



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

PAPEL DE SONIC HEDGEHOG EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS
PULMONAR IDIOPÁTICA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ALFREDO LOZANO BOLAÑOS

DIRECTOR DE TESIS
DR. MOISÉS SELMAN LAMA
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE MEDICINA
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“No es signo de buena salud estar bien adaptado a una sociedad
profundamente enferma”*

Jiddu Krishnamurti

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi familia (Beatriz, Alejandro, Sandra e Isaac) que me apoyaron bastante, también quiero agradecer a mis tíos, primos, sobrinos, y a mi abuela que siempre están alentándome.

A mis amig@s: Edwin, Karla, Juan, Cisteil, Yolitzi, Carlos, Alex, Esthela, Ale, Diana, Larisa. Con ustedes me divertí mucho y me distrajeron bastante aun cuando las cosas no iban bien.

A Sandra Cabrera por tu apoyo y buenos consejos, incluso desde España. Porque tienes criterio amplio y propio; y es lo que te hace salir del patrón. Espero poder volver a trabajar contigo algún día.

A mi tutor Dr. Moisés Selman por acercarme las herramientas necesarias para la realización de este proyecto y asombrarme con su capacidad para elaborar hipótesis y llevarlas a cabo en instantes. Espero que se me haya impregnado algo.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dr. Emilio Rojas y Dra. Amie Pardo que siempre enriquecieron mi trabajo.

A José Cisneros (Pp) y a todos los integrantes del laboratorio de Biología Celular que me apoyaron.

A Ana Mayela (bicho) por hacer un ambiente jovial y relajado.

A Alma Reyes y a Don Robert que siempre me ayudaron y me mantuvieron comunicado.

A los doctores: Joaquin Zúñiga, Miguel Gaxiola, Carmen Navarro, Enrique Espinosa, Lourdes Barrera, Ivette Buendía que directa o indirectamente contribuyeron en mi formación académica.

A Lulú Aguilera simplemente por tu enorme sonrisa.

A Remedios y Jorge que siempre me recibieron en la Facultad de Ciencias.

Al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la mejor universidad de México.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
<i>Moléculas Hedgehog</i>	4
<i>Biosíntesis y Estructura de Sonic Hedgehog</i>	4
<i>Mecanismos de Transducción de Señales de Hedgehog</i>	5
<i>Genes Blanco de la Vía de Señalización Sonic Hedgehog</i>	7
<i>Otras Proteína Reguladoras de la Vía</i>	9
<i>Desarrollo Pulmonar</i>	9
<i>Sonic Hedgehog en el Desarrollo Pulmonar</i>	9
<i>Sonic Hedgehog y Enfermedad Pulmonar</i>	11
<i>Fibrosis Pulmonar Idiopática</i>	12
<i>Fibrosis Pulmonar Idiopática y Sonic Hedgehog</i>	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL.....	17
<i>Objetivos Particulares</i>	17
METODOLOGÍA	18
<i>Población de Estudio</i>	18
<i>Inmunohistoquímica</i>	18
<i>Cultivos Celulares</i>	19
<i>Microscopía de Disección con Láser</i>	20
<i>RT-PCR y PCR en Tiempo Real</i>	20
<i>Western-Blot</i>	21
<i>Tasa de Crecimiento</i>	22
<i>Ensayo de Migración Celular</i>	23
<i>Ensayo de Apoptosis por Citometría de Flujo</i>	24
<i>Evaluación de Marcadores de Apoptosis</i>	25
<i>Transición Epitelio-Mesénquima</i>	25
<i>Zimografía</i>	25
<i>Análisis Estadístico</i>	26
RESULTADOS.....	27
<i>Diferentes Componentes de la Ruta de Señalización de Sonic Hedgehog (SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2) se Sobre-expresan en Pulmones de Pacientes con FPI</i>	27
<i>Inmunolocalización de SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2 en Tejidos Pulmonares con FPI y Normales</i>	28
<i>Sonic Hedgehog Activa la Ruta Canónica en Fibroblastos Normales y de FPI</i>	28

<i>Fibroblastos de Pacientes con FPI Sobre-expresan los Principales Componentes de la Ruta de Señalización de SHH</i>	32
<i>SHH Incrementa la Tasa de Crecimiento de Fibroblastos Normales y FPI.</i>	33
<i>SHH Incrementa la Expresión de Moléculas de Matriz Extracelular</i>	34
<i>SHH Protege a los Fibroblastos de la Apoptosis Inducida por TNFα/INFγ/FAS</i>	36
<i>SHH Induce la Migración de Fibroblastos</i>	38
<i>SHH no Induce la Transición Epitelio-Mesénquima en la Línea A549</i>	39
<i>SHH no Induce Cambios en la Actividad Gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en la Línea A549</i>	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
LISTA DE ABREVIATURAS.....	58
ANEXO (Artículo).....	61

RESUMEN

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar de causa desconocida, generalmente progresiva, irreversible y letal en un plazo breve de tiempo. Aunque los mecanismos patogénicos no se conocen, se ha propuesto que la reacción fibrótica progresiva en la FPI está relacionada con un proceso de activación de fibroblastos dependiente del epitelio alveolar. Recientemente, con base en el análisis global de expresión génica por microarreglos, se encontró que los pulmones de pacientes con FPI se encontraban enriquecidos con genes asociados a vías de señalización embrionarias; uno de los genes que se encontró sobre-expresado fue PTCH1, el receptor de Sonic Hedgehog (SHH). SHH desempeña un papel importante en el desarrollo pulmonar y se ha observado en el epitelio alveolar de tejidos con FPI. En este contexto, decidimos evaluar el patrón de expresión de diversos componentes de la ruta de señalización de SHH, así como analizar diferentes efectos funcionales de SHH (proliferación, migración, apoptosis, síntesis de colágena) en fibroblastos pulmonares. Para ello analizamos la expresión génica de SHH, PTCH1, el co-receptor Smoothened (SMO), y los factores de transcripción GLI1 y GLI2 en pulmones de pacientes con FPI y de pulmones normales por PCR en tiempo real. Además, analizamos por inmunohistoquímica, la localización celular de estos mismos componentes. Asimismo, exploramos *in vitro* por PCR en tiempo real el efecto de SHH sobre la expresión génica de colágena tipo I $\alpha 1$ y fibronectina en fibroblastos obtenidos de pulmones con FPI y de pulmones normales. Evaluamos la tasa de crecimiento con el reactivo WST-1 sobre fibroblastos normales y con FPI estimulados con la proteína recombinante humana SHH. Cuantificamos la migración inducida por SHH en fibroblastos de pulmón, mediante el uso de cámaras Boyden revestidas con colágena y la síntesis de colágena con el método de Sircol. Nuestros resultados mostraron que los principales componentes de la vía de señalización SHH están sobre-expresados en pulmones con FPI y en fibroblastos FPI, con excepción de SMO. SHH incrementó significativamente la proliferación y la migración de fibroblastos, la cual fue parcialmente dependiente del factor quimiotáctico PDGF-BB. Además, SHH acrecentó la expresión génica y la síntesis de colágena tipo I $\alpha 1$, así como los niveles de fibronectina en fibroblastos pulmonares. Interesantemente, SHH protegió a los fibroblastos de la

apoptosis inducida por TNF α /IFN γ /FAS lo que correlacionó con la disminución de la caspasa-3 activa entre otras moléculas pro-apoptóticas. SHH no tuvo ningún efecto en la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto ni tampoco en la transición epitelio mesénquima. Estos resultados muestran que la vía SHH se encuentra expresada y opera durante la FPI por lo que inhibirla podría ser una prometedora estrategia terapéutica para ésta devastadora enfermedad.

ABSTRACT

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a progressive, chronic and lethal lung disease of unknown cause. Although, the pathogenic mechanisms are uncertain, it has been proposed that the progressive fibrotic reaction in IPF is related to a fibroblasts activation process alveolar epithelium-dependent. Recently, based on gene expression global analysis by microarrays it was found that the lungs of patients with IPF were enriched with genes related to developmental pathways; one of the over-expressed genes was PTCH1, the Sonic Hedgehog (SHH) receptor. SHH plays an important role in lung development and has been observed in alveolar epithelium of tissues with IPF. In this context, we decided to evaluate the expression pattern of core components of SHH signaling pathway in lung tissues, and to analyze the effect of SHH on different functional processes of lung fibroblasts (proliferation, migration, apoptosis, collagen and fibronectin expression). The gene expression of SHH, PTCH1, the co-receptor SMO, and the transcription factors GLI1 and GLI2 was evaluated by real time PCR in IPF and normal lungs and fibroblasts. The cell localization of the core components of the pathway in IPF and normal lungs was examined by immunohistochemistry. The effect of human SHH recombinant on fibroblasts growth rate was evaluated with WST-1 salt and fibroblasts migration was explored using Boyden chambers coated with collagen. Collagen synthesis was evaluated with Sircol assay. Our results showed that all the core components of the Sonic Hedgehog signaling were overexpressed in IPF lungs and fibroblasts with the exception of SMO. *In vitro*, SHH significantly increased the proliferation and migration of fibroblasts, the later partially dependent on the chemotactic factor PDGF-BB. Furthermore, SHH increased the gene expression and synthesis of type I collagen $\alpha 1$ and also raised the expression levels of fibronectin. Interestingly, SHH protected fibroblasts from TNF α /IFN γ /FAS-induced apoptosis which correlated with the decrease of active caspase-3 and other pro-apoptotic molecules. SHH had no effect on fibroblast differentiation into myofibroblasts neither in the epithelial-mesenchymal transition. Furthermore it is shown that SHH-signaling pathway is expressed and operates during IPF, therefore inhibiting Sonic signaling might be a good therapeutic strategy.

