



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---



FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de Marcadores de  
Senescencia en Fibrosis Pulmonar  
Idiopática.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

DAVID MELQUIADES MEDINA PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Jorge Antonio García Alvarez

MÉXICO, D. F. 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Evaluación de Marcadores de Senescencia en Fibrosis Pulmonar Idiopática**

realizado por Medina Pérez David Melquiades con número de cuenta 3-0122074-1 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Annie Pardo Serio

*A. Pardo*

Propietario Dr. Emilio Joaquín Carlos Alarcón

*Emilio Alarcón*

Propietario Tutor Dr. Jorge Antonio García Álvarez

*Jorge Álvarez*

Suplente M. en C. María Isabel De la Cruz Laísa

*María Isabel De la Cruz Laísa*

Suplente M. en C. María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel

*María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel*

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 28 de septiembre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

*Pedro García Barrera*

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor (nodal): antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.  
slm.

Sólo una vida vivida para los demás merece la pena ser vivida...  
La diferencia entre el pasado, el presente y el futuro es sólo una ilusión  
persistente.

*Albert Einstein*

El que no vive para servir, no sirve para vivir...  
A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el  
mar sería menos si le faltara una gota.

*Madre Teresa de Calcuta*

¡Actúa en vez de suplicar. Sacrifícate sin esperanza de gloria ni recompensa!  
Si quieres conocer los milagros, hazlos tú antes. Sólo así podrá cumplirse tu  
peculiar destino.

*Ludwig van Beethoven*

¡Quienes por comidas, festines y suntuosidades se atraen la estimación de los  
hombres, muestran claramente que les falta el verdadero mérito; el que nace  
de la virtud y de la dignidad!

*Marco Tulio Cicerón*

## Agradecimientos.

Este estudio fue realizado con apoyo de PAPIIT IN203709.

*En primer lugar le agradezco al Dr. Jorge García, por los conocimientos brindados a todo lo largo de mi estancia en el grupo, no solo académicos sino personales, ya que es un excelente profesor, pero es aun mejor como persona, y gran parte del mérito de este trabajo es de él.*

*A la Maestra Remedios, por su paciencia y consejos, que me fueron llevando a todo lo largo de mi trabajo.*

*A la Doctora Annie, por su paciencia y su apoyo no solo académico, también moral.*

*A Abigail Morales, ya que aunque su método de enseñanza no fue muy ortodoxo para conmigo, fue muy eficaz, y entre las tantas enseñanzas de ella, las más importantes fueron la confianza y la disciplina.*

*A todos mis compañeros del laboratorio, porque de todos ellos he podido aprender y de todos ellos he recibido apoyo.*

*A mis amigos que soportaron tantas cosas, desde corajes y bromas, desvelos por trabajo o demás, alegrías y tristezas, en fin tantas cosas que sin ellos no hubiese podido superar de la mejor manera.*

*A Victor Rangel, ya que por él pude llegar hasta donde estoy ahora, porque sus consejos me mantuvieron en el camino, a ti que más que un amigo, te considero hermano.*

*A todos mis amigos que por circunstancias de la vida, nos hemos distanciado, Griselda, Antonio, Jonathan, Araceli y Adrian.*

*A mi familia, ya que todo lo que hago es por y para ellos, a ellos porque soportaron corajes, desvelos, ausencias y distanciamiento, decepciones y alegrías, con conocimiento y a veces sin el.*

*A ti Daisy, porque me enseñaste algo que no hubiese podido conocer de no ser por ti, porque me apoyaste cuando te necesité, porque creíste y confiaste en mí, porque me recordaste el motivo por el cual estoy en esta carrera y por muchas otras cosas, ¡Gracias!.*

*Y por último, a ti Universidad, que me hiciste lo que soy, que me diste tantas cosas, y que en tus aulas y espacios aprendí, no solo los conocimientos académicos dados por mis profesores, sino algo más importante, el como vivir y convivir con mis iguales. Por ti tuve la oportunidad de conocer a tantas personas de caracteres tan distintos, gracias a ti conocí a grandes personas, y tuve el honor de ser amigo de ellas, no solo compañeros, de igual modo profesores y trabajadores. Por todo ello, ¡Gracias UNAM!*

*¡Por mi raza hablara el espíritu!*

## Índice.

Lista de abreviaturas	
Resumen.....	1
Introducción.....	2
1.- Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	2
1.1 Epidemiología y Características Clínicas.....	2
1.2 Hipótesis Inflamatoria .....	3
1.3 Hipótesis Epitelial .....	4
2.- Senescencia.....	6
2.1 Ciclo Celular .....	6
2.2 Senescencia .....	9
2.3 Senescencia p21/p53 Dependiente .....	11
2.4 Senescencia p16 Dependiente .....	13
Objetivos.....	15
Material y Métodos.....	16
Resultados.....	23
Discusión.....	30
Conclusiones.....	35
Bibliografía.....	36

## Abreviaturas

EPID- Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas

FPI- Fibrosis Pulmonar Idiopática

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

INK- Inhibidor Nuclear de Cinasas

Rb- Retinoblastoma (proteína)

E2F- (Factor de Transcripción)

CDK- Cinasas Dependientes de Ciclina

ORC- Complejo de Origen de Replicación

MCM- mantenimiento de mini-cromosoma

DNApol- $\alpha$ - DNA polimerasa tipo  $\alpha$

PRC- Complejo Pre-replicativo

APC- Complejo de Promoción de la Anafase

ATM- Ataxia Talangiectasia Mutada

ATR- ATM y Rad3-relacionados

CHK- Checkpoint Cinasas

ROS- Especies Reactivas de Oxígeno

PCNA- antígeno Nuclear de Proliferación Celular

HDM- Human Double Minute

PI3K- Fosfatidil Inositol 3-Cinasas

PI3KK- Cinasas de la PI3K

DNA-PK- Proteína Cinasas Dependientes de DNA

UV- Ultravioleta

INER- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

ATS- Sociedad Americana de Tórax

ERS- Sociedad Europea Respiratoria

EDTA- Ácido etilendiaminotetraacético

RNA- Ácido Ribonucleico

ml- mililitro



rpm- Revoluciones por Minuto  
°C- Grados Centigrados  
DEPC- dietil-pirocarbonato  
µl- microlitro  
PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa  
RT-PCR- Transcripción Reversa por PCR  
nm- nanometros  
µg- microgramos  
Abs- Absorvancia  
mM- milimolar  
dNTP's- mix de Desoxirribonucleótidos  
MgCl<sub>2</sub>- Cloruro de Magnesio  
seg- Segundos  
min- Minutos  
NaI- Yoduro de Sodio  
cDNA- DNA complementario  
ng- nanogramos  
µM- micromolar  
AEC- Aminoetilcarbamida  
CO<sub>2</sub>-Dioxido de Carbono

## Resumen.

Se ha propuesto que la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es probablemente el resultado de una activación aberrante de células epiteliales alveolares después de una agresión, lo que provoca la migración, proliferación y activación de células mesenquimales con la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos, ocasionando una exagerada acumulación de matriz extracelular con la destrucción irreversible del parénquima pulmonar. En este estudio decidimos analizar si los fibroblastos de la FPI se encuentran en un estadio no proliferativo; y en tal caso, si se mantienen metabólicamente activos en un estado senescente. Los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón son capaces de desarrollar el carácter senescente de forma natural, esto lo pudimos observar en cultivos de fibroblastos normales, después de un alto número de pasajes; en contraste, el desarrollo de la misma en los cultivos de fibroblastos fibróticos se alcanza en pasajes mucho más tempranos. Un hallazgo interesante encontrado en este análisis, revela que la Ciclina D1 se encuentra sobre-expresada en fibroblastos senescentes *in vitro*. Sin embargo, la Ciclina D1 fue detectada en algunos epitelios de cortes histológicos de pulmones con FPI; esta localización coincide con la de p53 y p21, no así con la p16. Mediante la tinción de células reactivas para  $\beta$ -galactosidasa, se pudo observar que algunos epitelios son positivos, sin embargo los focos de fibroblastos no mostraron la tinción positiva para la enzima. En conclusión, podemos decir que los focos de fibroblastos en la FPI no son senescentes y este dato nos sugiere que, dentro de la histopatología, la proliferación de los mismos, sumado a la migración de este tipo celular es predominante para el desarrollo de la enfermedad.

# Introducción.

## 1. Fibrosis Pulmonar Idiopática.

### 1.1 Epidemiología y Características clínicas.

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo amplio y muy heterogéneo de padecimientos que afectan al parénquima respiratorio conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). Estos padecimientos afectan no solo al intersticio pulmonar sino también a las unidades alveolo-capilares, frecuentemente a las vías aéreas pequeñas incluyendo bronquiolos terminales, bronquiolos respiratorios y ductos alveolares (1). Las causas más comunes de EPID, y por consiguiente de fibrosis pulmonar, son la exposición a partículas inorgánicas (Sílice y Asbesto), partículas orgánicas (proteínas de aves, hongos y bacterias termofílicas), uso de diversos medicamentos y algunas enfermedades sistémicas como sarcoidosis o autoinmunes, como esclerosis sistémica progresiva o artritis reumatoide (1).

Del total de las EPID, entre el 40 y 50% son de etiología desconocida, y entre estas están las neumonías intersticiales idiopáticas, siendo la más común y la más agresiva de las EPID la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), que representa un desorden pulmonar crónico, progresivo y generalmente letal (2). Este padecimiento presenta un patrón histopatológico característico denominado neumonía intersticial usual y es la más agresiva de todas las EPID, con una supervivencia promedio de dos a tres años después de realizado el diagnóstico (1).

Los pacientes con FPI se encuentran entre los 50 y 70 años de edad al momento del diagnóstico. Dos tercios de los pacientes pasan de los 60 años de edad. La incidencia anual estimada es de 7 casos de cada 100 000 para mujeres y de 10 casos de cada 100 000 para hombres. La incidencia prevalece, y el índice de mortalidad aumenta con la edad (3).

