

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de la expresión del factor de transcripción Yin-Yang-1 y su asociación con TGF- β en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar con diferentes grados de severidad

Evaluation of the expression of the transcription factor Yin-Yang-1: association with TGF- β in a lung allergic inflammation in a mouse model with different severity grades

Guadalupe Díaz-Elizondo, Arcadio Hernández-Mata, Daniel Hernández-Cueto, Guillermina J. Baay-Guzmán, Sara Huerta-Yépez

RESUMEN

Introducción. El asma alérgica es una de las enfermedades más prevalentes en la edad pediátrica. Los mecanismos implicados en este padecimiento no han sido esclarecidos totalmente. Se sabe que el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) juega un papel muy importante en la fisiopatología de esta enfermedad y que la activación del factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY1) induce un aumento en la expresión de esta citocina. El factor YY1 también regula la expresión de otras citocinas involucradas en el asma tales como la IL-4 y la IL-10. El objetivo de este trabajo fue evaluar la asociación entre YY1 y TGF- β en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar.

Métodos. Se trabajó con un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar con diferentes grados de severidad empleando ovalbúmina como alérgeno. Posteriormente se obtuvo el tejido pulmonar, que fue incluido en parafina, se construyó un microarreglo del tejido en un equipo semiautomático y, mediante inmunohistoquímica, se evaluó la expresión de YY1 y de TGF- β . La densidad de la expresión se midió de manera cuantitativa por métodos computarizados.

Resultados. Se observó inflamación alérgica pulmonar diferencial acorde con el grado de severidad del modelo; se observó el mismo patrón con la producción de moco. La expresión de ambas proteínas se correlacionó de manera directa con el grado de severidad de la inflamación alérgica pulmonar.

Conclusiones. Los resultados obtenidos corroboran el papel que juegan ambas proteínas en la fisiopatología de la inflamación alérgica pulmonar.

Palabras clave: inflamación alérgica pulmonar, Yin-Yang-1 (YY1), TGF- β , microarreglo

ABSTRACT

Background. Allergic asthma is one of the most prevalent childhood diseases. This disease is characterized by airway inflammation and remodelling. The mechanisms implicated in the pathogenesis of this disease remain unclear. Several studies have shown that TGF- β plays an important role in the pathogenesis of asthma. In addition, the polymorphism of the TGF- β promoter region results in the overexpression of TGF- β via regulation of the transcription factor Yin-Yang-1 (YY1). It has recently been demonstrated that YY1 may be involved in the pathogenesis of asthma by the regulation of IL-4 and IL-10. The aim of this study was to evaluate the association between the YY1 and TGF- β expression levels in a murine model of lung allergic inflammation.

Methods. In this study we used a lung allergic inflammatory murine model with different severity degrees. Tissue microarray technology and immunohistochemistry were used to evaluate YY1 and TGF- β expression. The density expression was measured by quantitative methods using specific software.

Results. Expression of both proteins correlated with the degrees of severity of lung allergic inflammation. A similar result was observed with mucus production.

Conclusions. These results corroborate the role of YY1 and TGF- β in the pathogenesis of this disease.

Key words: lung allergic inflammation, Yin-Yang-1, TGF- β , microarray.

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

Fecha de recepción: 08-09-10
Fecha de aceptación: 18-02-11

INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad compleja caracterizada, fisiológicamente, por una obstrucción variable del flujo aéreo y, patológicamente, por múltiples anomalías

de la vía aérea, en el epitelio, en la lámina propia y en la submucosa.¹ Es una enfermedad crónica muy frecuente en el ser humano que representa un grave problema de salud pública. Se estima que la prevalencia del asma en el mundo varía ampliamente: desde menos de 5% en la población de Grecia e Indonesia hasta más de 25% en Australia y Nueva Zelanda.² En México es una de las primeras diez causas de utilización de los servicios de salud, especialmente los de urgencias y de consulta externa.³

El asma es la enfermedad que más prevalece en la edad pediátrica; esta enfermedad representa una importante pérdida para los millones de pacientes que la sufren y también para el sistema de salud, tanto desde el punto de vista económico como de calidad de vida.¹ El asma se presenta en pacientes de cualquier sexo, edad o nivel socioeconómico, pero afecta mayormente a los niños con antecedentes de atopia.² La investigación biomédica ha facilitado avances importantes en el conocimiento de los mecanismos patogénicos del asma y ha dado lugar a avances terapéuticos que han tenido un impacto significativo en el manejo y control de la enfermedad.^{3,4} Sin embargo, el número de asmáticos continúa aumentando y no se ha eliminado la proporción entre la incidencia y la prevalencia del asma, que corresponde a una enfermedad grave y de difícil manejo.⁵

La etiología del asma es compleja y multifactorial. Están involucradas interacciones entre los factores genéticos y los estímulos ambientales. La mayoría de los datos acerca de la fisiopatología de esta enfermedad, específicamente del asma atípica, se refieren al desequilibrio entre el fenotipo Th-1 y el Th-2. La genética, el ambiente intrauterino, la dieta materna e infantil, las infecciones respiratorias, la ocupación y la exposición al ambiente, todo contribuye a que se pierda este delicado equilibrio.¹ La manera en la que todos estos factores convergen para determinar la reacción del sistema inmunitario de un sujeto determinado puede resultar como inflamación y remodelación de las vías aéreas.⁶⁻⁸ Los principales factores que favorecen un fenotipo Th-2 finalmente conducen a la atopia. La aplicación de la metodología basada en ARN y los métodos de detección de mediadores mejorados han proporcionado evidencia de que la sensibilización inicial y la subsiguiente expansión de las poblaciones de mastocitos y de eosinófilos resultan de la liberación de citocinas específicas codificadas en el cromosoma 5q, que son liberadas por linfocitos Th2 activados en el asma alérgica, no alérgica o intrínseca. Estas

citocinas incluyen a las interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y al factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF).⁷