INTRODUCCIÓN

Moléculas Hedgehog.

La ruta de señalización Hedgehog (Hh) fue reportada por primera vez en la mosca de fruta *Drosophila melanogaster*, en 1980.¹ Esta mosca posee un único gen *hedgehog* que al mutarlo, se observó que afectaba el patrón de la cutícula larval dando como resultado un embrión cubierto por procesos cuticulares puntiagudos denominados dentículos, inspirando el nombre de “hedgehog”. Los genes que codifican para las proteínas Hh han sido caracterizados posteriormente en diferentes especies. En vertebrados, la duplicación del genoma dio origen a múltiples genes *hedgehog* y así, existen tres genes *hedgehog* en mamíferos y cinco en el pez cebra, siendo el más estudiado en ambos casos el *sonic hedgehog*. Aunque existen algunas diferencias evolutivas, los mecanismos de señalización en general, se encuentran altamente conservados en la mayor parte del reino animal con excepción de los gusanos nematodos en donde no están presentes.

Biosíntesis y Estructura de Sonic Hedgehog.

Las proteínas Hh recién sintetizadas presentan múltiples pasos de procesamiento post-traduccionales. SHH es sintetizada como una proteína de 45 kDa, la cual pierde la secuencia señal en el dominio N-terminal. Tras entrar a la ruta de secreción, la proteína sufre una reacción de procesamiento autocatalítica (un mecanismo tipo inteína¹). Aunque muchas características del autoprocesamiento de Hh fueron dilucidados por estudios en la proteína hedgehog de *Drosophila*, los mecanismos bioquímicos y funcionales probablemente aplican para las proteínas Hh de todas las especies. El dominio C-terminal de Hh cataliza su propia eliminación y reemplazo por colesterol, este dominio C-terminal no tiene funciones adicionales conocidas. El rompimiento resulta en un fragmento N-terminal de 19 kDa al que se une covalentemente en su C-terminal un grupo colesterol.² El fragmento N-terminal de Hh también es palmitoilado en un residuo de cisteína cerca del dominio N-terminal por la proteína del retículo endoplásmico *Skinny hedgehog* (Ski, también conocida como *sightless*, *rasp* o *central missing*).³ Muchas otras moléculas son modificadas

¹**Inteínas:** (Proteínas intrónicas) Dominios enzimáticamente activos que se escinden por sí mismos de la proteína precursora, uniendo los fragmentos de la proteína (las “exteínas”) de cada lado.

lipídicamente, sin embargo hasta ahora las proteínas Hh son las únicas que poseen una unión covalente en el extremo C-terminal a colesterol.⁴ Ambas modificaciones lipídicas (colesterol y palmitoilación) son necesarias para generar una proteína completamente activa⁵ (**Figura 1**).

La liberación de la proteína Hh de las células, requiere de la actividad de *Dispatched* (DISP) una proteína con 12 dominios transmembranales. DISP podría también actuar para promover el ensamblaje de Hh en complejos multiméricos tipo micelas o su incorporación dentro de partículas lipoproteicas. Ambos casos, han sido propuestos para facilitar el movimiento de moléculas Hh lejos de sus células secretoras, un proceso que parece requerir la interacción entre la proteína modificada y proteoglicanos tipo heparán sulfato.^{6, 7}

Mecanismos de Transducción de Señales de Hedgehog.

Se han identificado tres homólogos de Hh con patrones de distribución espacio-temporal diferentes en humanos: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) y Desert Hedgehog (DHH).^{8, 9} La cascada de señalización de Hh inicia por su unión a la proteína Patched 1 (PTCH1) en la célula blanco. Ésta unión se ve favorecida por otras dos proteínas que poseen sólo un dominio transmembranal conocidas como CDO (CAM-related 1 downregulated by oncogenes) y BOC (brother of CDO) en vertebrados.⁶ Patched presenta dos isoformas en vertebrados, PTCH1 y PTCH2, siendo PTCH1 el principal receptor. En ausencia del ligando Hh, PTCH1 reprime la actividad de Smoothened (SMO), un receptor tipo GPCR (receptor acoplado a proteína G)¹⁰ supuestamente previniendo su localización en la membrana celular.

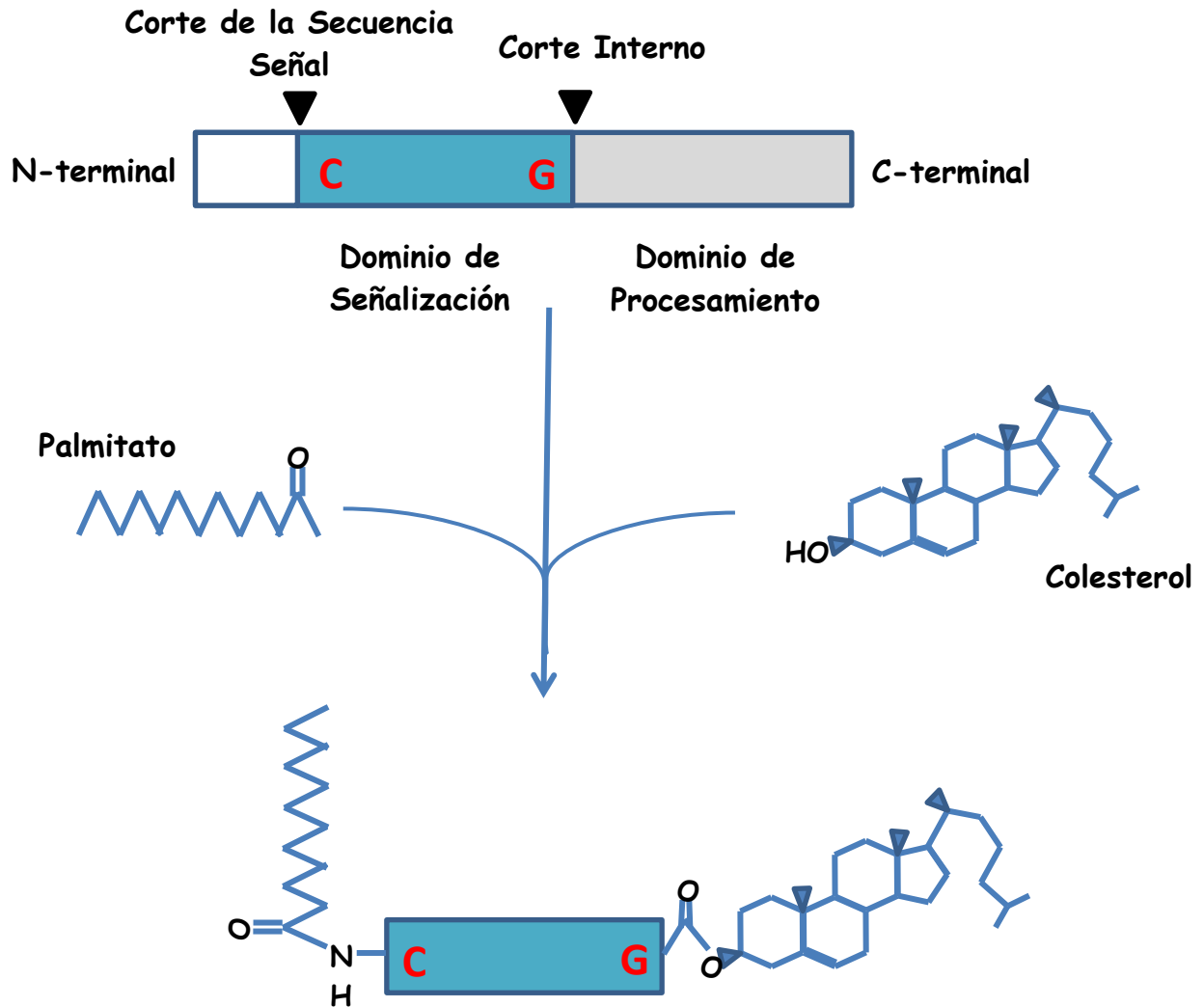


Figura 1. Biogénesis del procesamiento de Hh y modificaciones lipídicas. El dominio de señalización N-terminal es generado por la eliminación del dominio de procesamiento C-terminal en un residuo interno de glicina. Este rompimiento está ligado a una modificación covalente por colesterol a la glicina expuesta. El palmitato se añade a la cisteína del N-terminal por un procesamiento catalítico que involucra a Skinny hedgehog, una *O*-aciltransferasa de membrana. Figura modificada de referencia².