Muchos pacientes presentan síntomas por más de 6 meses antes del diagnóstico. Las manifestaciones clínicas incluyen disnea o esfuerzo para respirar, tos y ruidos al inhalar. Muestran irregularidades en radiografías y tomografías computarizadas de alta resolución del pecho, predominantemente en la periferia, la sub-pleura y opacidades en la zona baja del pulmón. La prueba de función pulmonar revela un deterioro restrictivo, reduciendo la capacidad de difusión del monóxido de carbono, e hipoxemia arterial exagerada, también esto puede ser ocasionado por el ejercicio (3).

## 1.2 Hipótesis Inflamatoria.

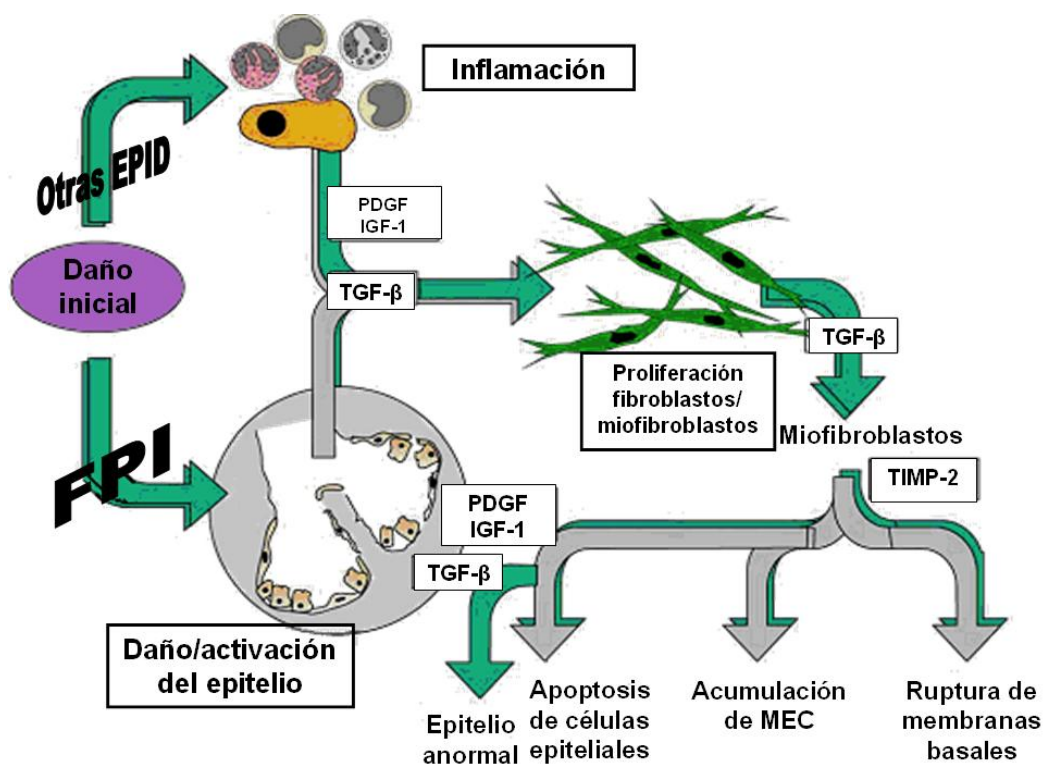
Similar a otras enfermedades pulmonares intersticiales, la FPI fue considerada por largo tiempo como deterioro consecuencia de un proceso inflamatorio crónico no resuelto causado por un daño no reconocido. Es cierto que la mayoría de las enfermedades pulmonares intersticiales incluyen una respuesta inflamatoria identificable que puede ser de causa conocida o desconocida. En estas enfermedades, las biopsias revelan que en las etapas iniciales existe una inflamación predominante y a menudo, algunas de estas enfermedades pueden evolucionar hacia la fibrosis, lo cual puede dificultar el diferenciarlas de la FPI. En contraste, en biopsias de pacientes con FPI tomadas después de 6 meses a 2 años de presentar síntomas, muestran grados variables de fibrosis con una inflamación moderada (1).

La terapia común en FPI consistía en el uso de anti-inflamatorios (glucocorticoides) y agentes citotóxicos inmunosupresores (Azatioprina, Ciclofosfamida). El uso de drogas anti-inflamatorias estuvo basado en la hipótesis de que la inflamación inicia el daño al cuál responde el cuerpo (4). El tratamiento en la FPI es altamente controversial. Sin embargo, estos tratamientos no presentaban grandes beneficios. En este contexto se propusieron también, tratamientos combinados de agentes inmunosupresores (Azatioprina) o ciclofosfamida con prednisona o prednizolona (5). Sin embargo, la ineficiencia de las drogas anti-inflamatorias en retrasar la progresión de la FPI en la mayoría de los pacientes sugiere que la inflamación no juega un rol importante como factor primario en la iniciación de la FPI (4).

Debido a esto y a algunos hallazgos en la biología molecular de la patología, se han propuesto dos diferentes rutas para el desarrollo de fibrosis pulmonar difusa. Una es la vía inflamatoria, claramente distinguible en su fase de alveolitis, seguida por la subsecuente fase fibrótica, y la vía epitelial, representada por la FPI (2) [fig. 1].

### 1.3 Hipótesis Epitelial

Se ha propuesto que la FPI es probablemente el resultado de una activación aberrante de células epiteliales alveolares después de una agresión, lo que provoca una migración, proliferación y activación de células mesenquimatosas con la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos, ocasionando la exagerada acumulación de matriz extracelular con la destrucción irreversible del parénquima pulmonar (2). Las células epiteliales tipo I dañadas son reemplazadas por células hiperplásicas tipo II. La capacidad proliferativa de las células tipo II para restaurar a las células tipo I dañadas parece que es seriamente afectada en pacientes con fibrosis, resultando en la cuboidización epitelial y el fenotipo transitorio entre células tipo II y I (6).



**Fig. 1.** Esquema hipotético de las dos vías primarias hacia la fibrosis pulmonar. El daño inicial provocado por una inflamación ocasiona la activación de células epiteliales alveolares. Células inflamatorias y epiteliales liberan citocinas y factores de crecimiento que inducen la migración, proliferación y cambios en el fenotipo de fibroblastos a miofibroblastos (Modificado de Pardo A. 2002)

En adición, numerosas áreas microscópicas de células del epitelio alveolar, se encuentran intercaladas con células hiperplásicas que son usualmente notables en áreas de focos de fibroblastos. Además, se ha incrementado la evidencia que demuestra que células epiteliales alveolares activadas por el daño, expresan una variedad de citocinas y factores de crecimiento, involucrados en la migración, proliferación y cambios en el fenotipo de fibroblastos y en la remodelación de la matriz extracelular (2).

Entre las moléculas expresadas por el epitelio alveolar se encuentran el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Transformante tipo beta ( $TGF-\beta$ ), el Factor de Necrosis Tumoral tipo alfa ( $TNF-\alpha$ ) y la endotelina-1 (2).

En la FPI, durante el proceso de reparación, la expresión de factores mitógenos es suprimida por la actividad de p53, cuyo pico de acción ocurre cuando la re-epitelización esta completa. La interferencia de la función normal de p53 puede resultar en la expresión no regulada de factores de crecimiento y una posible reparación anormal de células epiteliales. Un epitelio normal intacto es importante en el control de los mecanismos de reparación (7).

Estudios recientes sugieren que  $\beta$ -catenina esta involucrada en tres diferentes sitios en la FPI: 1) lesiones proliferativas bronquiales, 2) estructuras alveolares dañadas, y 3) focos de fibroblastos. Las lesiones bronquiloares proliferativas incluyen células basales hiperplásicas, metaplasia escamosa y bronquiolización, que son comunes en FPI, y representan características peculiares bien reconocidas para la enfermedad. La activación aberrante de la vía de Wnt es particularmente evidente y extensa en estas lesiones, envolviendo en muchos casos el compartimiento de células basales (8).

## **2. Senescencia.**

### **2.1 Ciclo Celular.**

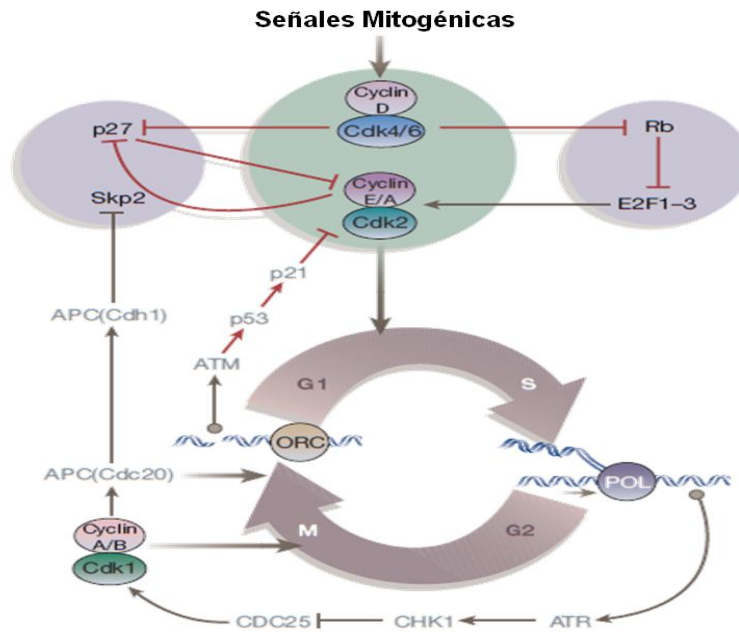
La reproducción celular ocasiona la replicación del DNA continuada por la división del núcleo y la separación del citoplasma para la producción de dos células. Esta rutina secuencial es conocida como "ciclo Celular". Las células del embrión temprano se producen a través de continuos ciclos de replicación de DNA y divisiones nucleares, a asombrosa velocidad (9). G1 es un periodo con la intervención de muchas señales que

influyen la división celular y el despliegue de programas de desarrollo celular. Diversos metabolitos, estrés y señales ambientales son integradas e interpretadas en este periodo. En las bases de estos impulsos, la célula decide si entrar a fase S o se detiene (9).