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones sobre los factores de crecimiento fibrogénicos en el asma; en numerosos trabajos se ha encontrado aumentada la expresión del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), tanto en especímenes de biopsia bronquial como de lavado bronquioalveolar (BAL).⁹⁻¹¹ El TGF- β es expresado por las células aéreas epiteliales, los eosinófilos, los linfocitos Th2, los macrófagos, los fibroblastos y podría estar unido y almacenado en la matriz subepitelial extracelular de las vías aéreas.¹⁰ El TGF- β es importante en el desarrollo, el crecimiento, la transformación, la reparación de tejido, la fibrosis y la modulación de la respuesta inmune inflamatoria.¹¹ La expresión de TGF- β guarda una correlación con el grado de fibrosis subepitelial y se encuentra aumentada en los infiltrados eosinofílicos prominentes de los pacientes con asma severa o grave.¹² Sin embargo, en asma leve y con niveles bajos esta citocina podría jugar un papel protector por su capacidad de inhibir la producción de IgE y la proliferación de mastocitos.¹³ Estudios en modelos de murinos de asma han indicado que el TGF- β podría tener efectos antiinflamatorios y profibróticos.⁹

En el control de la actividad de TGF- β están involucrados múltiples mecanismos; un ejemplo importante son los mecanismos transcripcionales que son regulados por citocinas inflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, encontrados en las vías aéreas de individuos con asma. Se ha reportado que el polimorfismo presente en el promotor del TGF- β , C-509T, tiene un impacto en la expresión de esta citocina.

Yin-Yang-1 (YY1) es un factor de transcripción expresado ubicuamente con dedos de cinc que puede funcionar como activador o represor de la transcripción.¹⁴ La afinidad de YY1 en los pacientes con el alelo T en la posición 509 del promotor de TGF- β está incrementada cerca de 30% en comparación con los pacientes con el alelo C. En este estudio se sugiere que este polimorfismo es muy importante para la susceptibilidad al asma, pues los pacientes con el alelo T presentan un incremento en los niveles basales de TGF- β en las vías aéreas.¹⁵ Por otro lado, se ha descrito que YY1 juega un papel importante en la fisiopatología del asma, ya que ratones heterocigotos para el gen YY1 [yy1(+/-)]

presentan una disminución significativa de la inflamación alérgica pulmonar; esto es debido a la inhibición de las citocinas Th-2, como IL-4.¹⁶ Por lo anterior, es razonable suponer que cuando se encuentre una mayor expresión de YY1 la expresión de TGF- β se verá incrementada, por lo que la relación entre este factor de transcripción y esta citocina será directa y, a su vez, la alta expresión de ambas proteínas también se asociará de manera directa con grados más severos de asma. A la fecha no existe un estudio que demuestre la asociación entre la expresión del factor de transcripción YY1 y la expresión de TGF- β y si esta asociación puede contribuir en la fisiopatología del asma. Por lo anterior, este trabajo, donde se implementó la tecnología de microarreglos de tejidos y la tinción inmunohistoquímica en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar con diferentes grados de severidad, resulta novedoso para el análisis de esta asociación.

MÉTODOS

Modelos de inflamación alérgica pulmonar

Se utilizaron grupos de 6 ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad que se mantuvieron bajo condiciones estériles en cajas con filtro de 0.22 μ m, con acceso a alimento y agua y temperatura de 21 a 24°C hasta el momento en el que fueron sacrificados. El manejo de los animales se llevó a cabo siguiendo de manera estricta las normas del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El modelo de inflamación alérgica pulmonar ya ha sido descrito con anterioridad.^{17,18} Se utilizaron los siguientes esquemas de sensibilización y reto para cada uno de los modelos con diferente severidad:

- *Modelo 1. Inflamación alérgica pulmonar leve.* Los días 1 y 5 los ratones recibieron 100 μ L de una suspensión que contenía 10 μ g de ovalbúmina (OVA) en 1 mg de alum (Superfos, Denmark) por vía intraperitoneal. El día 12 recibieron OVA a 0.75% directamente en la tráquea. El día 16 se evaluó la respuesta alérgica inducida.
- *Modelo 2. Inflamación alérgica pulmonar moderada.* Los días 1 y 5 los ratones recibieron 100 μ L de una suspensión que contenía 10 μ g de OVA en 1 mg de alum por vía intraperitoneal. En los días 12 y 24 recibieron OVA a 0.75% directamente en la tráquea. El día 28 se evaluó la respuesta alérgica inducida.

- *Modelo 3. Inflamación alérgica pulmonar severa.* Los días 1 y 5 los ratones recibieron 100 μ L de una suspensión que contenía 10 μ g de OVA en 1 mg de alum por vía intraperitoneal. Los días 12, 22 y 32 recibieron OVA a 0.75% directamente en la tráquea. El día 36 se evaluó la respuesta alérgica inducida.
- *Controles.* Cada grupo control de seis ratones recibió sólo solución salina (SS) en lugar de OVA. Se realizó el mismo procedimiento que se describió en cada uno de los diferentes modelos.

Los ratones se sacrificaron en el día especificado para cada modelo. Primero se anestesiaron en la cámara de cloroformo; después se recolectó la sangre por incisión axilar y enseguida se sacrificaron para obtener los pulmones. Estos fueron perfundidos con etanol absoluto; cuando estuvieron listos, fueron colocados en tubos con 10 mL de etanol absoluto hasta el momento de la inclusión en parafina y el corte del tejido. Se observaron las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina (H/E) para puntear o marcar los sitios del tejido pulmonar donde se encontró inflamación perivascular o inflamación peribronquial, con la finalidad de construir el microarreglo de tejidos.