La unión del ligando Hh a PTCH1 impide la inhibición de SMO, permitiendo que la señalización de Hh sea transmitida vía un complejo proteico que incluye, en *Drosophila*, componentes específicos de la ruta, tales como la proteína tipo cinesina atípica Costal 2 (Cos2), Fused (Fu), una proteína cinasa de serina-treonina, Supresor of Fused (SuFu) y el factor de transcripción con dedos de zinc Cubitus interruptus (Ci). Ci está regulado a diferentes niveles vía fosforilación por cinasas, como la proteína cinasa A

(PKA), glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK3 β) y caseína cinasa 1a (CK1a), que tienen un papel crucial en el procesamiento, actividad y localización nuclear de Ci. En ausencia de la señalización de Hh, Ci es fragmentado, y el fragmento amino terminal resultante actúa como un inhibidor de los genes blanco de Hh. En cambio, en presencia de Hh se abate el rompimiento de Ci y la molécula completa ejerce sus efectos de activador transcripcional de los genes blanco de Hh.^{8, 9, 11-14} Sin embargo, la situación es un poco diferente en vertebrados, ya que Cos2 y Fu que son proteínas cruciales en la señalización en *Drosophila*, parece que no están conservadas en mamíferos. Además, la vía de señalización de Hh en mamíferos requiere la presencia de cilios primarios², en donde SMO y otros componentes de la ruta necesitan transitar para poder activar a los factores de transcripción de la familia GLI (ortólogos de Ci); sin embargo los mecanismos precisos aún se desconocen.^{15, 16} Existen tres miembros de la familia GLI en vertebrados (GLI1, GLI2 y GLI3), GLI1 y GLI2 actúan principalmente como activadores transcripcionales. GLI3 está presente en dos formas, en una forma completa, capaz de activar la transcripción en ciertos sistemas, o como un fragmento N-terminal truncado que regula el principal papel de GLI3 como represor transcripcional (**Figura 2**). El rompimiento de GLI3 es inhibido por SHH y requiere fosforilación, unión a la ligasa de ubiquitina β -TrCP, y la subsecuente poli-ubiquitinación y procesamiento mediado vía proteosoma. GLI2 también es procesado en una forma represora truncada, aunque en este caso el procesamiento es ineficiente y la interacción de GLI2 fosforilado con β -TrCP resulta fundamentalmente en degradación vía proteosoma. Se ha sugerido que el procesamiento diferencial y la degradación de GLI2 y GLI3 por el proteosoma son regulados por un dominio específico en el extremo C-terminal.^{11, 13, 15, 17}

Genes Blanco de la Vía de Señalización Sonic Hedgehog

La señalización de Hh interfiere con casi todos los procesos del plan corporal de los vertebrados durante el desarrollo embrionario. Esto es posible dado las diferentes respuestas celulares a Hh dependiendo de: (1) el

² Un **cilio primario** es un organelo constituido por un solo microtúbulo que se proyecta desde la superficie de virtualmente todas las células de vertebrados que no estén en división. No son motiles.

tipo celular que responde a Hh, (2) la dosis de Hh que recibe la célula, (3) el tiempo de duración que la célula está expuesta.¹⁸ Los genes blanco pueden ser positivos o negativos, y se han identificado por un perfil de expresión del genoma completo. Entre algunos de los genes blanco se encuentran: Bmp4 (bone morphogenetic protein 4), Fgf4 (fibroblast growth factor 4), Vegf (vascular endothelial growth factor), Myf5 (myogenic factor 5), Ptch1 (patched 1), Ptch2 (patched 2), Nkx2.2 (NK2 homeobox 2), Nkx2.1 (NK2 homeobox 1), Rab34 (RAB34, member RAS oncogene family), Pax6 (paired box 6), Pax7 (paired box 7), Pax9 (paired box 9), JAG1 (Jagged 1), genes involucrados en crecimiento y división celular como N-Myc (v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived avian), y muchos factores de transcripción miembros de las familias Myod/Myf (myogenic differentiation/myogenic factor), Pax (paired box), Nkx (NK homeobox), Dbx (developing brain homeobox) e Irx (iroquois homeobox).¹¹

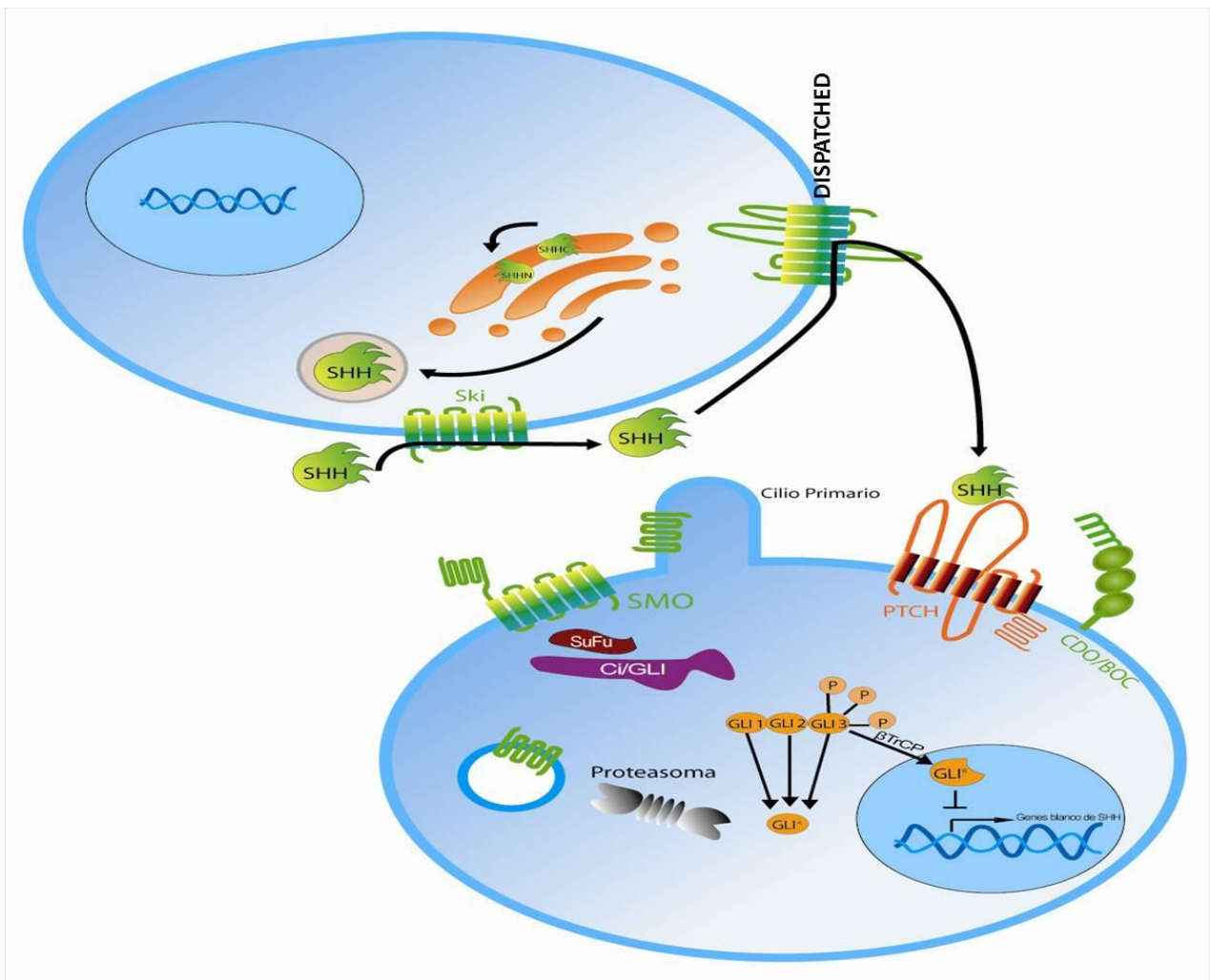


Figura 2. Ruta de Señalización Sonic Hedgehog en Vertebrados. SHH es secretado por una proteína membranal denominada DISPATCHED en la célula secretora y es recibido en la célula blanco por el receptor PTCH1, una proteína de doce dominios transmembranales. Las proteínas CDO y BOC favorecen la unión de SHH con PTCH1. En ausencia de ligando, PTCH1 generalmente inhibe a otra proteína membranal denominada Smoothened. Sin embargo, cuando el ligando se une a PTCH1, Smoothened deja de ser inhibido y adquiere un estado activo, transduciendo la señal, es entonces que los factores de transcripción GLI1 y GLI2 (principalmente activadores de la vía) dejan de ser fosforilados por las proteínas cinasas (PKA, GSK3 β y CK1) y se translocan al núcleo en su forma completa, donde se unen al ADN para activar genes blanco.

Otras Proteínas Regulatoras de la Vía

Evidencias recientes han documentado la existencia de nuevas moléculas adicionales que se relacionan con la regulación de la actividad y con el gradiente de Hh como: GAS1 (growth arrest-specific 1), SCUBE2 (signal peptide, CUB domain, EGF-like 2), HHIP (hedgehog interacting protein, Rab23 (RAB23, member RAS oncogene family) y que al parecer no están involucradas en la ruta de *Drosophila*. Estas moléculas junto con la participación de cilios primarios¹⁵ en la señalización de Hh en vertebrados enfatizan la divergencia de la vía de Hh en vertebrados y en *Drosophila*.¹⁶

Desarrollo Pulmonar

El pulmón se origina de un pequeño divertículo en el endodermo del intestino primitivo anterior, en la cavidad laringotraqueal. El epitelio invade al mesénquima circundante, seguido por el proceso de morfogénesis de ramificación. Este proceso depende de la coordinación precisa de interacciones epitelio-mesénquima que involucra interacciones célula-célula y célula-matriz, controladas a través de la secreción de diversos factores de crecimiento. Diversas rutas de señalización han sido implicadas con el control de la ramificación, entre otras se encuentran las inducidas por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), al factor de crecimiento transformante β (TGF- β), proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), wingless-type WNT y Sonic Hedgehog.^{19, 20}

Sonic Hedgehog en el Desarrollo Pulmonar

El desarrollo pulmonar es un proceso dinámico y muy complejo, sobre el que aún falta profundizar. En el humano, este proceso se ha inferido en gran

parte de estudios en modelos animales principalmente en el ratón. La expresión de *shh* en el desarrollo del pulmón en ratón, es detectada en el divertículo traqueal, en el esófago y más tarde en la tráquea y en el endodermo pulmonar. El gen *shh* se expresa poco en el epitelio, expresándose más en los brotes distales en crecimiento. La cantidad total de ARN mensajero de Shh en pulmón disminuye hacia el nacimiento. Ratones deficientes en Shh (*shh*^{-/-}) presentan serios defectos en el intestino primitivo anterior. La tráquea y el esófago no se separan en tubos distintos, y ambos brotes pulmonares hipoplásicos aparecen como lóbulos. Ambos lóbulos presentan estructuras parecidas a sacos, en lugar de parecerse a una red extensa de sacos de aire y cuando son cultivados por cinco días, no hay evidencia de ramificación epitelial o proliferación mesenquimal. Sorprendentemente, la diferenciación proximal-distal del epitelio pulmonar se encuentra normal en ratones *shh*^{-/-}, señalando que Shh es importante en la morfogénesis de la ramificación pulmonar, pero no lo es para la diferenciación proximal-distal. Estudios realizados por hibridación *in situ* muestran que la expresión en el mesénquima de *Ptc*, *Gli1* y *Gli3* se encuentra disminuida en ratones *shh*^{-/-}.