Los eventos del ciclo celular son estrechamente controlados por una activación secuencial de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (fig. 2) a través de las diferentes fases del ciclo. Las CDKs son el centro de la maquinaria del ciclo celular en respuesta a ambas señales, intracelulares y extracelulares para el control de la progresión del ciclo celular (10). Al inicio del ciclo celular dentro de la fase G1, estímulos mitogénicos cambian de estado por un incremento de Ciclina tipo D, que en combinación con CDK4 y CDK6, fosforilan e inactivan a Rb; esta fosforilación disocia a E2F de Rb, permitiendo la transcripción de genes dependientes de E2F (9).

Una barrera (ó *checkpoint*) dentro de la fase G1 es incorporada entre la división nuclear (fase M) y la síntesis de DNA (fase S), otra barrera dentro de la fase G2 ocurre entre las fases S y M. Estas barreras permiten la reparación del daño al DNA y errores de replicación (9). RAS oncogénico puede inducir a p16 en la activación de la ruta de Rb, esto produce una segunda barrera a la proliferación de células potencialmente oncogénicas (14). Adelante en el ciclo, la Ciclina E por medio de E2F, activa la transcripción de un grupo de componentes que facilitan la replicación del DNA (ORC, MCM, DNAPol- $\alpha$ ) y eventos subsecuentes (Ciclina B, CDK1 y varios componentes del control de calidad del DNA) (9). La actividad del complejo Ciclina E/CDK2 al final de la fase G1, es requerida para entrar a la fase S y la iniciación de la replicación del DNA (10).



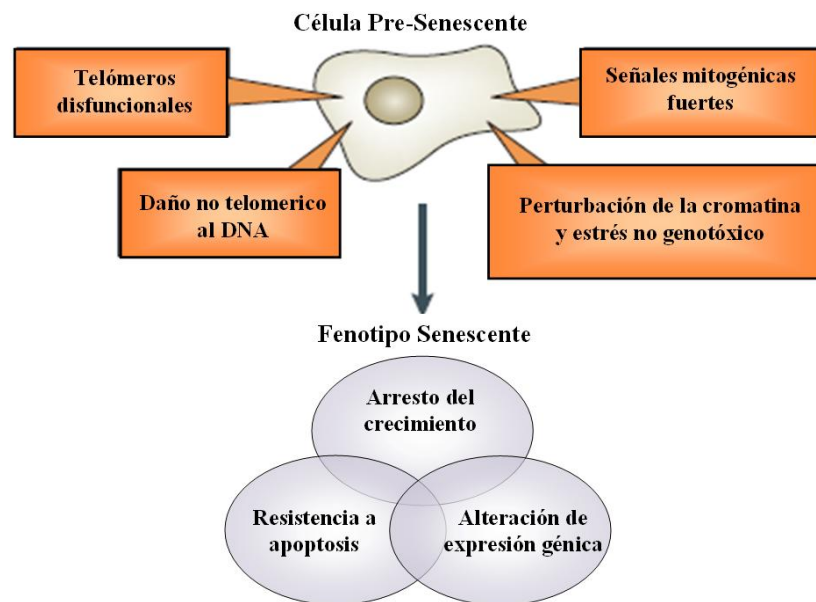


**Fig. 2.** La maquinaria de CDK para la transición de G1 a S y reguladores integrados. Las señales mitogénicas actúan por medio de Cdk4/6 neutralizando a p21 e induciendo la transcripción de ciclinas dependientes de E2F, resultando en la activación de Cdk2 dentro de la fase S. El daño al DNA activa la vía de ATM-p53, esto previene la activación de CDK's por medio del inhibidor p21 (modificado de Massagué J. 2004).

El complejo Ciclina D1/CDK4/6 participa en la inactivación de la función de supresión del crecimiento de Rb a través de la fosforilación, además otra importante función es la actividad en el control del ciclo celular. Muchos factores de transcripción pueden ser reguladores positivos de la expresión de la Ciclina D, incluyendo a  $\beta$ -catenina, Msx1 y Notch, mientras que para su regulación, un factor negativo para la actividad de la Ciclina D es la ubiquitinización. La rápida degradación de esta Ciclina es regulada por la vía de degradación de proteínas mediada por proteosoma (10). La proteína poliubiquitinizada es reconocida y destruida por el proteosoma 26S. La alteración de la actividad del complejo Ciclina D/CDK4 ha sido bien caracterizada en melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer gástrico (10),

## 2.2 Senescencia.

El arresto del ciclo celular puede responder a diversos tipos de estrés (fig. 3), incluyendo telómeros disfuncionales, daño al DNA, señales mitogénicas fuertes y rupturas en la cromatina. La luz ultravioleta (UV) induce un arresto inmediato de G1 por la rápida degradación de la Ciclina D (10).



**Fig. 3.** Fenotipo senescente inducido por múltiples estímulos.

La respuesta senescente causa cambios que derivan en esencia al arresto de la proliferación celular, el desarrollo de resistencia a apoptosis (en células somáticas) y la alteración de los patrones de expresión génica (modificado de Campisi J. 2007).

Algunas células mitóticas que pueden proliferar, están por largos intervalos en un estado de arresto reversible determinado Quiescencia o G0. En contraste a la quiescencia, en la senescencia el arresto del crecimiento es esencialmente permanente (en ausencia de manipulación experimental) (11). Las células quiescentes limitan su proliferación en respuesta a señales apropiadas, incluyendo la necesidad de reparar o regenerar tejido. En contraste células post-mitóticas pierden permanentemente la habilidad para dividirse debido a la diferenciación (11). Cuando las

células quiescentes son estimuladas por factores de crecimiento o señales mitogénicas, las Ciclinas tipo D son las primeras en ser activadas (10).

Hayflick y colaboradores describieron a la senescencia celular como una vida replicativa finita. Esto porque las células sometidas a múltiples divisiones alcanzan el arresto del crecimiento en un estado post-mitótico estable, este proceso fue denominado como senescencia replicativa. Ello se debe a que la replicación del DNA en ausencia de la actividad de la telomerasa, los telómeros se acortan progresivamente causando eventualmente un mal funcionamiento. Muchos tipos de estímulos oncogénicos o estresantes pueden inducir al arresto del crecimiento mediante la senescencia, entre estos se encuentran ciertos tipos de daño al DNA incluyendo rupturas y lesiones causadas por ROS, efectos medioambientales, defectos genéticos o procesos endógenos (12).

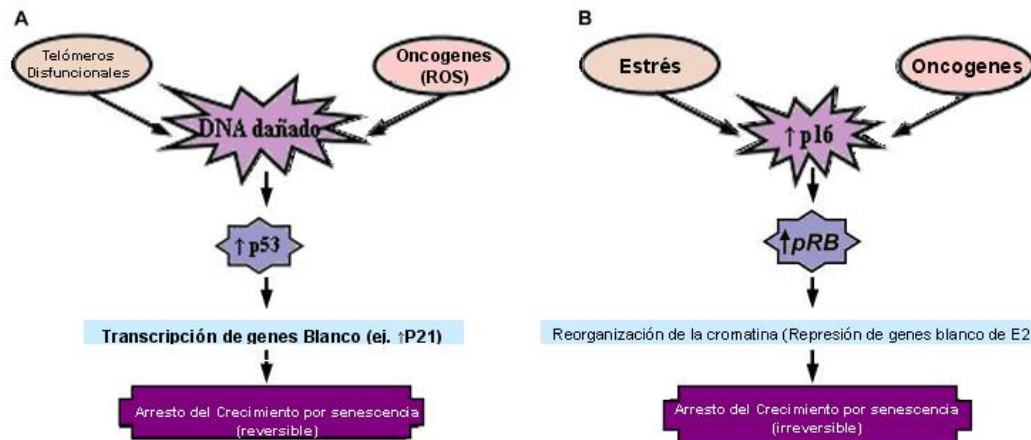
Ahora bien, la senescencia celular actúa como una barrera a la transformación maligna, las células senescentes activan las rutas supresoras de tumores p53 y p16/Rb (11). p53 promueve senescencia activando genes que inhiben la proliferación, incluyendo el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21/Cip1/Waf1 (13). En contraste, p16<sup>INK4a</sup> promueve senescencia inhibiendo a las cinasas dependientes de ciclinas 2 y 4, previniendo la fosforilación de Rb (Retinoblastoma, proteína) y promoviendo un medio ambiente propicio para la formación de heterocromatina reprimida, para el silenciamiento de genes asociados con la proliferación (14). Cabe mencionar que de los marcadores de senescencia, como la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia, p16, p21, focos de DNA dañado o de heterocromatina asociados a senescencia, ninguno es universal o exclusivo del estado senescente (11), sin embargo son los más utilizados y referidos en la bibliografía.

La diferencia en la cinética entre p21 y p16 es explicada no por la activación secuencial de p21 y p16 en una sola célula, sino por la diferente cinética de células expuestas a la senescencia replicativa dependiente de p21 y la senescencia inducida por estrés dependiente de p16. La inactivación de p53 restaura la proliferación en células senescentes p16baja/p21alta (15).

Ciertas cepas de fibroblastos humanos normales son relativamente resistentes a la senescencia inducida por estrés. En células de este tipo, p16 no se acumula, por lo que estas células sufren senescencia replicativa. En contraste, otras cepas de fibroblastos expresan niveles relativamente altos de p16 cuando estas son pre-senescentes. Estas células son susceptibles a senescencia inducida por estrés. Una vez establecida la senescencia p16-dependiente, esta no puede ser revertida por la inactivación de p16, p53 u otro. La activación de la vía p16/Rb media cambios irreversibles en la célula, como la reorganización global de la cromatina (15).

### 2.3 Senescencia p21/p53 dependiente.

La proteína p53 no es requerida para un crecimiento celular normal, pero actúa previniendo la proliferación bajo ciertas circunstancias de estrés celular (fig. 4). Por lo tanto los niveles normalmente bajos de p53 se incrementan después del daño al DNA y en respuesta a ciertos factores oncogénicos, hipoxia y una variedad de otros tipos de estrés celular. p53 es una proteína anclada a secuencias de DNA específicas la cual activa la transcripción de genes envueltos en el arresto del ciclo celular y en apoptosis. La expresión del inhibidor del ciclo celular p21 es transcripcionalmente activada por p53 y contribuye al arresto dependiente de p53 (16).