Microarreglo de tejidos

Para la construcción del arreglo de tejidos se procedió de acuerdo con lo reportado previamente.¹⁹ Después de identificar la región de interés (4 regiones por cada tejido de pulmón), es decir, una región que presentara exactamente la lesión que se pretendía analizar (con infiltrado inflamatorio a nivel perivascular o peribronquial), se procedió a la construcción del arreglo con el equipo Chemicon's Advanced Tissue Arrayer (ATA 100) semiautomático. Utilizando una aguja calibre 0.5 mm se marcaron los pozos de 3 mm de profundidad en un bloque de parafina de 2.5 $\times$ 2.5 cm "en blanco", delimitando una matriz de 5 $\times$ 5 elementos que se denominó bloque receptor. Una vez elaborada la matriz se extrajeron cilindros de tejido de cada una de las muestras impregnadas en parafina del bloque donador con una aguja de calibre 0.4 mm (como guía se utilizó el corte teñido con H/E). Cada uno de estos cilindros se implantó en el bloque receptor y, una vez completa la matriz de 168 tejidos, se rellenó con una pequeña cantidad de parafina líquida sobre el arreglo para igualar la altura de los cilindros. Posteriormente, el

arreglo se incubó a 60°C por 15 min para homogeneizar la parafina de los cilindros implantados con la del bloque receptor y eliminar los espacios entre los cilindros de las muestras y el bloque mismo. Finalmente, el arreglo se enfrió durante 5 min en hielo y se realizaron cortes de 4 µm con un microtomo rotatorio (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza).

Técnica de inmunohistoquímica

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre los experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un sólo tiempo en los diferentes microarreglos. Los cortes se montaron en laminillas especiales con pegamento (Instrumedics Inc. Richmond, IL. USA). Se mantuvieron en una estufa bacteriológica toda la noche para quitar la parafina de la siguiente manera: se procedió a hidratar la muestra con 3 baños en xilol de 8 min cada uno, 2 baños en etanol a 100%, un baño en etanol a 90%, un baño en etanol a 70% y un baño en agua destilada, cada uno de 5 min. Se realizó la recuperación del antígeno con citrato de sodio en ebullición por 20 min. Las laminillas se lavaron para eliminar el exceso de citrato. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno a 3% por 15 min, tres veces. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido incubándolo durante 4 h en suero normal de cerdo a 2%. Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-YY1 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. USA) y anti-TGFβ 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. USA). Después se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado [anti-rabbit IgG con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR) (DAKO, Carpinteria, CA, USA)]; por último, se produjo el color mediante la adición del substrato diamino benzidina (DAB) durante 3 min; la reacción se detuvo con agua de la llave y, para el contraste, fue teñida con hematoxilina por 10 seg. Finalmente, el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xilol en baños de 5 min cada uno. Las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Análisis densitométrico

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olympus, BX-40) y la densidad de la expresión se cuantificó

en cuatro áreas con infiltrado perivascular y cuatro con infiltrado peribronquial para cada animal por grupo (seis animales por grupo) en una área determinada y constante de 200 µm² utilizando un analizador de imágenes con el programa Image-Pro Plus® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD. USA).

Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. USA). Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizó mediante ANOVA de una vía y comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre grupos. Para establecer la correlación se realizó el análisis de Pearson. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra la respuesta alérgica inducida por OVA donde, mediante tinción con H/E (Figura 1 a-h), se evaluaron el infiltrado inflamatorio a nivel perivascular (Figura 1 a-d) y el infiltrado peribronquial (Figura 1 e-h) en los diferentes modelos de severidad de la inflamación alérgica pulmonar: leve (Figura 1b y 1f), moderada (Figura 1c y 1g) y severa (Figura 1 d-h). Claramente se observa un aumento en la cantidad del infiltrado inflamatorio a medida que aumenta el grado de severidad. En los tres modelos existe un aumento significativo del infiltrado inflamatorio tanto perivascular (Figura 1a) como peribronquial (Figura 1e) al realizar la comparación con el grupo control (que sólo recibió solución salina). Otra característica importante de la inflamación alérgica pulmonar es la secreción de moco; por tal motivo, también se evaluó la presencia de éste en los diferentes modelos de severidad. Para ello se utilizó la tinción de PAS (*periodic-acid-shift*), que tiñe la mucina que forma parte del moco (Figura 1 i-l). Se observa claramente un aumento significativo en la presencia de moco en los ratones que recibieron OVA (Figura 1 j-l) en comparación con los controles (Figura 1i). También se observa un aumento gradual en la cantidad de moco que se asocia con el grado de severidad. Los resultados anteriores demuestran que, en efecto, se contó con tres