Por otro lado, la sobre-expresión de Shh en el epitelio con ayuda del amplificador/promotor SP-C conlleva a la ausencia de alveolos funcionales y a un incremento en el tejido intersticial provocado por el aumento en la proliferación de células mesenquimatosas y epiteliales (**Figura 3**). Las crías transgénicas mueren poco después del nacimiento, probablemente a causa de fallo respiratorio. La diferenciación celular, corroborada por la expresión del ARN mensajero de las proteínas del surfactante SP-A, SP-B, SP-C y de la proteína CC10 es normal en pulmones de ratón que sobre-expresan Shh. Sin embargo, se observó que el ARN mensajero pulmonar de *Ptc* aumentó en este ratón.²⁰

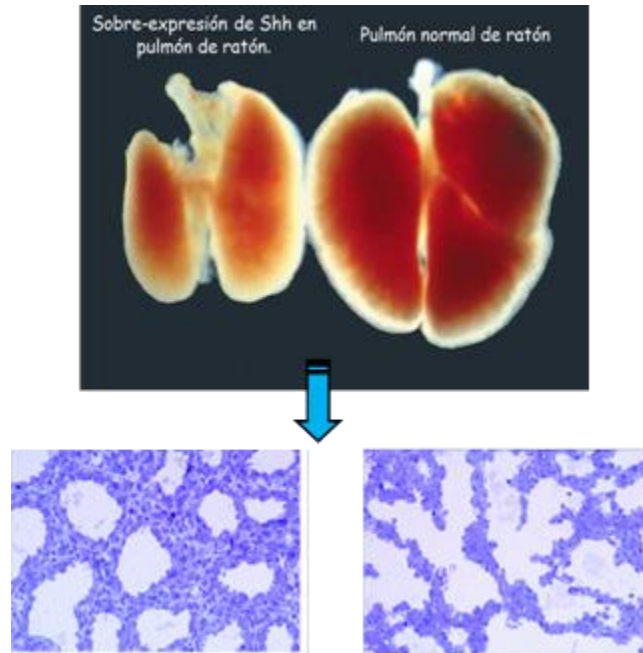


Figura 3. Comparación de los pulmones de un ratón transgénico que sobre-expresa Shh en el epitelio bajo el promotor SP-C con los pulmones de un ratón silvestre. Como puede observarse los pulmones del ratón transgénico son más pequeños que los pulmones control. En la histología se muestra que el pulmón del ratón transgénico presenta mayor cantidad de mesénquima (izquierda) en comparación con el control (derecha). Figura tomada de referencia ²⁰.

Estos hallazgos indican que la señalización de Shh tiene un papel importante en la morfogénesis de la ramificación pulmonar en ratones, aunque no parece participar en la diferenciación del epitelio alveolar. Además, al parecer Shh también es importante en el establecimiento de la asimetría entre los pulmones derecho e izquierdo y en la separación de la tráquea y esófago.²¹

Sonic Hedgehog y Enfermedad Pulmonar

El número de estudios que examinan la vía de señalización de SHH en el pulmón ha ido en aumento en la actualidad. La primera evidencia de la expresión de SHH en el pulmón fue publicada en 1995.²² Posterior a este hallazgo, la investigación de SHH en el pulmón se ha enfocado principalmente al desarrollo pulmonar. Sin embargo, la presencia de SHH se ha observado en diferentes enfermedades pulmonares como: en la enfermedad pulmonar crónico-obstructiva (EPOC),^{23, 24} cáncer pulmonar²⁵⁻²⁹ y en diversas enfermedades fibrosantes,^{30, 31} entre ellas la fibrosis pulmonar

idiopática.³²⁻³⁵ Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido de índole descriptiva y sus efectos funcionales en estas patologías no se conocen con precisión.

Fibrosis Pulmonar Idiopática.

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar de causa desconocida, crónica, progresiva, irreversible y usualmente letal. Es la neumonía intersticial idiopática más común y devastadora, ya que pone en riesgo la vida y presenta pocas opciones terapéuticas y ninguna de ellas ha mostrado que detenga o revierta la progresión de esta enfermedad.³⁶

La FPI ha sido relacionada con el envejecimiento ya que se presenta en adultos de mediana edad y en especial en aquellos de edad avanzada (edad promedio al ser diagnosticados: 66 años, rango 55-80 años). El padecimiento se limita a los pulmones y se asocia con un patrón típico histopatológico y/o radiológico de neumonía intersticial usual.³⁷ Aunque no tiene predilección por raza o etnia, predomina en hombres (1.5 a 1.7:1).

A pesar de que la FPI es por definición una afección de etiología desconocida, se han descrito diferentes factores potenciales de riesgo como: exposición al humo del tabaco, exposiciones ambientales a diferentes contaminantes, infecciones virales, exposiciones ocupacionales, diabetes mellitus, reflujo gastroesofágico y predisposición genética.³⁸⁻⁴⁰

Originalmente se estipuló que la FPI era una fibrosis secundaria a inflamación crónica, es decir, un proceso fibrótico causado por una respuesta inflamatoria no resuelta. Sin embargo, después de que se postuló la hipótesis llamada epitelial, un creciente cúmulo de evidencia indica que su patogénesis se asocia a una activación aberrante del epitelio alveolar.⁴¹⁻⁴⁴

De hecho, existen diferentes estudios que muestran que las células epiteliales alveolares (CEAs) y bronquiolares anormalmente activadas expresan la mayoría, sino todos los factores de crecimiento y quimiocinas responsables de la migración, proliferación y activación de fibroblastos. Incluso el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), uno de los principales mediadores de la respuesta fibrótica, y la integrina $\alpha \beta 6$ una de las activadoras de la forma latente de TGF- β , son producidas por células epiteliales y de hecho se encuentra sobre-expresada en pulmones de

pacientes con FPI. Las CEAs pueden también contribuir con la expansión de la población de fibroblastos/miofibroblastos en el pulmón secretando factores quimiotácticos para fibrocitos circulantes y a través de la transición epitelio-mesénquima (TEM), aunque la participación de este último mecanismo se encuentra en debate en este padecimiento.³⁶ Sin embargo, la plasticidad epitelial con una reprogramación TEM parcial podría ser central en la organización de la reparación de heridas, pero bajo estrés crónico y sin resolver, esta respuesta puede corromperse, favoreciendo una respuesta fibrótica. Las CEAs no son las únicas células que presentan gran plasticidad. En el pulmón existen más de cuarenta tipos celulares diferentes, que podrían contribuir en el proceso de reparación, incluyendo a células madre tejido-específicas y células progenitoras basales.⁴⁵

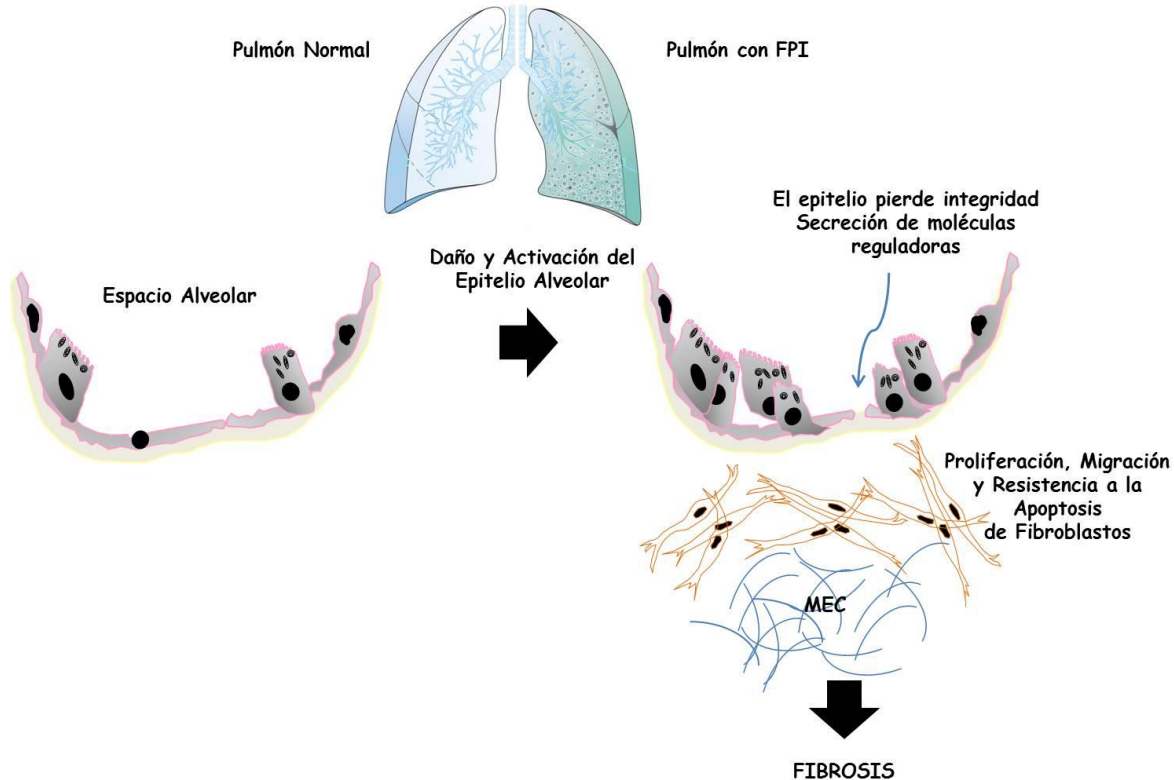


Figura 4. Esquematación de los mecanismos fibrogénicos propuestos en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática. La activación del epitelio alveolar inicia por una lesión de causa desconocida, con la consecuente secreción de moléculas moduladoras (por ejemplo TGF- β 1) y la desregulación y/o reactivación de vías de señalización embrionarias como Sonic Hedgehog, y WNT. Éstos moduladores inducen la proliferación, migración y la resistencia a la apoptosis de fibroblastos, así como su diferenciación a miofibroblastos, secretando abundantes

cantidades de matriz extracelular, perpetuando el daño pulmonar y generando fibrosis. Figura tomada y modificada de Selman M & Pardo A ³⁶.