**Fig. 4.** Rol de las vías de p53 y p16/pRB en la respuesta a senescencia.

(A) *La ruta de p53 a senescencia.* Causas posibles: el daño al DNA, telómeros disfuncionales, estrés genotóxico del tipo producido por ROS, rutas de señalización que se activan en respuesta al daño por p53 y la transcripción de genes dependientes de p53, todos ellos inducen el arresto del crecimiento típico de senescencia. (B) *La ruta de pRB a senescencia.* Oncogenes y otros tipos de estrés inducen a p16, el cual activa a pRB. pRB establece la represión formando focos de heterocromatina los cuales contienen blancos de E2F y otros posibles genes que promueven el crecimiento (modificado de Campisi J. 2005).

El DNA dañado es detectado por proteínas cinasas efectoras como ATM (Ataxia Talangiectasia Mutada) y ATR (ATM y Rad3-relacionados). ATM reconoce rupturas de doble hebra causadas por radiación ionizante u otros factores. ATR es activada por radiación ultravioleta (UV) y por DNA repetido (12). La activación del punto de control en G2 comienza por la detección del daño al DNA por las moléculas ATM y ATR. La activación de ATM y ATR a su vez activa a CHK2 (Checkpoint Kinasa 2) y CHK1 (Checkpoint Kinasa 1) respectivamente. Las señales de ATM y CHK2 a través de p53, inducen la expresión de p21Cip1/WAF1, varios factores pro-apoptóticos, proteínas de reparación de daño al DNA y de respuesta a estrés oxidativo y la reacción del regulador HDM2 (Human Double Minute-2) (12).

La cinasa de la fosfatidil inositol 3-Kinasa (PI3KK) parece tener una función como un transductor primario de las señales de daño al DNA mediadas por ATM, ATR y la proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-PK). La señal es amplificada por cinasas secundarias como CHK1 y CHK2, y la transducción es también incluida en el ensamble de los complejos de reparación de DNA en el sitio del daño. ATM juega un rol secundario pero es el mediador primario de la respuesta al daño ocasionado por luz UV y en las orquillas de replicación (17).

Ahora bien, algunos autores mencionan que la senescencia replicativa no es un resultado directo de la pérdida del DNA telomérico *per se*, mejor dicho, esta se cree que es dada por la alteración de la estructura de la cromatina del telómero durante el acortamiento y juega un papel importante en inducir la senescencia (15).

#### 2.4 Senescencia p16 dependiente.

La célula expresa durante el ciclo celular el inhibidor p16, este es un regulador positivo de Rb y un supresor de tumores, p16 es inducido por una variedad de estímulos de estrés, incluyendo la sobre-expresión de oncogenes como RAS y condiciones subóptimas de cultivo. Estudios en cultivos celulares indican que p16 previene la reversión de la senescencia por la inactivación de p53, y es requerida por la senescencia inducida por RAS. (14)

En este contexto, la función primaria del complejo Ciclina D/CDK4 es la de fosforilar a Rb, permitiendo la progresión del ciclo celular hacia la fase S, de este modo la expresión de p16 inhibe al complejo Ciclina/CDK y conduce al arresto del ciclo celular, pero es insignificante en la ausencia de la función de Rb (16).

La organización de la heterocromatina es importante para varias funciones nucleares, incluyendo la segregación del cromosoma, la organización nuclear y el silenciamiento de genes. La senescencia asociada a focos de heterocromatina en el DNA, abarca regiones transcripcionalmente inactivas, en estos se empaquetan genes dentro de fibras de DNA densamente compactadas durante la interfase. (10).

En un análisis *in vitro*, realizado por nuestro grupo de trabajo, se encontró que los fibroblastos derivados de pacientes con FPI muestran una proliferación limitada y un aumento en la apoptosis espontánea con respecto a los controles (18). Debido a este hecho, decidimos analizar si los fibroblastos de la FPI se encuentran en un estadio senescente; ya que no existen reportes sobre el papel de la senescencia en la FPI. Además, un hallazgo reciente demuestra que la Ciclina D1 podría estar relacionada, no solamente con la proliferación del ciclo celular sino también con la senescencia (19). Por esta razón decidimos analizar la expresión de la Ciclina D1 en los fibroblastos obtenidos tanto de pulmones normales como fibróticos.

## Objetivos.

\*Analizar la expresión de la Ciclina D1 en fibroblastos de pulmones normales y fibróticos.

\*Observar si hay correspondencia entre el aumento de la expresión de la Ciclina D1 y el desarrollo de la senescencia.

\*Analizar si los focos de fibroblastos en la FPI se encuentran en un estadio senescente.

\*Observar si otros tipos celulares se pueden encontrar en dicho estado.



## **Material y Métodos**

### **Población de estudio.**

Los cortes histológicos de pacientes con FPI se obtuvieron en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y el proyecto fue aprobado por su comité ético con consentimiento escrito de los pacientes. El diagnóstico de FPI se basó en el consenso de la Sociedad Americana de Tórax y de la Sociedad Europea Respiratoria (ATS/ERS) confirmada por biopsia pulmonar a cielo abierto. Se analizaron en total 7 casos de tejidos enbebidos en parafina y 2 casos de tejidos congelados para la tinción con  $\beta$ -galactosidasa de pacientes con FPI y un caso de pulmón normal. Las muestras de pulmón normal (controles) se obtuvieron de biopsias de pulmón de pacientes, a los que se les realizó una lobectomía para la remoción de tumores pulmonares primarios. El fragmento pulmonar que se utilizó para la obtención de fibroblastos fue tomado de tejido sin evidencia histológica de enfermedad y considerado como normal.

### **Obtención de fibroblastos.**

Los fibroblastos de pulmón fibrótico (FPI) y de pulmón normal se aislaron por tratamiento enzimático con tripsina-EDTA a 37° C, 20 minutos. Posteriormente los fibroblastos se sembraron en cajas Falcon de 25 cm<sup>2</sup> con medio F-12K, suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin. Este procedimiento se realizó en el INER. Para obtener los pasajes tardíos, se realizaron divisiones sucesivas en cajas de 9.6 cm<sup>2</sup> de superficie, alcanzando para los cultivos normales el pasaje 29 como máximo y para los cultivos fibróticos el pasaje 15, extrayendo RNA y proteínas, así como tinciones para  $\beta$ -galactosidasa de pasajes intermedios.

## **Extracción de RNA.**

La obtención de RNA de los cultivos celulares se realizó bajo el protocolo establecido para el TRIzol Reagent (Invitrogen). Se utilizó 1 ml de TRIzol por cada 10 cm<sup>2</sup>, homogenizando suavemente la mezcla y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado; las muestras se resuspendieron e incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos, y se centrifugaron a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) a 4° C por 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó 0.5 ml de Isopropanol por cada ml de TRIzol; se homogenizó e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se adicionó 1 ml de Etanol al 75% por cada ml de TRIzol y se resuspendió, se centrifugaron nuevamente a 7,500 rpm a 4° C por 5 minutos, se removió el sobrenadante con suavidad y se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras fueron resuspendidas en agua DEPC (dietilpirocarbonato al 0.1%), de 10 a 15 µl por cada ml de TRIzol.

## **Transcripción reversa.**

Para realizar la RT-PCR primero se cuantificó la muestra, se tomó 1 µl de ésta y se añadió a 499 µl de agua ultrapura (18.2 MΩ), se leyó a una longitud de onda de 260 nm y se obtuvo la concentración de la muestra mediante la siguiente fórmula (20):

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{Abs}_{260\text{nm}} \times \text{Dilución} \times 40)/1,000$$

Una vez cuantificada la muestra, se tomó 1 µg de RNA y se agregó 1 µl de DNAsa (1U/µl) (Invitrogen) para eliminar el DNA genómico

que pudiera interferir con la reacción, también se adicionó 1 µl de amortiguador 10X propio del kit y agua DEPC para un volumen final de 10 µl, se incubó a 25° C durante 15 minutos. Después se adicionó EDTA 10X (ácido etilendiaminotetraacético 25mM) para detener la reacción y se incubó a 65° C por 10 minutos para desnaturalizar a la DNAsa.

Para la reacción de la RT-PCR se utilizo 1µg de RNA tratado con DNAsa, se llevó a un volumen final de 12.5 µl, se añadió 1 µl de hexámeros al azar y se calentó a 70° C por 2 minutos e inmediatamente después, se colocó en hielo. Después se le añadieron los reactivos para la reacción de RT-PCR:

Buffer 5X	4 µl
dNTP's Mix (10 mM)	1 µl
Inhibidor de RNAasa ( 1U/µl)	0.5 µl
MMLV Transcriptasa Reversa	1 µl
RNA tratado con DNAasa (1 µg)	13.5 µl
Volumen final	20 µl

Se mezcló el contenido con la micropipeta e incubó a 42 °C por una hora, después se calentó a 94° C por 5 minutos para detener la reacción, esto en el termociclador. La muestra fue llevada hasta un volumen final de 100 µl con agua DEPC.

### **PCR en tiempo real.**

Para las reacciones de PCR en tiempo real, se diseñaron iniciadores específicos para la Ciclina D1 (85pb) (21), y para el gen RNA18s (187pb) se utilizarón los diseñados por Applied Biosystems, este se utilizó como control para la reacción. El gen RNA 18s fue utilizado para ajustar las diferencias en la cantidad de RNA total en cada muestra. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador Bio Rad, modelo iCycler iQ multicolor Real-Time PCR Detection System.

Se amplificaron los genes 18s y Ciclina D1 mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en ingles) convencional, para establecer las condiciones de amplificación y para realizar las curvas estándar necesarias para la reacción de PCR en tiempo real, se utilizaron las siguientes condiciones para esta amplificación:

Reactivo	Cantidad (µl)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2
Buffer 10X	2.5
dNTP's (50µM)	1.5
Iniciadores Sentido (1.5 µM)	1
Iniciadores Anti-sentido (1.5 µM)	1
Taq Gold (5U/µl)	0.25
Agua	15.75
Muestra (10 ng/µl)	1

Ciclina D1 (35 ciclos)				
95° C	95° C	62° C	72° C	72° C
10 min	15 seg	15 seg	20 seg	5 min

RNA 18s (40 ciclos)			
94° C	94° C	60° C	72° C
2 min	15 seg	1 min	5 min

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1.5%, y purificados mediante el protocolo del reactivo Gene-Clean de la compañía Bio-101, el cual se basa en la eliminación de la agarosa utilizando NaI en solución, y recuperando de esta el DNA mediante el uso de Glassmilk (resina cargada), lavados con New Wash (con base de etanol) para eliminar los residuos de NaI y disolviendo el DNA en agua ultrapura.