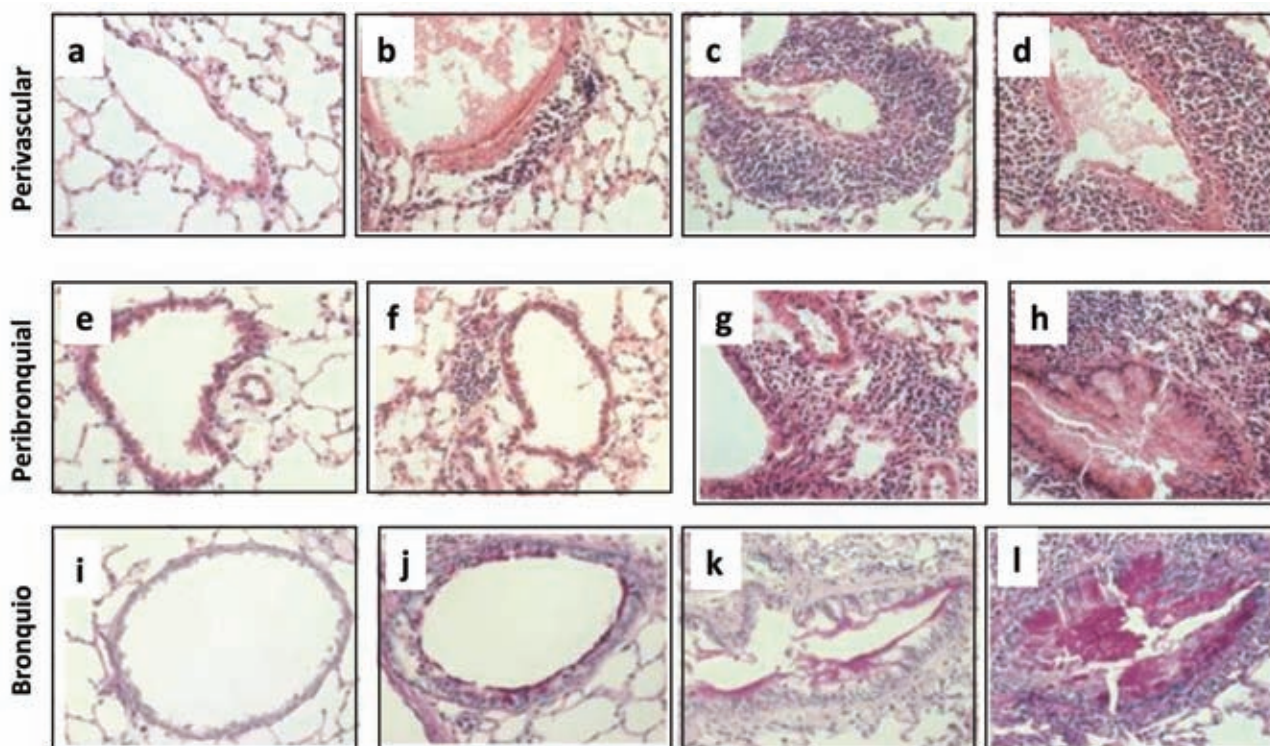


Figura 1. Evaluación de la respuesta alérgica inducida por el reto con ovalbúmina. Tinción con H/E (a-h) y PAS (i-l) para la evolución del infiltrado inflamatorio y la producción de moco, respectivamente. Modelo de inflamación alérgica pulmonar a nivel perivascular (a-d) o peribronquial (e-h) leve (b, f y j), moderada (c, g y k) y severa (d, h y l). Aumento 20 $\times$.

modelos de inflamación alérgica pulmonar con diferentes grados de severidad.

En la Figura 2 se observa el esquema de cómo se construyeron los microarreglos de tejido. En el microarreglo 1 se incluyeron secciones de tejido pulmonar que contenían áreas perivasculares de los animales con los diferentes grados de severidad de la inflamación inducida por OVA y de los ratones control; aproximadamente 100 muestras fueron incluidas. En el microarreglo 2 se incluyeron secciones de tejido pulmonar con áreas peribronquiales de los animales con diferentes grados de severidad de la inflamación inducida por OVA y de los animales control, también aproximadamente 100 muestras. Después de que se obtuvieron los bloques del microarreglo se realizaron los cortes de las laminillas especiales para la inmunohistoquímica de YY1 y de TGF- β .

En la Figura 3 se muestra la microfotografía representativa de la tinción para YY1 en infiltrados perivasculares (a-d) y peribronquiales (e-h). La tinción fue nuclear y

citoplasmática principalmente, tanto en células del infiltrado inflamatorio como en células del epitelio bronquial. Se puede observar claramente un aumento en la expresión de YY1 en el grupo de ratones con inflamación alérgica pulmonar severa (d y h) en comparación con los grupos con inflamación alérgica pulmonar moderada (c y g) y leve (b y f). Sin embargo, en los tres modelos de inflamación se observó una mayor expresión de YY1 cuando se comparan con el grupo de ratones control (a y e). Se obtuvieron resultados muy similares en la inmunotinción de TGF- β (Figura 4). La expresión de esta citocina fue evidente tanto perivascular (a-d) como peribronquialmente (e-i), sobre todo en el citoplasma de células del infiltrado inflamatorio y en el epitelio bronquial. La mayor expresión se observó en el modelo severo de inflamación alérgica pulmonar (d y h) en comparación con las inflamaciones alérgicas pulmonares moderada (c y g) y leve (b y f). En el grupo control (a y e) la expresión fue mínima.