Además, en los últimos años, diferentes estudios en ratones han mostrado que la ausencia de moléculas esenciales en la integridad epitelial produce una respuesta fibrótica sin inflamación o con una respuesta inflamatoria similar a la observada en los ratones control.

Con respecto a la activación de fibroblastos, se ha propuesto que durante el desarrollo de la fibrosis los fibroblastos presentan un fenotipo migratorio, posteriormente adquieren un fenotipo proliferativo, y por último se diferencian a miofibroblastos, los cuales son las principales células efectoras de la fibrogénesis, poseen un fenotipo contráctil, caracterizadas por la presencia de fibras de α -actina de músculo liso (α -SMA) y secretan cantidades exageradas de matriz extracelular, participando también en la alteración de la membrana basal a través de la secreción de enzimas como las metaloproteasas de matriz (MMP)-2 y -9 y sobre la apoptosis de las CEAs, perpetuando el daño y contribuyendo a una re-epitelización inadecuada.⁴⁶⁻⁵⁰ (**Figura 4**) Es así que las unidades alveolo-capilares son destruidas, lo que conduce a la formación de lo que se conoce como “panal de abeja” (conjunto de espacios aéreos quísticos subpleurales con paredes bien definidas, generalmente de 3-10 mm de diámetro) que son muy comunes y fundamentales para realizar un diagnóstico definitivo de FPI. Es la producción de moléculas de matriz extracelular principalmente colágenas fibrilares, por los focos de fibroblastos y miofibroblastos lo que resulta en la cicatrización y destrucción de la arquitectura pulmonar.

Como se mencionó previamente diferentes evidencias sugieren que los miofibroblastos que se encuentran en FPI provienen de al menos tres posibles orígenes, aunque la contribución relativa de cada una de ellas se desconoce. Por otro lado, se ha sugerido que los fibroblastos pulmonares residentes migran a los sitios de lesión y se diferencian directamente bajo la influencia del microambiente profibrosante en miofibroblastos. La segunda posibilidad, es que las CEAs se transdiferencien a fibroblastos/miofibroblastos a través del proceso de TEM, en donde las células epiteliales se reprograman, pierden sus marcadores característicos como e-cadherina y zona oclusiva-1 (ZO-1) y adquieren marcadores mesenquimatosos como lo son la proteína específica de fibroblastos-1

(FSP-1) y α -SMA. Más recientemente se ha postulado un proceso similar pero proveniente de células endoteliales (transición endotelio-mesénquima).⁵¹ La tercera hipótesis postula la posibilidad de que las células mesenquimatosas podrían derivarse de fibrocitos circulantes⁵² u otras células progenitoras derivadas de médula ósea.³⁸ Es relevante conocer las diferentes fuentes de origen que contribuyen a la expansión de la población de fibroblastos y miofibroblastos en el curso de la FPI, para encontrar blancos terapéuticos que pudieran ser benéficos en el tratamiento de esta enfermedad.

Por otro lado, los mecanismos que relacionan la FPI con el envejecimiento y con la activación aberrante de células epiteliales se desconoce; entre otros, el acortamiento anormal de telómeros, el estrés oxidativo no controlado, el decremento de hormonas como la dehidroepiandrosterona (DHEA)⁵³ y cambios epigenéticos pueden desempeñar un papel.⁵⁴ Evidencia sugiere que, además de lo ya mencionado, la recapitulación anormal de rutas embrionarias desempeña un papel importante, como ocurre en numerosos cánceres que se presentan durante el envejecimiento.⁵⁵ Estas vías de señalización embrionarias incluyen a Wnt, Sonic hedgehog, y Notch, entre otras, que tienen funciones críticas durante el desarrollo pulmonar.

Fibrosis Pulmonar Idiopática y Sonic Hedgehog

El primer estudio que reportó la expresión de SHH en el epitelio alveolar en pulmones con FPI fue en el año 2006.³³ Nuestro grupo de trabajo encontró que el receptor de SHH, PTCH1 se encuentra sobre-expresado en pulmones con FPI por análisis de microarreglos.⁵⁵ Recientemente se describieron cambios en la expresión de micro-ARNs en pulmones con FPI que sugieren que la señalización Sonic se encuentra involucrada.⁵⁶ Todos estos hallazgos han relacionado la señalización de Sonic Hedgehog con la FPI, sin embargo, ninguno ha profundizado en su estudio; es por ello que en este trabajo exploramos la expresión de esta vía de señalización en pulmones de pacientes con FPI y su relevancia en una de las estirpes celulares clave de la fibrogénesis, los fibroblastos.

HIPÓTESIS:

- 1) La ruta de señalización de Sonic Hedgehog, incluyendo sus factores de transcripción GLI1 y GLI2, se encuentran sobre-expresadas en fibrosis pulmonar idiopática.

- 2) Sonic Hedgehog ejerce un efecto profibrosante en fibroblastos pulmonares humanos.

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el papel de la ruta de señalización Sonic Hedgehog en la patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar la expresión de los principales componentes de la ruta de señalización de Sonic Hedgehog (SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2) en pulmones de pacientes con FPI por PCR en tiempo real y su localización celular por inmunohistoquímica.
- Analizar la expresión de estos mismos componentes de la ruta de señalización de Sonic Hedgehog por PCR en tiempo real en fibroblastos pulmonares obtenidos de pacientes con FPI y pulmones normales por tripsinización de tejidos completos así como aquellos aislados por microdissección con láser.
- Determinar los efectos de la proteína recombinante humana SHH sobre fibroblastos pulmonares *in vitro* sobre:
 - Tasa de Crecimiento
 - Migración celular
 - Apoptosis
 - Expresión y síntesis de colágena
 - Expresión de fibronectina
 - Diferenciación a miofibroblastos (expresión de α -actina de músculo liso)
- Cuantificar la expresión de E-cadherina en células epiteliales A549 para determinar si SHH induce transición epitelio-mesénquima.
- Evaluar la actividad gelatinolítica de MMP-2 y -9 en medios condicionados de células A549.

METODOLOGÍA

Población de Estudio

Se obtuvieron muestras de pulmones de siete pacientes con FPI y tres muestras de regiones normales de pulmón utilizadas como control. Los fragmentos de pulmón normal se obtuvieron de lobectomías terapéuticas realizadas en pacientes sin fibrosis, de las cuales se seleccionaron zonas macroscópica y microscópicamente normales. Además, se obtuvo ARN de seis pulmones normales de (Ambion AM7968, Agilent 540019, Origene HT1009, Zyagen HR-601, BD 64092-1, y USBiological T5595-7343), utilizados para análisis de expresión génica.

El diagnóstico de la FPI se realizó conforme los criterios consensuados que indican la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS).³⁷ Este estudio fue aprobado por el comité de ciencia y bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Inmunohistoquímica

Se inmunolocalizaron los principales componentes de la vía de señalización de Sonic Hedgehog (SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2) en pulmones de pacientes con FPI y en pulmones control mediante inmunohistoquímica como se ha reportado previamente.⁵⁷ Los tejidos se desparafinaron en xilol por 25 minutos y después se rehidrataron con etanol al 100%, 90%, 50% y agua por 5 minutos c/u. Los tejidos fueron incubados con H₂O₂ al 3% en metanol por 30 minutos. Después, se recuperaron los antígenos incubando los tejidos en buffer de citratos 0.01M pH6 y calentando en un horno de microondas durante 4 minutos a mayor voltaje y otros 4 minutos a menor voltaje. Las muestras tisulares se dejaron enfriar por veinticinco minutos y posteriormente se incubaron con bloqueador universal (Biogenex, HK085-5K) por 10 minutos. Después de un lavado con PBS por 5 minutos, los tejidos se incubaron con suero de borrego (Chemicon, S32) para evitar uniones inespecíficas, a una dilución 1:100 en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron los anticuerpos primarios (*ver tabla 1*) y se incubaron toda la noche a 4°C, los controles negativos se dejaron sólo con suero de borrego. Al día siguiente, se hicieron dos lavados con PBS 0.1% Tween 2.0 de 5 minutos c/u. Los tejidos se incubaron con el

anticuerpo secundario acoplado a biotina durante 20 minutos y con un complejo de estreptavidina-peroxidasa (BioGenex) durante otros 20 minutos. Los tejidos se lavaron con PBS 0.1% Tween 2.0 por 5 minutos. La marca se reveló con el reactivo 3-amino-9-etil-carbazol (AEC de BioGenex). Finalmente los tejidos se contra-tiñeron con hematoxilina (BioGenex).