Se calculó el número de copias de los productos de PCR, utilizando como base teórica lo siguiente: el peso molecular de un par de bases es de 660 Daltones, cada mol contiene  $6.022 \times 10^{23}$  moléculas y utilizando la siguiente fórmula se obtuvo una

aproximación del número de copias presentes en los productos de amplificación de PCR (22):

$$\text{Copias/ng} = (n \times \text{MW}) / \text{NA} \times 1 \times 10^9$$

n = tamaño del producto amplificado

MW = peso molecular, 660 Daltones por cada par de bases

NA = número de Avogadro  $6.022 \times 10^{23}$

Para determinar los niveles relativos de concentración de RNA en las muestras, se prepararon curvas estándar para la reacción de PCR en tiempo real utilizando diluciones seriales de diez veces el cDNA amplificado por PCR, cubriendo un rango de concentraciones equivalentes desde  $10^{10}$  copias de RNA al equivalente de  $10^1$  copias.

Para la reacción se utilizó 5ng de cDNA con las siguientes cantidades de reactivos para un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  y bajo las condiciones de corrida previamente establecidas en la PCR convencional:

Reactivo	Cantidad ( $\mu\text{l}$ )
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.0
Buffer 10X	2.5
dNTP's (50 $\mu\text{M}$ )	1.5
Iniciadores Sentido (1.5 $\mu\text{M}$ )	1.5
Iniciadores Anti-sentido (1.5 $\mu\text{M}$ )	1.5
SyBR Green 10X	2.5
Fluoresceína (500 $\mu\text{M}$ )	0.5
Taq Gold (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.25

### **Inmunohistoquímica.**

Para la realización de tinción inmunohistoquímica en tejidos embebidos en parafina, se les realizó un tratamiento con Xilol para desparafinarlos, posteriormente fueron rehidratados con etanol

absoluto, al 95% y al 50 % por 5 minutos cada uno, y luego en agua ultrapura por 10 minutos. Se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 30 minutos y lavados con PBS 1X por 5 minutos. Para desenmascarar el antígeno se utilizó amortiguador de citratos (0.01M ácido cítrico pH=6) y se calentó en el horno de microondas a potencia 10 por 4 minutos evitando la evaporación del amortiguador, posteriormente a potencia 3 durante 4 minutos, se dejaron enfriar por 25 minutos y se lavaron con PBS 1X por 5 minutos. Después se incubó con bloqueador universal (Biogenex) 1X diluido en agua durante 10 minutos, se lavaron con PBS 1X por 5 minutos e incubaron con suero normal de borrego (Chemicon) a una concentración de 1:100 en PBS 1X durante 30 minutos. Posteriormente se agregó el anticuerpo de interés diluido a la concentración sugerida por el proveedor en un diluyente comercial (Biomeda) con BSA (Albúmina Sérica Bovina) al 0.1 % y se incubaron en cámara húmeda en obscuridad a 4° C durante toda la noche. Los anticuerpos fueron obtenidos de Millipore/Chemicon para p21 y p53, de Abcam para p16, de Biocare para Ciclina D1.

Al día siguiente se lavaron con PBS 1X + Tween 20 al 0.1% (PBST 1X) por 5 minutos en dos ocasiones, posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo (Super sensitive detection system, Biogenex multilink) por 20 minutos y se lavó con PBST 1X por 5 minutos. Después se incubó con Streptavidin Peroxidase (Biogenex multilink) durante 20 minutos y se lavó con PBST 1X por 5 minutos. Para revelar se utilizó AEC (aminoetilcarbámid) de Biogenex, desde este momento fue monitoreada en el microscopio óptico para detener la reacción. La contratinción fue realizada con Hematoxilina (Biogenex), con una exposición de aproximadamente de 1 minuto, eliminándola después al chorro de agua para sumergirla en bicarbonato de sodio 0.05 M.

## Tinción para reacción con beta-galactosidasa.

Para los cultivos celulares, el protocolo se realizó con el kit de Senescence Cell (SIGMA). Brevemente, a los cultivos celulares se les retiró el medio, se lavó dos veces con PBS 1X y se les adicionó el amortiguador de fijación 1X durante 6-7 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en tres ocasiones con PBS 1X y se les adicionó la solución de tinción. Se incubaron a 37° C por 2 horas sin CO<sub>2</sub> en oscuridad. Se lavaron con PBS 1X y se observaron al microscopio.

En el caso de los tejidos congelados, los cuales se mantuvieron a -70° C para evitar su degradación, se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos, después se sumergieron en buffer de fijación Lac por 10 minutos, y posteriormente en buffer Lac-Z tres veces por 5 minutos. Después se adicionó la solución de tinción y se cubrió con parafilm. Se incubó a 37° C durante toda la noche en cámara húmeda en oscuridad. Al día siguiente se lavó con PBS 1X por 5 minutos en dos ocasiones y se observó al microscopio.

<b>Fijador Lac</b>	
Glutaraldehido (0.25%)	2.4 ml
EGTA (50 mM)	1.9g
MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O (100mM)	2.03g
H <sub>2</sub> O cbp	100 ml

<b>Buffer Lac-Z</b>	
MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O (2mM)	0.041g
Desoxicolato sódico (0.01%)	0.01g
Nonidet P-40 (0.02%)	20 µl
H <sub>2</sub> O cbp.	100 ml

<b>Solución de Tinción.</b>		
Reactivo	Cultivos (µl)	Tejidos (µl)
Solución de tinción	100	200
Reactivo B (400 mM Potasio de Ferricianida)	12.5	25
Reactivo C (400 mM Potasio de Ferrocianida)	12.5	25
X-gal	25	50
Agua	850	700

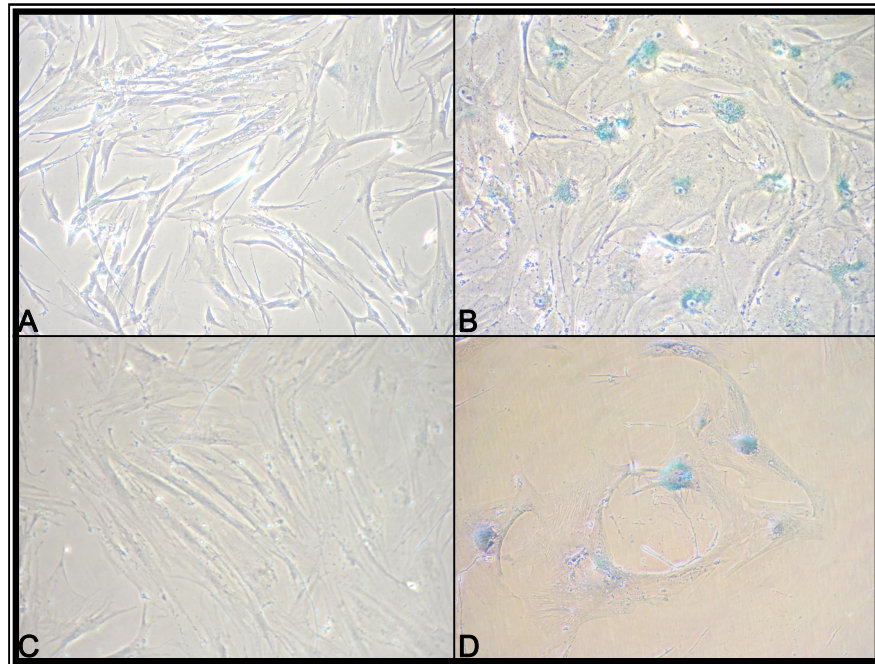
## Resultados

### **Los fibroblastos de pulmón producen $\beta$ -galactosidasa en pasajes tardíos.**

Para analizar si los fibroblastos de pulmón son susceptibles a adquirir el fenotipo senescente, se realizaron múltiples pasajes de distintos cultivos primarios tanto normales como fibróticos. Al realizar los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón normal, se observó que los pasajes tempranos (N13 pasaje 17) no presentan el estado senescente, caracterizado por la reacción de  $\beta$ -galactosidasa; sin embargo, los cultivos de pasajes más avanzados (N13 p29) adquieren dicho carácter, mostrando la tinción azul turquesa, positiva para la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, con localización perinuclear. En los cultivos primarios obtenidos de pacientes con FPI, se obtuvo el carácter senescente en pasajes más tempranos en comparación con los cultivos normales de pasaje semejante (fig. 1).

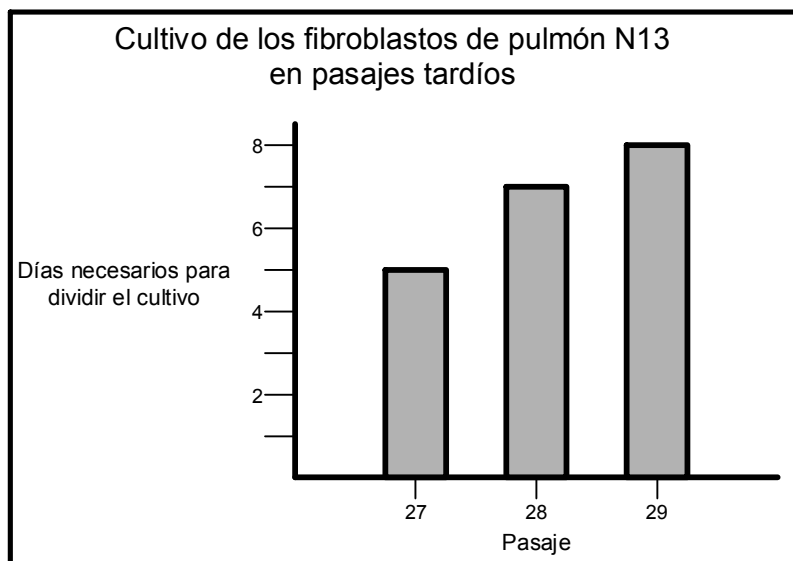
Realizando observaciones del comportamiento de los cultivos, se pudo observar que al ir aumentando el número del pasaje se requería de un mayor tiempo para dividirlo (Gráfica 1), además de que el número de células senescentes se incrementó hasta alcanzar prácticamente el 100% en el último pasaje.