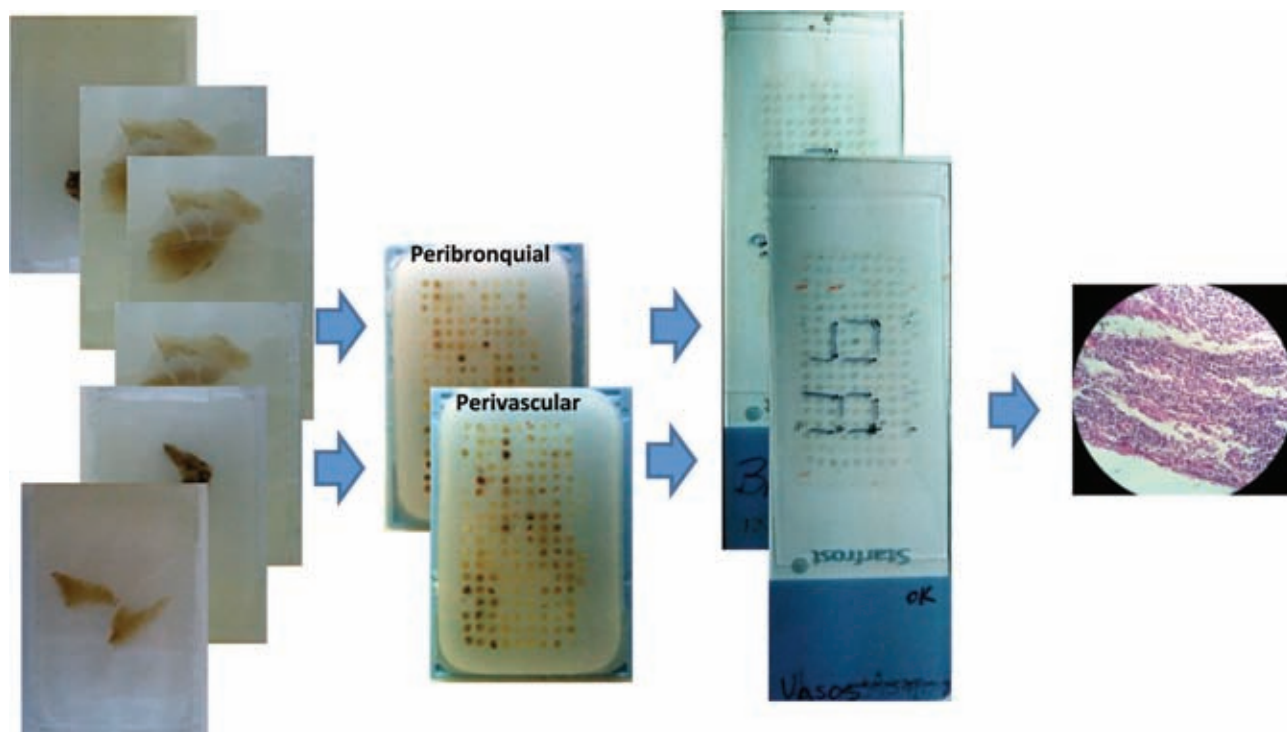


Figura 2. Representación esquemática de la construcción de los microarreglos de tejido.

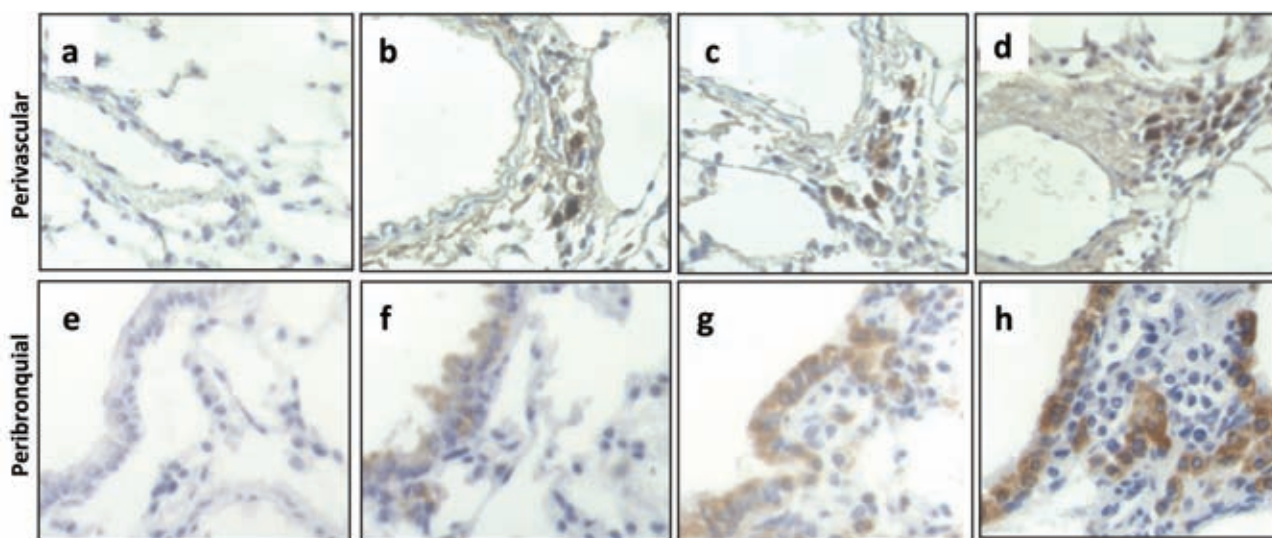


Figura 3. Inmunohistoquímica para identificar YY1 en tejido pulmonar. Infiltrado inflamatorio perivascular (a-d) y peribronquial (e-h), con diferentes grados de inflamación alérgica pulmonar: leve (b y f), moderada (c y g) y severa (d y h) y el grupo control (a y e). Aumento 40x.

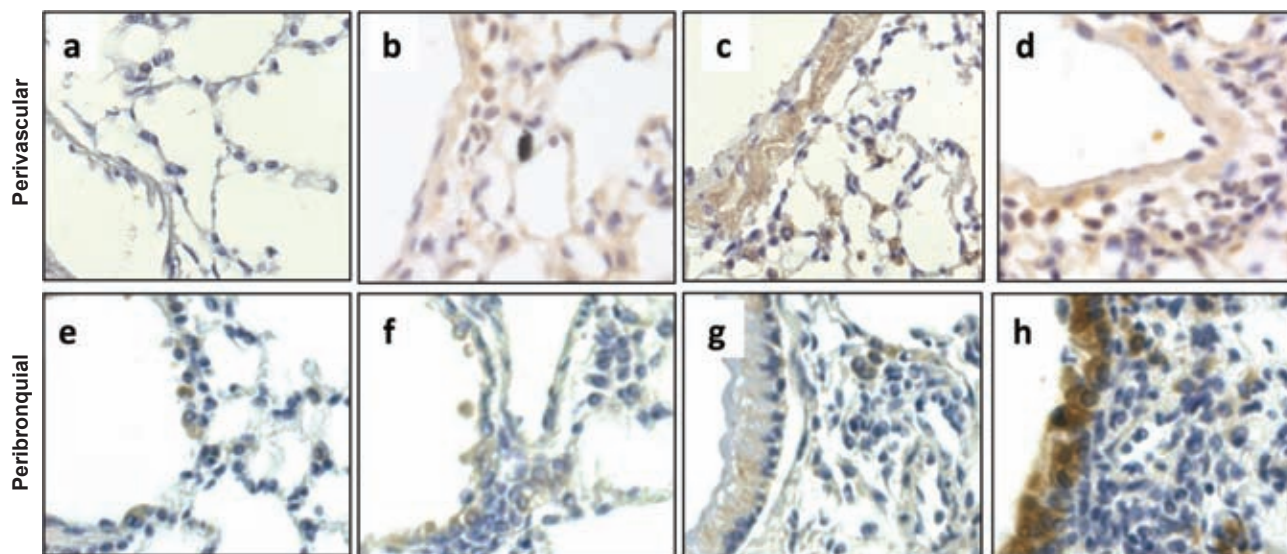


Figura 4. Inmunohistoquímica para identificar TGF- β en tejido pulmonar. Infiltrado inflamatorio perivascular (a-d) y peribronquial (e-h), con diferentes grados de inflamación alérgica pulmonar: leve (b y f), moderada (c y g) y severa (d y h) y el grupo control (a y e). Aumento 40 $\times$.