Anticuerpo Primario	Marca	No. Catálogo	Dilución
anti-SHH	Abcam	ab73958	1:100
anti-PTCH1	Abcam	ab27529	1:50
anti-PTCH1	Novus Biologicals	NBP1-47945	1:25
anti-SMO	Abcam	ab72130	1:100
anti-GLI1	RayBiotech	805-820	1:100
anti-GLI1	Abcam	ab49314	1:50
anti-GLI2	Abcam	ab26056	1:700

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.

Cultivos Celulares

Fibroblastos pulmonares humanos fueron obtenidos de pacientes con FPI (n = 6) mediante biopsia a pulmón abierto, y de pulmones control (n = 3) de lobectomías terapéuticas que no presentaron evidencia histológica de enfermedad.⁵⁸ Estos fibroblastos fueron aislados del tejido pulmonar por disociación con tripsina y crecieron en medio Ham's F12 (GIBCO Laboratories, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO Laboratories, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Fibroblastos de pasaje 4-6 fueron cultivados en cajas T-25 cm² (Corning, USA) con 5%CO₂-95%aire a 37°C.

Adicionalmente, se obtuvo la línea de fibroblastos de pulmón normal CCD25-Lu de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MA). Se crecieron en medio MEM (GIBCO Laboratories, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO Laboratories, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Fibroblastos de pasaje 4-6 fueron

cultivados en cajas T-25 cm² (Corning, USA) con 5%CO₂-95%aire a 37°C, para diferentes experimentos.

La línea de células epiteliales alveolares A549 (que proviene de un adenocarcinoma bronquioloalveolar) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MA). Se crecieron en medio Ham's F12 GIBCO Laboratories, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO Laboratories, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células A549 fueron cultivadas en cajas T-25 cm² (Corning, USA) con 5%CO₂-95%aire a 37°C, y se usaron para evaluar la expresión de E-cadherina y β-tubulina por Western blot.

Microscopía de Disección con Láser

Se utilizaron cortes de pulmones de pacientes con FPI (dos grupos), y como controles, pulmones de pacientes con Neumonía Organizada (dos grupos) que a diferencia de lo que ocurre en FPI presentan focos de fibroblastos (cuerpos de Masson) que son reversibles. Las muestras del tejido pulmonar fueron incubadas con la solución de protección acuosa HOPE (DCS Innovative, Alemania) durante 24 horas a 0-4°C, posteriormente, en una solución de acetona fría (100 ml de acetona y 100 µl de solución HOPE II) durante dos horas, para luego deshidratarlas con acetona 0-4°C por 2 horas. Se obtuvieron de manera selectiva focos de fibroblastos por medio de microdisección con láser (Arcturus: Pixell Ite Laser Capture Microdissection System). El ARN total de los fibroblastos se purificó usando el estuche PicoPure RNA Isolation (Arcturus) y se sintetizó ADNc mediante RT-PCR. Posteriormente, se cuantificó la expresión del receptor de PTCH1 con la sonda TaqMan (Hs00970980_m1) específica por PCR en tiempo real, como se describe más adelante.^{59, 60}

RT-PCR y PCR en Tiempo Real

Se extrajo el ARN total de fibroblastos pulmonares humanos utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Posteriormente se hizo transcripción reversa a partir de 1 µg de ARN para sintetizar ADN complementario utilizando el estuche *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del

fabricante. La amplificación en tiempo real se realizó con sondas TaqMan marcadas con FAM específicas para cada gen de estudio (Applied Biosystems, Wellesley, CA) (Ver tabla 2). El ARNr 18S fue utilizado como control endógeno. La PCR se llevó a cabo mezclando 3 μ l de ADNc, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μ M de cada sonda TaqMan (SHH, PTCH1, SMO, GLI1, GLI2, fibronectina, colágena α 1 tipo I y 18S ARNr) y 2.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, CA). Para la cuantificación se crearon curvas de número de copias seriales, las cuales abarcaron un rango de 1×10^{10} a 1×10^2 . Los resultados de tres muestras diferentes por triplicado se expresaron como promedio \pm la desviación estándar del número de copias del gen blanco normalizado con el ARNr 18S. Las condiciones de la PCR fueron 2 minutos a $94^\circ C$ seguido de 40 ciclos de 15 segundos a $94^\circ C$ y 1 minuto a $60^\circ C$ [17].

Sonda TaqMan	No. Catálogo	Producto (pb)
SHH	Hs00179843_m1	70
PTCH1	Hs00970980_m1	129
SMO	Hs01090242_m1	54
GLI1	Hs01110768_m1	74
GLI2	Hs01119974_m1	61
Fibronectina	Hs00365052_m1	82
Colágena α 1-tipo I	Hs00164004_m1	66
18S rRNA	4352930E	187

Tabla 2. Sondas TaqMan específicas para cada gen analizado.

Western-Blot

Para este estudio, los fibroblastos o células epiteliales se crecieron en medio MEM y Ham's F12 respectivamente, suplementado con 10% SFB y al día siguiente fueron estimulados con SHH 2 μ g/ml en medio MEM sin suero por 48 horas. Células en las mismas condiciones pero sin estímulo se usaron como control. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS frío y se lisaron con el buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 1%, PMSF 1mM, Na_3VO_4 1 mM, leupeptina 1 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml y pesptatina 1 μ g/ml). El lisado celular fue sonificado y centrifugado a 14,000 rpm por 10 minutos a $4^\circ C$, se colectó el

sobrenadante y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford utilizando el reactivo *BioRad Protein Assay* (BioRad Laboratories, Inc. Hercules, CA). Alicuotas de los lisados conteniendo 30 ug de proteína con buffer Laemmli se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. La proteína se transfirió a membranas de nitrocelulosa durante una hora a 100V. Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en TBS durante toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante una hora a temperatura ambiente: [anti- α -SMA y anti-E-cadherina (ratón) 1:500, SIGMA], [anti- β -tubulina 1:200 (conejo), SantaCruz]. Después de lavar 4 veces con TBS-Tween 0.05%, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón-HRP (Jakson, 1:5000) por una hora a temperatura ambiente. La señal se reveló con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire UK) cuantificado por la cámara del equipo ChemiDoc™ XRS + Imaging System (BioRad) y las intensidades de las bandas fueron calculadas por el programa Image Lab 3.0 ^[17]

Tasa de Crecimiento

Fibroblastos al 80% de confluencia fueron tripsinizados, se colectaron y se resuspendieron en medio MEM con 10% de SFB. Las células se sembraron en una caja de 48 pozos a una densidad de 10,000 células/pozo y se incubaron a 37°C en 5%CO₂-95%aire. Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio MEM suplementado con 5% de SFB (controles) o con medio MEM suplementado con 5% de SFB con la proteína recombinante humana SHH (2µg/ml) o con el inhibidor de la ruta ciclopamina (5µM) o en combinación. Se evaluó la viabilidad celular a las 48, 72 y 96 horas utilizando el reactivo WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno disulfonato) (Roche, Alemania). El reactivo WST-1 es metabolizado por las enzimas mitocondriales de las células viables generando formazán que es un compuesto colorido. **(Figura 5)** El color del formazán producido por las células viables se cuantificó mediante valoración de la absorbancia en un lector de ELISA a 450nm y con una longitud de onda de referencia de 620nm ^[17].

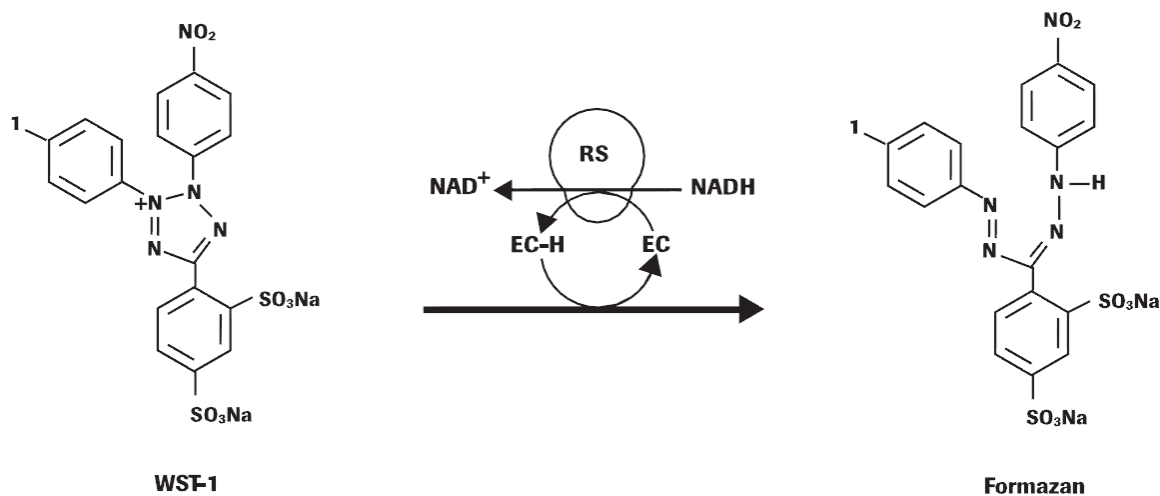


Figura 5. Principio del ensayo. La sal de tetrazolio (WST-1) es convertida a formazán por enzimas celulares. Un incremento en el número de células viables se traduce en un incremento en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en la muestra. Este aumento en la actividad enzimática lleva a un incremento en la cantidad producida del colorante formazán, que correlaciona con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. (EC = reactivo de acoplamiento a electrones; RS = sistema mitocondrial succinato tetrazolio reductasa).