**Fig. 1.** Reacción de  $\beta$ -galactosidasa en cultivos primarios.

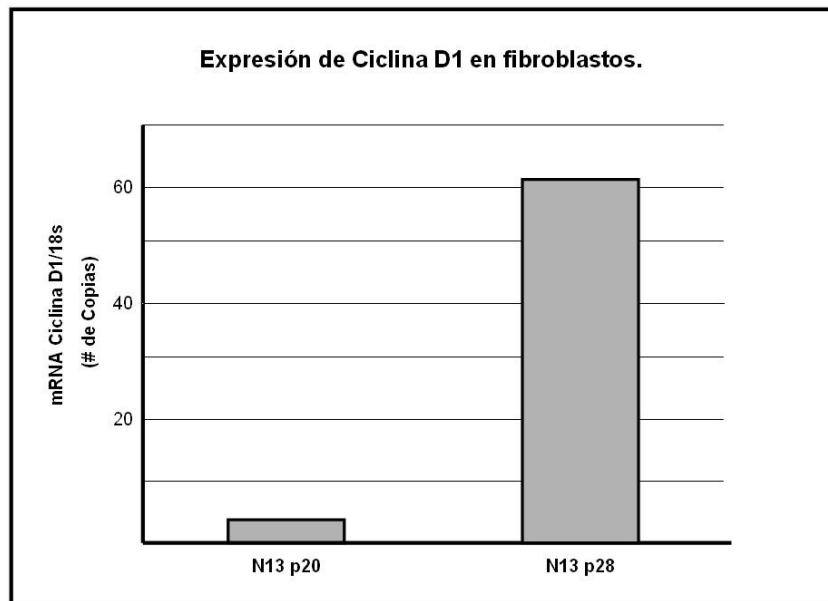
A) Cultivo de N13 pasaje 17, negativa para la reacción. B) Cultivo N13 p29; la reacción fue positiva para la enzima en un alto porcentaje de células. C) Cultivo de N1968 p15 sin marca positiva. D) Cultivo fibrótico HIPF 171 p14 positivo para la reacción en más del 40% de las células. Comparación entre C y D de pasajes semejantes, para determinar el desarrollo del carácter senescente.



**Grafica 1.** Días necesarios para dividir el cultivo al 100% de confluencia con relación al pasaje .

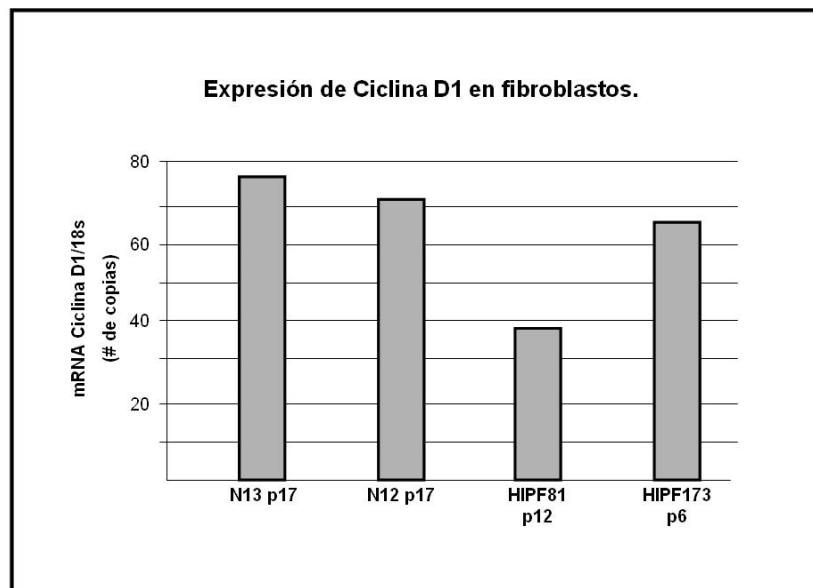
**La Ciclina D1 se encuentra sobre-expresada en los fibroblastos de pulmón de pasaje tardío.**

Burton y colaboradores (19) mostraron que la sobre-expresión de la Ciclina D1 permite la detección de la senescencia en células de musculo liso, por este motivo decidimos analizar si tal fenomeno se cumple tambien en fibroblastos obtenidos de pulmón. Los fibroblastos de pasaje temprano expresan Ciclina D1 como era de esperarse, esto porque sigue participando en el desarrollo celular, sin embargo, los fibroblastos de pasaje tardío muestran un incremento en su expresión (Gráfica 2).



**Gráfica 2.** Análisis de la expresión del ARN mensajero de la Ciclina D1 en fibroblastos normales N13, ajustada contra el ARN 18s, por PCR cuantitativa ( $n \cdot 10^{-4}$ ).

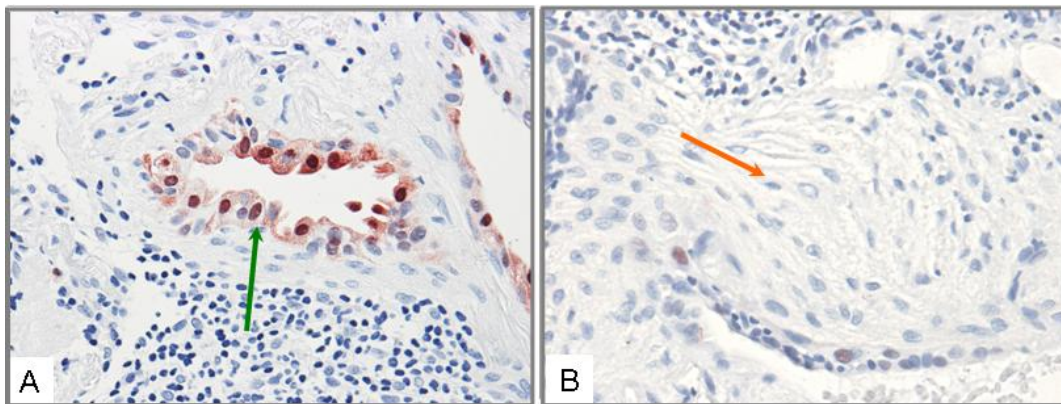
Posteriormente, se compararon los patrones de expresión entre cultivos celulares normales y fibróticos. Los fibroblastos normales de pasaje tardío, muestran una expresión semejante a la de los fibroblastos fibróticos de pasajes tempranos (Gráfica 3). Este dato sugiere que los fibroblastos obtenidos de pacientes con fibrosis podrían sobrevivir un menor número de pasajes que los fibroblastos normales.



**Gráfica 3.** Comparación de los niveles del RNA mensajero de Ciclina D1 entre cultivos normales (N13 p17 y N12 p17) y de pacientes con FPI (HIPF81 p12 y 173 p6). Los niveles del mRNA de cultivos fibróticos de pasajes bajos muestran un valor semejante a los niveles de los pasajes tardíos de los cultivos normales ( $n \cdot 10^{-4}$ ).

## **La Ciclina D1 se encuentra expresada en epitelios en fibrosis pulmonar idiopática.**

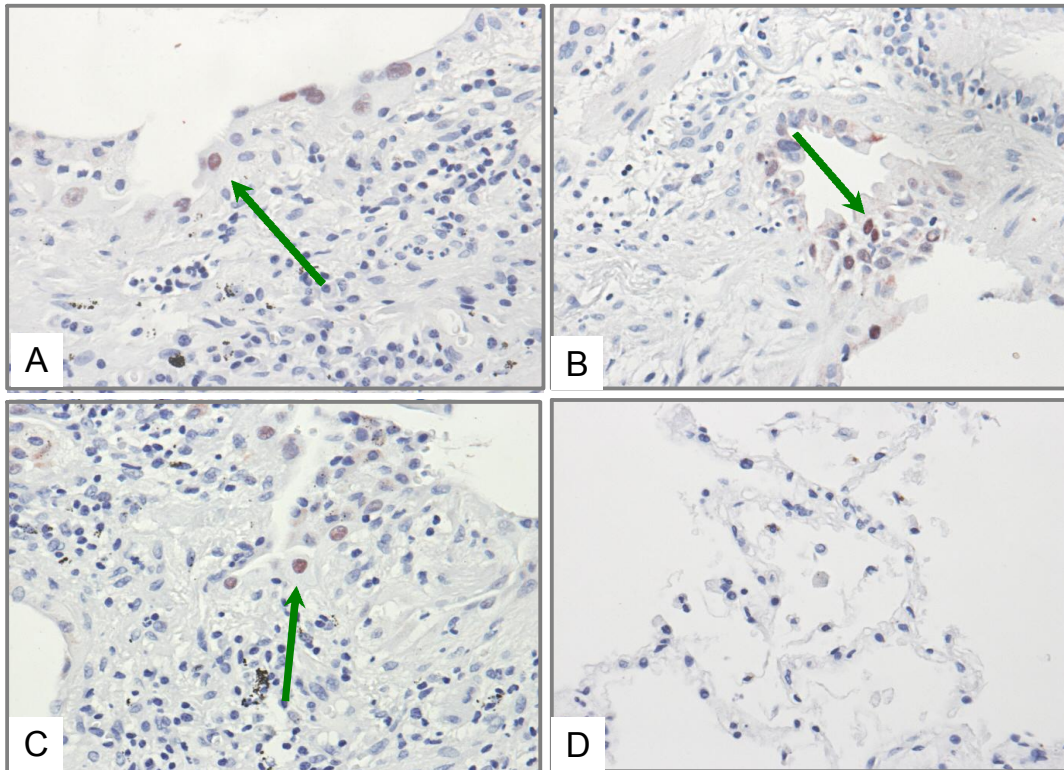
Para conocer si la Ciclina D1 se expresa en fibroblastos y pudiera ser un indicador de senescencia en la fibrosis pulmonar idiopática, decidimos realizar el análisis por inmunohistoquímica. La Ciclina D1 se encuentra expresada en el epitelio alveolar más que en fibroblastos (fig. 2). Esto sugiere que los epitelios podrían ser senescentes ó también que podrían encontrarse proliferando, por esta razón decidimos utilizar más marcadores para senescencia.