Posteriormente, se evaluó de manera cuantitativa la densidad de la expresión de YY1 y de TGF- β . En la Figura 5 se muestra la gráfica de la densidad de expresión de YY1. Las barras representan la media de la densidad de expresión de YY1 en cuatro áreas de infiltrado peribronquial y cuatro áreas de infiltrado perivascular en cada animal de cada grupo (seis ratones por grupo), en total 24 vasos y 24 bronquios analizados. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de la inflamación alérgica pulmonar conforme al grado de severidad, tanto en el área perivascular ($p = 0.001$, ANOVA) como en el infiltrado peribronquial ($p = 0.01$, ANOVA). En todos los grupos que recibieron OVA se observa un aumento de la expresión de YY1 en comparación con los grupos control.

En la Figura 6 se presenta la gráfica de la evaluación de la densidad de expresión perivascular y peribronquial de TGF- β . El aumento de la expresión en ratones sensibilizados con OVA es significativo con respecto a los que sólo recibieron SS ($*p = 0.001$, ANOVA).

Con los datos obtenidos acerca de la expresión de YY1 y de TGF- β se procedió a realizar una prueba estadística de Pearson que mostró una correlación significativa con un intervalo de confianza de 95% ($p = 0.029$, $r = 0.633$); esto significa que la expresión de YY1 es directamente proporcional a la expresión de TGF- β (Figura 7).

DISCUSIÓN

Estudios recientes han demostrado que el factor de transcripción YY1 juega un papel muy importante en los mecanismos de la fisiopatología del asma vía regulación de citocinas como IL-4.¹⁶ Por otro lado, se ha reportado que YY1 regula de manera positiva la expresión de TGF- β en células provenientes de BAL y en tejido pulmonar de pacientes con asma. Se sabe que el polimorfismo en el promotor de TGF- β está asociado con un mal pronóstico de esta enfermedad. Esto se debe a que el sitio donde se encuentra dicho polimorfismo es una secuencia de reconocimiento de unión al ADN para YY1. Los pacientes con este polimorfismo presentan una citosina (C) en vez de una timina (T) en el sitio consenso para YY1, por lo que este factor se une con mayor afinidad y produce una elevada expresión de TGF- β .¹⁵

Diversos estudios han reportado que el TGF- β participa de manera importante en la patogénesis del asma, pues los pacientes con asma severa presentan una alta expresión de esta citocina, mientras que los pacientes con manifestaciones leves o moderadas de esta enfermedad presentan menor expresión.^{9-12,20,21}

Por lo anterior, es razonable suponer que existe una asociación directa entre la expresión de YY1 y la expresión de TGF- β , y que esta asociación se relaciona con la severidad

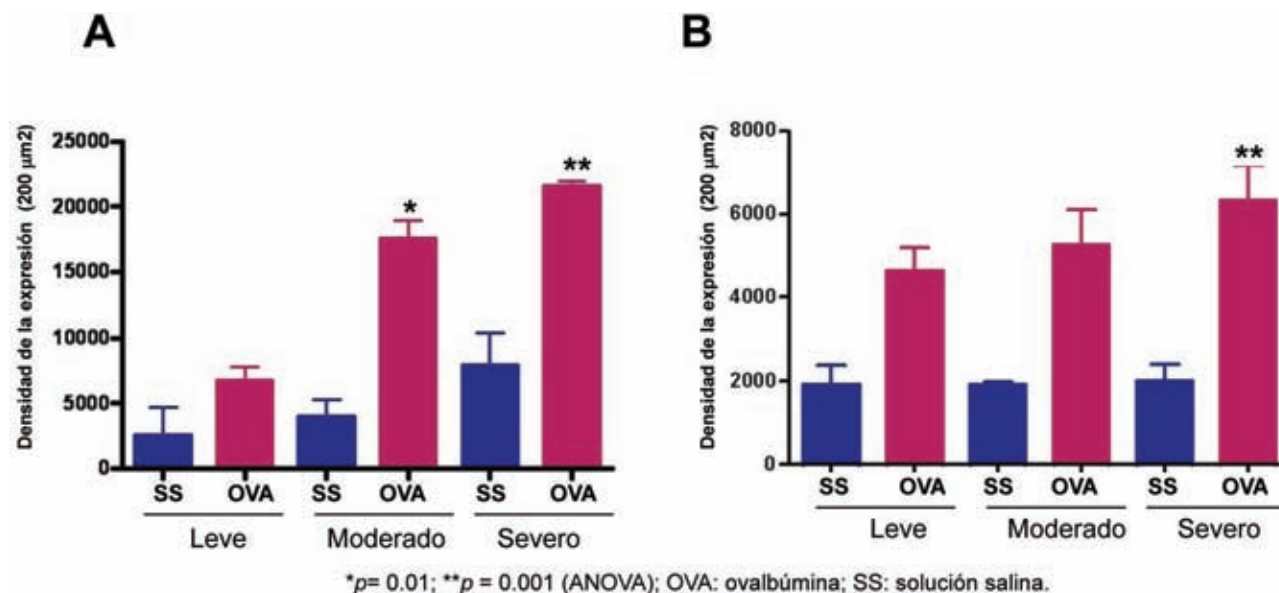


Figura 5. Análisis del área de expresión de YY1 en infiltrado inflamatorio perivascular (A) y peribronquial (B).