Ensayo de Migración Celular

El análisis de migración de fibroblastos se llevó a cabo usando cámaras de Boyden (Chemicon, Temecula, CA) cubiertas con colágena tipo I con un tamaño de poro de 8- μm .^{61, 62} Se colocaron 200,000 células en el compartimento superior de la cámara. Al compartimento inferior se le añadió 0.5ml de medio DMEM con 5% BSA sólo (control) o con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la proteína recombinante SHH (R&D Systems, Minneapolis, MN) humana (como quimioatrayente). Se usó PDGF-BB (10ng/ml) como control positivo. Después de incubar los fibroblastos 8 horas a 37°C con 5%CO₂-95%aire, las células que no migraron en el compartimento superior se retiraron y las células que migraron al compartimento inferior se tiñeron con cristal violeta. El colorante se eluyó con el amortiguador de extracción provisto en el estuche y 100 μl fueron transferidos a una placa de 96 pozos para ser leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm. Cada experimento se realizó por duplicado ^[19].

Ensayo de Apoptosis por Citometría de Flujo

La muerte celular por apoptosis es acompañada por un cambio en la estructura de la membrana plasmática por la exposición de fosfatidilserina (PS) en la superficie, mientras que la integridad de la membrana permanece sin cambios. La exposición en la superficie de PS puede ser detectada por su afinidad por Anexina-V, una proteína de unión al fosfolípido, en presencia de calcio. La Anexina-V acoplada a ficoeritrina (PE) facilita los estudios de exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática en células que experimentan muerte celular programada.⁶³ La Anexina-V no es capaz de unirse a células normales viables ya que la molécula no penetra la bicapa lipídica. En células muertas, sin embargo, la cara interna de la membrana queda expuesta para la unión de Anexina-V extrínseca, ya que se pierde la integridad de la membrana. Para discriminar entre células en apoptosis y muertas, se agrega simultáneamente un marcador de ADN como yoduro de propidio (PI) en la suspensión celular.

Para examinar el efecto de SHH sobre la muerte celular programada, el proceso de apoptosis se analizó por citometría de flujo utilizando un estuche comercial (Annexin V-PE Apoptosis detection kit, BD Pharmingen). Los fibroblastos CCD25-Lu fueron pre-estimulados por 48 horas con TNF- α 20ng/ml e INF- γ 50ng/ml (PeproTech 300-01A y 300-02 respectivamente) y un anticuerpo agonista FAS 250ng/ml (Biolegend 305704) por 48 horas adicionales para inducir apoptosis.⁶⁴ Asimismo, se estimularon los fibroblastos en las mismas condiciones anteriores pero añadiendo la proteína recombinante SHH (2 μ g/ml) Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se determinaron los porcentajes de la población total de las células positivas para Anexina-V-PE y negativas para yoduro de propidio (apoptosis temprana) y de las células positivas para Anexina-V-PE y positivas para yoduro de propidio (apoptosis tardía). Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo 7.8 (Stanford University, CA).

Evaluación de Marcadores de Apoptosis

Se analizó el perfil de expresión de treinta y cinco proteínas relacionadas con apoptosis utilizando el estuche comercial de apoptosis humana (Proteome Profiler Array ARY009, R&D Systems)^{65, 66} La membrana de nitrocelulosa con anticuerpos inmovilizados específicos contra proteínas relacionadas con apoptosis fue bloqueada durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente y después se incubó con el lisado celular (400 µg) de fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados con SHH, TNF α /IFN γ /FAS y TNF α /IFN γ /FAS/SHH junto con la mezcla de detección de anticuerpos toda la noche a 2–8°C. Las membranas se incubaron con estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano seguida de luminol como agente de detección quimioluminiscente, y las intensidades de luminiscencia se cuantificaron por la cámara del equipo ChemiDoc™ XRS + Imaging System (BioRad) y fueron analizadas por el programa Image Lab 3.0.

Transición Epitelio–Mesénquima.

Células de la línea A549 fueron estimuladas con la proteína recombinante humana SHH a diferentes concentraciones (2 y 5 µg/ml), a diferentes tiempos (cinco y siete días) y con TGF- β 1 (5 ng/ml) como control positivo. Posteriormente se lisaron las células y se realizó Western blot (como anteriormente se describió), para analizar la expresión de E-cadherina y β -tubulina.

Zimografía

Células de la línea A549 fueron estimuladas con la proteína recombinante SHH (2µg/ml) y con TGF- β 1 (5ng/ml) y no estimuladas (control) durante 24 y 72 horas, en presencia de medio Ham's F12 sin suero en un volumen final de 4 ml. Los medios condicionados se recuperaron y se guardaron a -70° C hasta su utilización. La actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 se determinó de los medios condicionados, se tomaron 16 µl de cada condición y se mezclaron con 4 µl de buffer laemmli 5X y fueron cargados en geles de poliacrilamida al 8.5% en presencia de gelatina (1 mg/ml) bajo condiciones no-reductoras. Al finalizar la electroforesis, los geles se lavaron dos veces con Tritón X-100 al 2.5 % (Sigma, St Louis, MO, USA) durante 15 minutos para eliminar el SDS. Posteriormente los geles fueron

puestos en el buffer de incubación (Glicina 0.1 M, pH 8; CaCl₂ 5 mM y ZnCl₂ 5 mM) durante 18 horas a 37 °C. Se tiñeron los geles con Azul de Coomassie R-250 al 0.5% durante 30 minutos y después se destiñeron con una solución de metanol 30% y ácido acético 10%, durante 15 minutos.⁶⁷ Después de la re-naturalización de las enzimas, las gelatinasas digirieron la gelatina en el gel y se observaron como bandas claras bajo un fondo azul. Los pesos moleculares de las enzimas se determinaron utilizando el medio condicionado de células U2-OS (osteosarcoma) estimuladas con PMA. La densitometría de las intensidades de las bandas fueron calculadas por el programa Image Lab 3.0.

Análisis Estadístico

Los datos que se muestran en las gráficas representan el promedio \pm desviación estándar. Para analizar diferencias entre los grupos se utilizaron las pruebas estadísticas de Tukey, t de Student y la prueba de U Mann-Whitney. Se consideró como significativo una * $p < 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Diferentes Componentes de la Ruta de Señalización de Sonic Hedgehog (SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2) se Sobre-expresan en Pulmones de Pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática.

Los niveles de expresión del ARN mensajero de Sonic hedgehog, Patched1, Smoothened, Gli1 y Gli2 fueron cuantificados por PCR en tiempo real en pulmones normales y con FPI. Los niveles de ARN mensajero de los componentes analizados prácticamente no se detectaron en pulmones normales, conforme se ha reportado en diferentes órganos en adulto. Sin embargo, en pulmones de pacientes con FPI todos los genes evaluados se encontraron sobre-expresados, destacando la importancia de esta vía de señalización en la FPI (Figura 6).

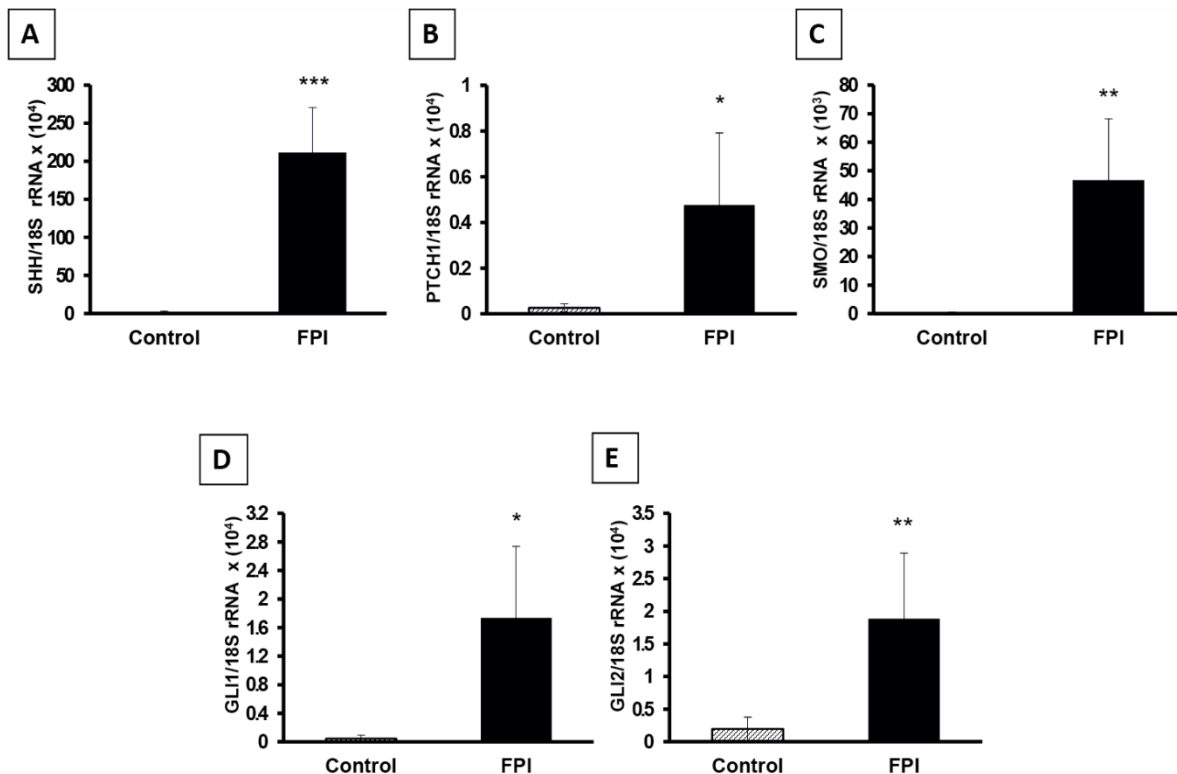


Figura 6. Análisis de la expresión génica de los principales componentes de la ruta de señalización Sonic Hedgehog cuantificado por PCR en tiempo real en pulmones normales humanos ($n = 6$) y en pulmones de pacientes con FPI ($n = 7$). Sonic hedgehog (A), Patched1 (B), Smoothened (C), Gli1 (D) y Gli2 (E).