**Fig. 2.** Localización de Ciclina D1 en pulmones con FPI. Panel A: tinción epitelial de Ciclina D1; panel B: los focos de fibroblastos resultaron negativos para la tinción específica, se observan algunas células epiteliales teñidas (flechas, aumento 40x).

## **Localización de los marcadores de senescencia p16, p21 y p53.**

La localización celular de p16, p21 y p53, se examinó por inmunohistoquímica (fig. 3). Los marcadores p21 y p53 se expresan de manera mínima en tejidos de fibrosis pulmonar idiopática. Se observa la presencia de p21 y p53 en epitelios y en algunas células del espacio alveolar, que probablemente sean macrófagos o algún otro tipo de célula inflamatoria. Por el contrario, p16 es el único de los marcadores que se detectó en focos de fibroblastos, aunque solo lo pudimos observar en un solo caso, por lo que no es representativo.

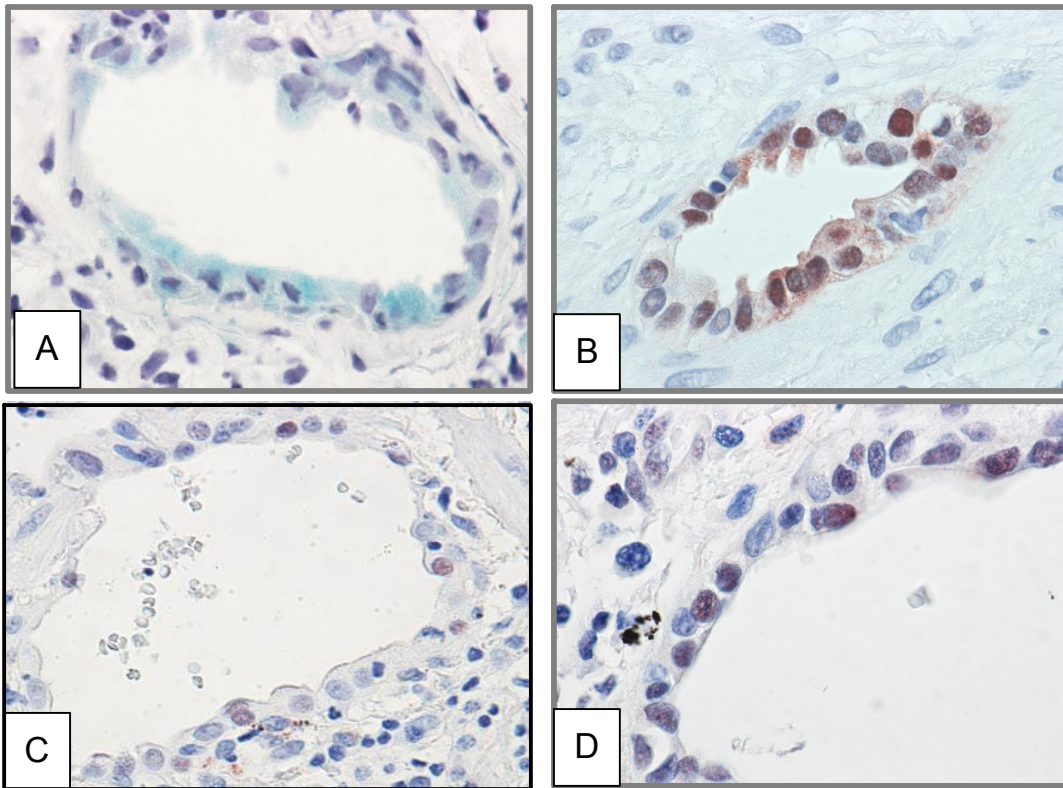


**Fig. 3.** Localización de p16, p21 y p53 en pulmones con FPI. En los tres casos, la tinción ocurrió en diferentes epitelios. Paneles A y C: La marca nuclear contra p21 y p53 respectivamente, se localizó solamente en algunos epitelios metaplásicos, mientras que en los focos de fibroblastos no se encontró marca; panel B: la tinción nuclear para p16 se localizó en epitelio bronquiolar; panel D: en pulmón normal no se detectó señal para estas moléculas. (aumento 40x).

### **Localización de células senescentes en tejidos de FPI por reacción con $\beta$ -galactosidasa.**

Para corroborar las observaciones realizadas por inmunohistoquímica, utilizamos la técnica de tinción con  $\beta$ -galactosidasa en tejidos congelados de pacientes con FPI, la tinción tiñe principalmente en células epiteliales alveolares y en células inflamatorias, presentes en la luz alveolar (fig. 4). Esto sugiere que,  $\beta$ -galactosidasa, co-localiza con p21 y p53, que son los marcadores de senescencia, sugiriendo que las células

epiteliales alveolares son el tipo celular que se encuentra senescente en la fibrosis pulmonar idiopática.



**Fig. 4.** Detección de células senescentes en tejidos congelados. Para la detección (panel A), se utilizó la reacción para la  $\beta$ -galactosidasa, el resto de los paneles en esta figura se utilizaron para comparar la tinción de senescencia tinciones de inmunohistoquímica. Panel A: La reacción se localizó en células epiteliales, mientras que los focos de fibroblastos no presentan la tinción azul turquesa de la reacción; panel B: tinción epitelial para Ciclina D1; panel C: tinción epitelial para p53; panel D: tinción epitelial para p21 (aumento 100x).

## Discusión.

La FPI es una enfermedad crónica y progresiva caracterizada por una remodelación tisular aberrante en la cual, no hay datos a la fecha que revelen el papel de la senescencia en este tipo de fibrosis.

En este estudio, se identificó a las células senescentes en pulmones fibróticos y se analizó que sucede con los fibroblastos, los cuales son un tipo celular que inicialmente prolifera en respuesta a un daño, posiblemente epitelial siendo el responsable del depósito de matriz extracelular que conlleva a la fibrosis pulmonar, la cual involucra cambios dramáticos en todos los componentes celulares del pulmón, esto comienza con daño y muerte celular de epitelios alveolares, seguido de migración de fibroblastos e invasión de células inflamatorias.

Como ya se ha demostrado, los cultivos de fibroblastos son capaces de desarrollar el carácter senescente de forma natural, esto es debido a que las regiones teloméricas se acortan conforme aumenta el número de pasajes (senescencia replicativa [23]). Esto lo pudimos observar en cultivos normales, después de un alto número de divisiones; en contraste, el desarrollo de la misma en los cultivos de fibroblastos fibróticos se alcanza en pasajes mucho más tempranos que los normales, de tal manera que en dichos pasajes, las células detienen su proliferación y se vuelven senescentes como lo demuestra la tinción para  $\beta$ -galactosidasa.

Un hallazgo interesante encontrado en este análisis, revela que una molécula que en apariencia no tendría relación con este estadio, se encuentra sobre-expresada en fibroblastos senescentes comparados con el control; se pudo corroborar que aumenta la expresión del mensajero conforme aumenta el pasaje,

coincidiendo con el desarrollo del carácter senescente. Está molécula es la Ciclina D1, la cual participa activamente durante el ciclo celular, en complejo con la CDK4; una evidencia reciente (19), sugiere que la Ciclina D1 puede funcionar como un marcador para senescencia en células de músculo liso asociadas a vaso, de tal manera que en este estudio, decidimos abordar este punto y encontramos que sorprendentemente, los niveles del mensajero se encuentran muy elevados en fibroblastos de pulmón con pasajes tardíos comparados contra pasajes menores. Ahora bien, ¿Por qué estaría una molécula asociada a ciclo celular participando en un proceso en el cual se detiene la proliferación? Aún no hay respuesta para ello. Puede haber varias causas: una de ellas puede ser que la Ciclina D1 se acumule en citoplasma, debido a que por alguna razón, los complejos que la degradan no la reconozcan para dicha degradación. Cabe mencionar que se ha observado que la Ciclina D1 se encuentra activa a nivel nuclear, y que cuando se ha observado en células senescentes, se encuentra en el citoplasma, esto en cultivos *in vitro* (24).

Al observar esto, se decidió comparar los niveles del mensajero con cultivos primarios de fibroblastos de pulmón fibrótico. Por observaciones en nuestro laboratorio, se sabe que los fibroblastos de pulmón fibrótico suelen tener un menor número de pasajes en cultivo, así que al comparar con los normales, se reflejó una expresión semejante del mensajero de Ciclina D1 en los cultivos fibróticos de pasajes tempranos comparados con la expresión de pasajes más avanzados de cultivos normales, esto coincide con el desarrollo más temprano de la senescencia en los cultivos fibróticos. Por este hecho, tendríamos que los fibroblastos de pacientes fibróticos llegan al periodo de senescencia más rápido. Esto puede deberse a que dichos cultivos presentan alguna alteración propia de la patología. Xia y colaboradores (25), sugieren por ejemplo que, la interacción de los fibroblastos de la FPI con colágena vía integrinas, provoca un reclutamiento



deficiente de PTEN a la membrana plásmática. PTEN es un inhibidor de la vía fibroproliferativa de PI3K-Akt, de manera que esta vía se activa de manera aberrante en los fibroblastos de pacientes con FPI, contrario a lo que sucede en fibroblastos controles. Así, este tipo de alteraciones pudieran estar ocasionando que los fibroblastos en la fibrosis pulmonar idiopática, se encuentren en constante proliferación en el tejido aberrante y debido a esto, al extraerlos para realizar cultivos primarios se encuentre mermado su poder de proliferación *in vitro*. Esto nos sugiere que, dentro de la histopatología, los fibroblastos que se encuentran participando, alcanzan la senescencia en periodos mucho más cortos *in vitro*, debido a que la proliferación de los focos de fibroblastos no es lenta ni limitada, sino al contrario, estos ya llevan un periodo prolongado de replicación constante, al contrario de los obtenidos de pulmón normal que se encuentran posiblemente en quiescencia, por lo que la proliferación de este tipo celular resulta predominante para el desarrollo de la enfermedad.