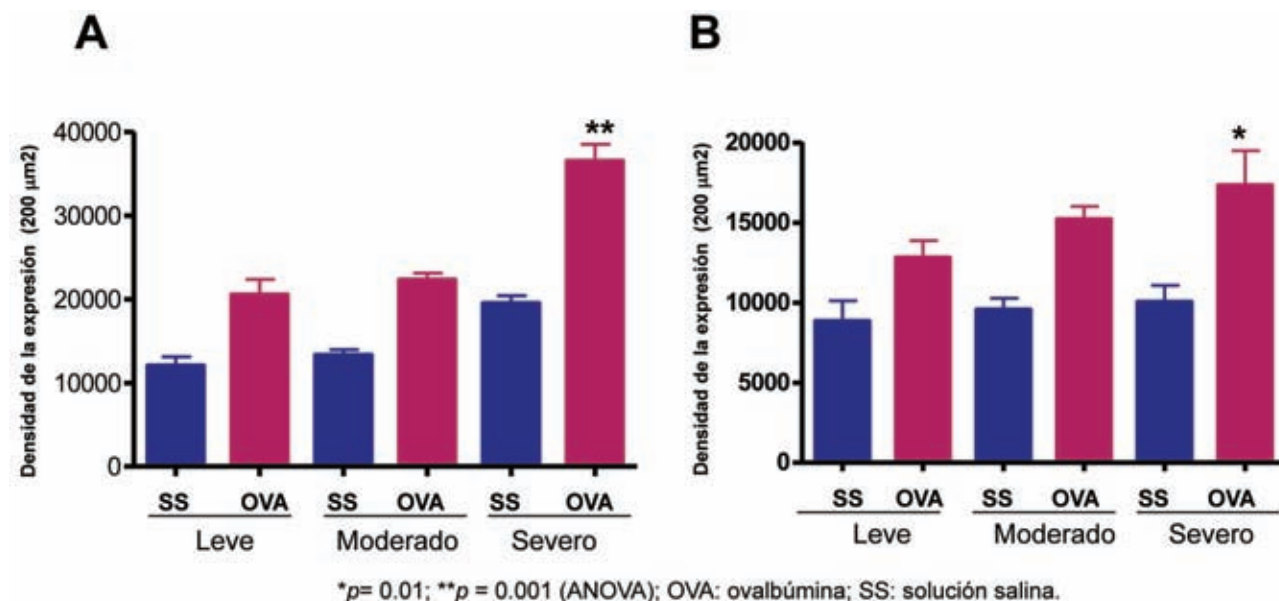


Figura 6. Análisis del área de expresión de TGF- β en infiltrado inflamatorio perivascular (A) y peribronquial (B).

del asma, lo cual hasta la fecha no había sido descrito. En el presente trabajo se describe por primera vez una asociación directa entre la expresión de YY1 y la de TGF- β en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar

(que es una de las manifestaciones clínicas características del asma) con diferentes grados de severidad y por medio de la técnica de microarreglo de tejidos. Dicha técnica ha sido ampliamente utilizada desde hace algunos años para

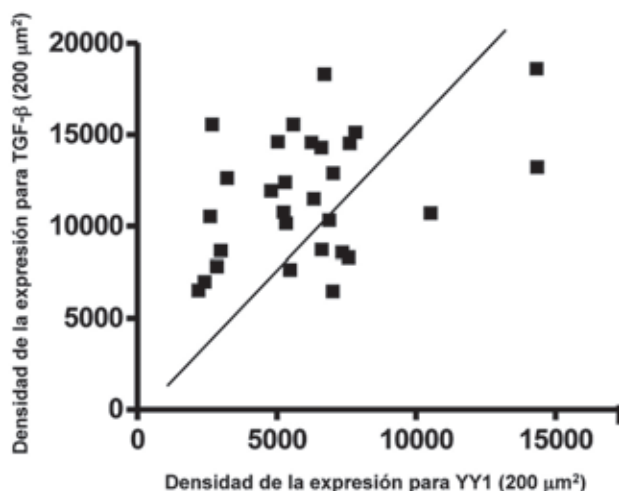


Figura 7. Correlación de la expresión de TGF- β y de YY1 en infiltrado inflamatorio de tejido pulmonar perivascular con inflamación alérgica severa. IC 95%, $p = 0.029$ y $r = 0.633$ (Pearson).

el estudio de la expresión de proteínas. La ventaja de esta tecnología consiste en que en un solo bloque de parafina se pueden arreglar, de manera ordenada, de 100 a 300 tejidos diferentes; de esta manera, al realizar el corte de este bloque y colocarlo en una laminilla se puede analizar la expresión de determinada proteína al mismo tiempo y con la ventaja de disminuir la variabilidad interensayo, así como disminuir los costos y el tiempo en la realización del experimento. Esto permite que el resultado sea más confiable y significativo; se pueden utilizar pruebas estadísticas más poderosas pues no hay tanta dispersión entre los datos obtenidos de cada uno de los grupos analizados.

En la Figura 3 se observa que existe una muy leve expresión de YY1 en los grupos de ratones control, es decir, los que sólo recibieron SS. Esto puede ser explicado por el hecho de que YY1 es una proteína que se expresa de manera constitutiva. Otra explicación puede ser que al momento de realizar la inoculación directa en la tráquea se crea un efecto mecánico que induce estrés en el tejido, lo cual genera cierta respuesta celular que induce la expresión de YY1. Para descartar o confirmar estas explicaciones sería necesario incluir un grupo de ratones que no fueran sometidos a la administración traqueal.

Se observó que hay una mayor expresión de YY1 en los infiltrados inflamatorios perivasculares (Figura 3 a-d y Figura 5A) que en los infiltrados peribronquiales (Figura

3 e-h y Figura 5B); esto puede deberse a que las células inflamatorias migran a los tejidos a través de los vasos sanguíneos. La región perivascular es la zona que tiene el primer contacto con las células inflamatorias, que después migran hasta otras zonas, por ejemplo peribronquial o intersticial.

