cAMP early repressor (ICER)*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 378-87.
28. Appay, V. and S.L. Rowland-Jones, *RANTES: a versatile and controversial chemokine*. Trends Immunol, 2001. **22**(2): p. 83-7.
29. Levy, J.A., *The unexpected pleiotropic activities of RANTES*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 3945-6.
30. Chensue, S.W., et al., *Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 165-73.
31. Chu, S.F., et al., *Association between RANTES functional polymorphisms and tuberculosis in Hong Kong Chinese*. Genes Immun, 2007. **8**(6): p. 475-9.
32. Sanchez-Castanon, M., et al., *Polymorphisms in CCL5 promoter are associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain*. Int J Tuberc Lung Dis, 2009. **13**(4): p. 480-5.
33. Krensky, A.M. and Y.T. Ahn, *Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease*. Nat Clin Pract Nephrol, 2007. **3**(3): p. 164-70.
34. Gordon, S., et al., *Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology*. Oncogene, 2006. **25**(8): p. 1125-42.
35. Lin, X., et al., *Yin yang 1 is a novel regulator of pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(12): p. 1689-97.
36. Silverman, E.S., et al., *Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(2): p. 214-9.
37. Hobbs, K., et al., *Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1958-62.

38. Markovic, J., et al., *PARP-1 and YY1 are important novel regulators of CXCL12 gene transcription in rat pancreatic beta cells*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59679.
39. Lei, J., et al., *p38 MAPK-dependent and YY1-mediated chemokine receptors CCR5 and CXCR4 up-regulation in U937 cell line infected by Mycobacterium tuberculosis or Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(2): p. 610-5.
40. Guo, J., et al., *Yin-Yang 1 regulates effector cytokine gene expression and T(H)2 immune responses*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(1): p. 195-201, 201 e1-5.
41. Guo, J., et al., *Yin-Yang 1 activates interleukin-4 gene expression in T cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48871-8.
42. Hwang, S.S., et al., *Transcription factor YY1 is essential for regulation of the Th2 cytokine locus and for Th2 cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(1): p. 276-81.
43. Seimon, T.A., et al., *Induction of ER stress in macrophages of tuberculosis granulomas*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12772.
44. Hernandez-Pando, R., et al., *Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis*. Immunology, 1996. **89**(1): p. 26-33.
45. Sivangala, R., et al., *Association of cytokine gene polymorphisms in patients with tuberculosis and their household contacts*. Scand J Immunol, 2014. **79**(3): p. 197-205.
46. Toossi, Z., et al., *Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 465-73.
47. Hirsch, C.S., et al., *Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growth factor-beta 1*. J Infect Dis, 1994. **170**(5): p. 1229-37.
48. Shen, Y. and Z. Li, *[Transforming growth factor-beta immunogenic participating in tuberculous pathogenesis]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2000. **23**(3): p. 181-2.
49. WHO, *The Global Plan Tuberculosis to Stop TB, 2011-2015*. 2012.
50. Redford, P.S., et al., *Enhanced protection to Mycobacterium tuberculosis infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2200-10.
51. Sadek, M.I., et al., *Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(3): p. 513-21.
52. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(6): p. 455-81.
53. Civatte, M., et al., *Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005. **31**(1): p. 70-9.
54. Huerta-Yepez, S., et al., *Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1*. Nitric Oxide, 2009. **20**(1): p. 39-52.
55. Lee, B.C., et al., *Carboxyl-terminal Src kinase homologous kinase negatively regulates the chemokine receptor CXCR4 through YY1 and impairs CXCR4/CXCL12 (SDF-1alpha)-mediated breast cancer cell migration*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2840-5.

56. Zhang, Z., et al., *CCAAT/enhancer-binding protein beta and NF-kappaB mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1beta*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 33092-103.
57. Seiscento, M., et al., *Transforming growth factor beta-1 as a predictor of fibrosis in tuberculous pleurisy*. Respirology, 2007. **12**(5): p. 660-3.
58. Bonecini-Almeida, M.G., et al., *Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 2628-34.