Por esta razón, evaluamos Ciclina D1 en cortes histológicos de pacientes con FPI y para nuestra sorpresa, encontramos a la Ciclina D1 ampliamente expresada en células epiteliales alveolares. Königshoff y colaboradores (26) han descrito que en los epitelios de la FPI se encuentra activa la vía de señalización canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina, bajo la cual está dirigida la síntesis de Ciclina D1, y esto concuerda con nuestro hallazgo. Los autores describen además que Ciclina D1 se encuentra incrementada en la FPI, pero no describen que tipos celulares la expresan. En otra publicación, Chilosy y colaboradores (11) mencionan que la MMP-7 (matrilisina) y Ciclina D1 “fueron expresadas solamente en una proporción de células”, ilustrando la localización de la Ciclina D1 en epitelios bronquiolares. La función de la Ciclina D1 en la proliferación es bien conocida: debe funcionar en núcleo. Según un reporte anteriormente citado (19), la Ciclina D1 se sobre-expresa

en células senescentes, localizándola fuera del núcleo, es decir en la región citoplásmica. Nosotros la apreciamos mayormente localizada en núcleo, por lo que estos epitelios podrían estar proliferando.

Para corroborar el hecho de que los fibroblastos podrían encontrarse proliferando y no en estado senescente, utilizamos a los marcadores más comunes para senescencia: p16, p53 y p21. Los marcadores para senescencia no dan señal positiva en fibroblastos de FPI. Esto concuerda con las observaciones de Xia y colaboradores (25) que mencionan la activación de PI3K-Akt, una vía fibroproliferativa. Así pues, no encontramos señales de senescencia en focos de fibroblastos; además no son localizados en toda la variedad de epitelios que producen Ciclina D1. En el caso de p53 y p21, su localización es mínima, aunque su detección es particular en epitelios compuestos por células alveolares metaplásicas (al igual que Ciclina D1). Esto podría significar que este tipo celular se encuentra en estadio senescente.

Se ha reportado anteriormente que p53 y p21 son positivas para células epiteliales hiperplásicas en FPI, y que estas pueden estar involucradas en la apoptosis de estos epitelios, ya que colocalizan con moléculas apoptóticas (11). Al igual que en este trabajo, encontramos que p21 fue positiva para más células que p53, lo que podría implicar una ruta alterna para p21.

En otro reporte, Qunn y Colaboradores (27), detectan a p53 en células basales hiperplásicas, metaplasia escamosa de lesiones en panal de abeja, y ocasionalmente en el epitelio bronquial y en el epitelio bronquio-alveolar. La presencia de esta proteína en estas regiones es manejada por estos autores como una mutación de p53 que puede dar origen a adenocarcinomas presentes en la FPI. Demopoulos y colaboradores (28), mencionan que, p53 puede no solo intervenir en un proceso carcinogénico, sino también en

procesos inflamatorios. En algunos casos, p16 fue localizada en focos de fibroblastos, sin embargo, esto fue mínimo. Posiblemente algunos fibroblastos presentes en focos puedan presentar el estadio senescente, pero esto seguramente no es común. Lo que si queda claro, es que las células epiteliales son altamente reactivas, y que posiblemente muchos de los epitelios hiperplásicos y metaplásicos se encuentran en procesos de daño al DNA.

Para corroborar estos resultados, realizamos la tinción para  $\beta$ -galactosidasa en tejidos congelados y apreciamos que efectivamente, las células que se encuentran senescentes son las células epiteliales metaplásicas que habíamos detectado tanto con los marcadores para senescencia como con la Ciclina D1.

Adicional a esto, en un estudio previo (29), nuestro grupo detectó que Ki-67, un marcador de proliferación celular, se encuentra presente en algunas células epiteliales alveolares (epitelios hiperplásicos y metaplásicos) y en focos de fibroblastos, mientras que p27, se encuentra presente en células inflamatorias y endoteliales.

El haber encontrado la Ciclina D1 y la tinción de  $\beta$ -galactosidasa localizada solo en los epitelios nos revela que el cambio en los patrones de expresión génica del epitelio, se podría deber en parte al estrés oxidativo, el cual genera daño al DNA, y que la vía de p21 y p53 es primordial para el desarrollo de la misma, esta vía es activada principalmente por daño al DNA ocasionado por ROS. Por otro lado, la Ciclina D1 podría servir como marcador de senescencia *in vitro*, no solo de células de músculo liso (22), sino también de fibroblastos.

## Conclusiones.

Estos resultados en conjunto, nos permiten responder a la pregunta planteada en un principio; en la fibrosis pulmonar idiopática ¿los focos de fibroblastos se encuentran senescentes?, la respuesta es no. Este dato nos sugiere que, dentro de la histopatología, se produce la proliferación de los focos de fibroblastos, por lo que dicho evento sumado a la migración de este tipo celular es predominante para el desarrollo de la enfermedad.

En síntesis, podemos deducir de estos resultados que:

Los fibroblastos de pulmón normal también desarrollan la senescencia *in vitro*, esto después de múltiples divisiones.

Los fibroblastos de pulmón fibrótico desarrollan la senescencia en un periodo mucho menor que los de pulmón normal *in vitro*.

Existe una correlación entre el aumento del mensajero de la Ciclina D1 y el desarrollo de la senescencia.

Los fibroblastos en la FPI tienen una proliferación muy activa, dentro de la patología.

El epitelio bronquio-alveolar metaplásico podría ser no proliferativo, pero estar metabólicamente activo debido a la senescencia.

## Bibliografía.

- 1.- Selman M and Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. **Respir Res**. 2002. 3: 3.
- 2.- Pardo A and Selman M. Molecular Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. **Front Biosci**. 2002. 7: 1689-1707.
- 3.- Selman M, King T and Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about its Pathogenesis and Implications for Therapy. **Ann Intern Med**. 2001. 134: 136-151.
- 4.- Walters D, Cho HY and Kleeberger SR. Oxidative Stress and Antioxidants in the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis : A Potential Role for Nrf2. **Antioxid Redox Signal**. 2008. 10: 321-329.
- 5.- Selman M, Thannikal VJ, Pardo A, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Pathogenesis and Therapeutic Approaches. **Drugs**. 2004. 64: 405-430.
- 6.- Plataki M, Koutsopoulos A, Darivianaki K, et al. Expression of Apoptotic and Markers in Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Chest**. 2005. 127: 266-274.
- 7.- Lok S, Stewart J, Kelly B, et al. Epstein-Barr Virus and wild p53 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Respir Med**. 2001. 95: 787-791.
- 8.- Chilosi M, Poletti V, Zamó A, et al. Aberrant Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Am J Pathol**. 2003. 162: 1495-1502.

- 9.- Massagué J. G1 Cell-Cycle Control and Cancer. **Nature**. 2004. 432: 298-306.
- 10.- Lee MH and Yang HY. Regulators of G1 Cyclin-dependent Kinases and Cancer. **Cancer Metastasis Rev**. 2003. 22: 435-449.
- 11.- Campisi J and D'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Rev Mol Cell Biol**. 2007. 8: 729-740.
- 12.- Campisi J. Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. **Cell**. 2005. 120; 513-522.
- 13.- He L, He X, de Stanchina E, et al. MicroRNAs join the p53 network-another piece in the tumour-suppression puzzle. **Nature**. 2007. 7: 819-822.
- 14.- Narita M, Nuñez S, Heard E, et al. Rb- Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. **Cell**. 2003. 113: 703-716.
- 15.- Ishikawa F. Cellular Senescence, an Unpopular yet Trustworthy Tumor Suppressor Mechanism. **Cancer Sci**. 2003. 94: 944-947.
- 16.- Serrano M, Lin A, McCurrach M, et al. Oncogenic Ras Provokes Premature cells Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. **Cell**. 1997. 88: 593-602.
- 17.- Herbig U, Jobling W, Chen B, et al. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53 and p21, but Not p16. **Mol Cell**. 2004. 14: 501-513.

- 18.- Ramos C, Montaña M, García-Alvarez J, et al. Fibroblast from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Lungs Differ in Growth Rate, Apoptosis and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Expresión. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2001. 24: 591-598.
- 19.- Burton D, Sheerin A, Ostler E, et al. Cyclin D1 Overexpression Permits the Reproducible Detection of Senescent Human Vascular Smooth Muscle Cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 2007. 1119: 20-31.
- 20.- Farrell Robert Jr. RNA Methodologies. Second Edition. Academic Press. California. USA. 1998. 533 pp.
- 21.- García V, García J, Peña C, et al. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome. **Cancer Lett**. 2008. 263: 312-320.
- 22.- Lozano Bolaños Alfredo. Análisis de la Expresión de MMP-7, MMP-8, MMP-14, MMP-19 y TIMP-1 en el Modelo de Fibrosis Pulmonar Inducida por Bleomicina en Raton (*Mus musculus*). Tesis Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 2008.
- 23.- Ramirez R, Herbert B, Vaughan M, et al. Bypass of Telomere-dependent Replicative Senescence (M1) upon Overexpression of Cdk4 in Normal Human Epithelial Cells. **Oncogene**. 2003. 22: 433-444.
- 24.- Fu M, Wang C, Li Z, et al. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Function. **Endocrinology**. 2004. 145: 5439-5447.
- 25.- Xia H, Diebold D, Nho R, et al. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lungs fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **J. Exp. Med**. 2008. 205: 1659-1672.

26.- Königshoff M, Balsara N, Pfaff EM, et al. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. **PLoS ONE**. 2008. 3: e2142.

27.- Qunn L, Takemura T, Ikushima S, et al. Hyperplastic epithelial foci in honeycomb lesions in idiopathic pulmonary fibrosis. **Virchows Arch**. 2002. 441: 271-278.

28.- Demopoulos K, Arvanitis DA, Vassilakis DA, et al. MYCL1, FHIT, SPARC, p16INK4 and TP53 genes associated to lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. **J. Cell Mol. Med**. 2002. 6: 215-222.

29.- Selman M, Ruiz V, Cabrera S, et al. TIMP-1, -2, -3 y -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2000. 279: L562-L574.