En el modelo de inflamación alérgica pulmonar severa se observa que existe una mayor presencia de YY1 al compararlo con los modelos leve y moderado; esto puede deberse a que durante el proceso de inflamación se liberan en el tejido pulmonar diversas citocinas proinflamatorias que pudieran estimular la expresión de YY1; al mismo tiempo, cuando este factor de transcripción se sobreexpresa, regula la expresión de otras citocinas que son importantes en la patogénesis del asma, como la IL-4 y la IL-10.¹⁶ Se sabe que la expresión del factor nuclear kappa B (NF κ -B) puede ser regulado por citocinas proinflamatorias; por otro lado, estudios recientes han demostrado que NF κ -B regula de manera positiva la expresión de YY1.^{22,23}

Las Figuras 4 y 6 muestran que existe una diferencia importante en la expresión de TGF- β entre los grupos tratados con OVA y los grupos control. Esto es consistente con los diversos reportes que han mostrado que el TGF- β juega un papel muy importante en la fisiopatología del asma y que a mayor expresión de esta citocina mayor grado de severidad de la enfermedad.^{9-11,13,20,21} El TGF- β es una citocina antiinflamatoria; sin embargo, en ambientes con una elevada cantidad de linfocitos Th-2 esta citocina actúa principalmente en el desarrollo, el crecimiento, la transformación y reparación de tejidos y fibrosis, así como en la modulación de la respuesta inmunitaria inflamatoria.¹⁰ En el grupo de SS se logra observar una expresión discreta de esta citocina y esto se explica por el hecho de que el TGF- β es una proteína que se expresa de manera constitutiva. Como ya se mencionó, se ha demostrado que el promotor del gen que codifica para TGF- β presenta un polimorfismo en el locus C-509T, lo que induce una unión de YY1 con mayor afinidad a dicho promotor y activa la sobreexpresión de esta citocina.¹⁵ Hasta el momento no se ha realizado un estudio en el cual se asocie a YY1 con la expresión de TGF- β de forma directa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudieron confirmar los datos publicados que indican que YY1 se expresa de manera significativa en el tejido pulmonar de ratones con inflamación alérgica pulmonar. Sin embargo, por primera vez se reporta que la expresión de YY1 aumen-

ta de manera directa de acuerdo con el grado de severidad de esta enfermedad. Además se demostró, también por primera vez, que existe una asociación directa entre la expresión de YY1 y la expresión de TGF- β , lo cual apoya lo reportado por Silverman y cols., quienes observaron que YY1 regula de manera transcripcional a TGF- β .¹⁵

Autor de correspondencia: Dra Sara Huerta-Yépez
Correo electrónico: shuertay@yahoo.com

REFERENCIAS

1. Blumenthal M. The immunopathology and genetics of asthma. *Minn Med* 2004;87:53-56.
2. Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OC, Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy* 2010;65:152-167.
3. Carrada BT. Asthma: prevalence, pathogenesis and perspectives on new treatments. *Rev Alerg Mex* 2002;49:87-94.
4. Karaman O, Arli O, Uzuner N, Islekel H, Babayigit A, Olmez D, et al. The effectiveness of asthma therapy alternatives and evaluating the effectivity of asthma therapy by interleukin-13 and interferon gamma levels in children. *Allergy Asthma Proc* 2007;28:204-209.
5. Pedersen S. From asthma severity to control: a shift in clinical practice. *Prim Care Respir J* 2010;19:3-9.
6. Górka K, Krenke R, Kosciuch J, Korczynski P, Zukowska M, Domagala-Kulawik J, et al. Relationship between airway inflammation and remodeling in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Med Res* 2009;14(suppl 4):90-96.
7. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:806-817.
8. Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:722-727.
9. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-1358.
10. Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, et al. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest* 2000;105:61-70.
11. Nakao A. Is TGF-beta1 the key to suppression of human asthma? *Trends Immunol* 2001;22:115-118.
12. Redington AE, Roche WR, Holgate ST, Howarth PH. Co-localization of immunoreactive transforming growth factor-beta 1 and decorin in bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *J Pathol* 1998;186:410-415.
13. Fishman S, Hobbs K, Borish L. Molecular biology of cytokines in allergic diseases and asthma. *Immun Allergy Clin North Am* 1996;16:613-642.
14. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 2006;25:1125-1142.
15. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:214-219.
16. Guo J, Lin X, Williams MA, Hamid Q, Georas SN. Yin-Yang 1 regulates effector cytokine gene expression and T_H2 immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:195-201.
17. Yépez SH, Pando RH, Argumedo LS, Paredes MV, Cueto AH, Isibasi A, et al. Therapeutic efficacy of an *E. coli* strain carrying an ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OMPC in a murine model of allergic airway inflammation. *Vaccine* 2003;21:566-578.
18. Huerta-Yépez S, Baay-Guzmán GJ, García-Zepeda R, Hernández-Pando R, Vega MI, González-Bonilla C, et al. 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clin Immunol* 2008;129:313-324.
19. Seligson DB, Hongo F, Huerta-Yépez S, Mizutani Y, Miki T, Yu H, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein is a strong predictor of human prostate cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:6056-6063.
20. Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y, Sato A, Takahashi T, Homma Y, et al. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1907-1912.
21. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, et al. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:591-599.
22. Baritaki S, Suzuki E, Umezawa K, Spandidos DA, Berenson J, Daniels TR, et al. Inhibition of Yin Yang 1-dependent repressor activity of DR5 transcription and expression by the novel proteasome inhibitor NPI-0052 contributes to its TRAIL-enhanced apoptosis in cancer cells. *J Immunol* 2008;180:6199-6210.
23. Huerta-Yépez S, Vega M, Escoto-Chávez SE, Murdock B, Sakai T, Baritaki 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;20:39-52.