Inmunolocalización de SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2 en Tejidos Pulmonares con FPI y Normales.

La tinción inmunohistoquímica reveló que en todos los tejidos de pacientes con FPI ($n = 7$), los componentes de la ruta de señalización Sonic Hedgehog (SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2) se expresan en diferentes células pulmonares (**Figura 7**), lo que no ocurrió en los tejidos pulmonares normales ($n = 3$) y correlacionó con los datos obtenidos en expresión génica, mostrados en la figura 6.

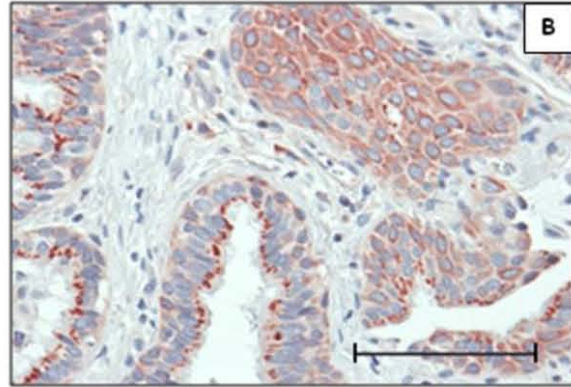
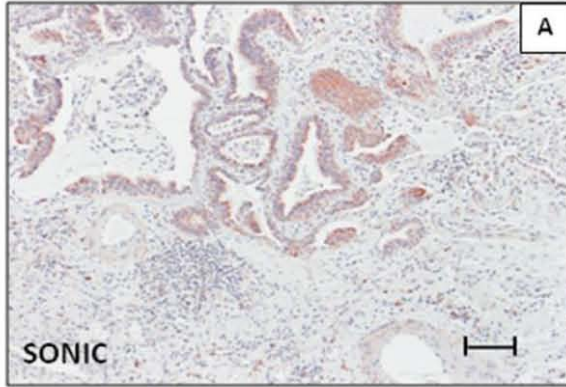
SHH se localizó en el citoplasma de células epiteliales alveolares y bronquiales donde mostró una clara distribución apical y en algunos casos se detectó en células basales/mioepiteliales en zonas de mayor daño (**Figura 7, A y B**). La tinción del receptor PTCH1 fue más focalizada y se apreció en fibroblastos y en células inflamatorias intersticiales (**Figura 7, E y F**). Por otro lado, SMO mostró una fuerte tinción fundamentalmente en fibroblastos formando parte de los característicos focos de FPI y en células inflamatorias intersticiales (**Figura 7, I y J**). Los factores transcripcionales presentaron una distribución diferente. GLI1 se localizó en el núcleo y citoplasma de células epiteliales, fibroblastos y células inflamatorias (**Figura 7, M y N**), mientras que GLI2 se observó predominantemente en el núcleo de células epiteliales (**Figura 7, P y Q**). Los controles negativos donde los anticuerpos primarios fueron reemplazados por suero no inmune se ejemplifican en la **Figura 7, T y U**.

Sonic Hedgehog Activa la Ruta Canónica en Fibroblastos Normales y de FPI.

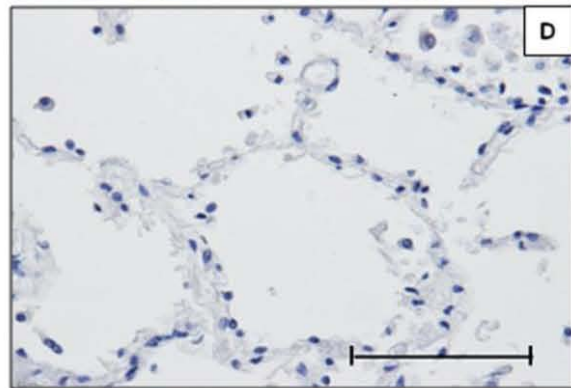
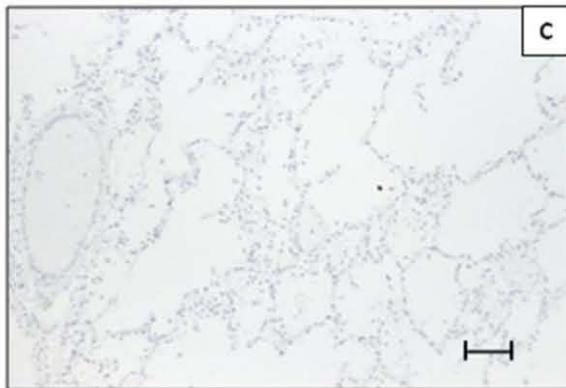
Algunos de los genes blanco de la vía de señalización Hedgehog son genes pertenecientes a la misma ruta, como: PTCH1, HHIP y GLI1. Sin embargo, la respuesta de la señalización Hh varía de acuerdo al tipo celular que la recibe. Es por ello, que decidimos analizar la expresión génica de PTCH1, GLI1 y GLI2 en fibroblastos normales y de pacientes con FPI estimulados con la proteína recombinante SHH para evaluar si la ruta canónica estaba activada en fibroblastos (**Figura 8, A y B**).

10X

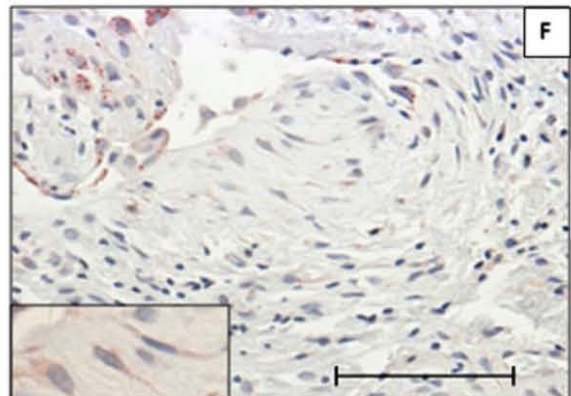
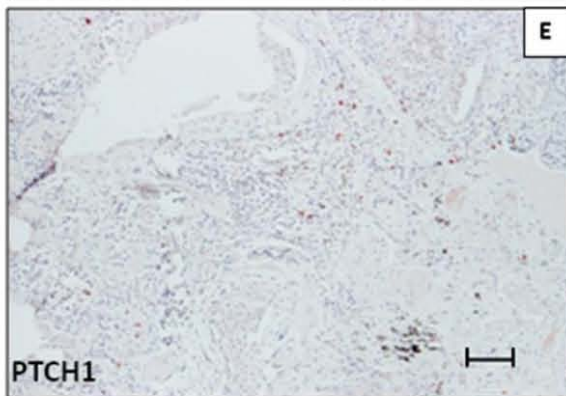
40X



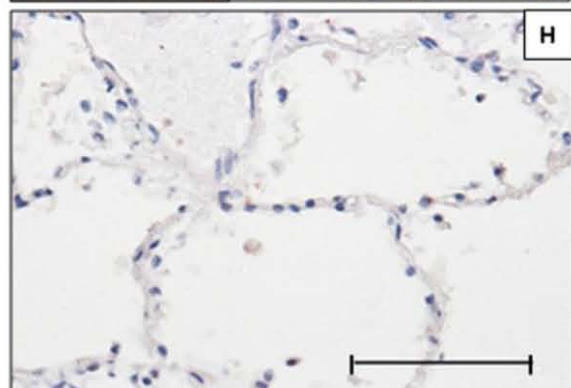
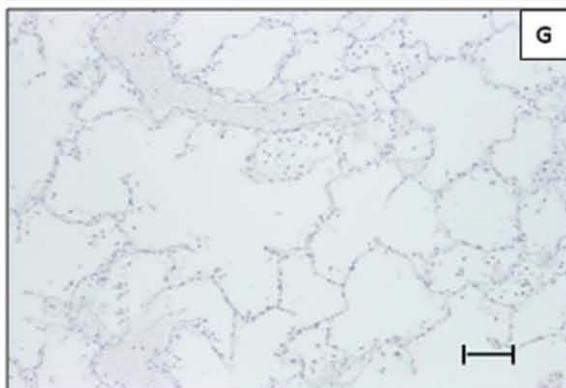
FPI



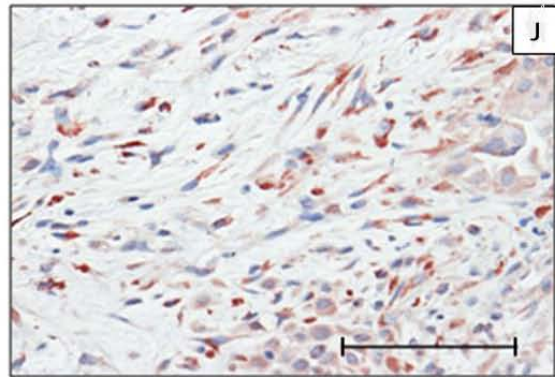
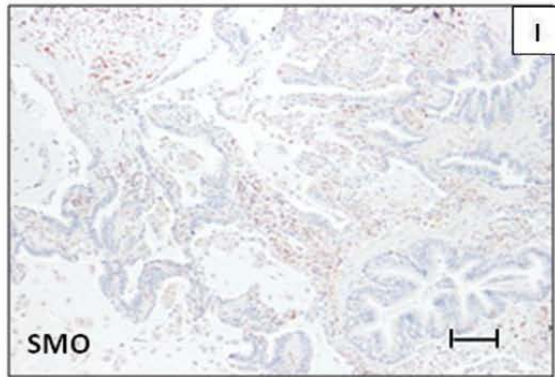
PN



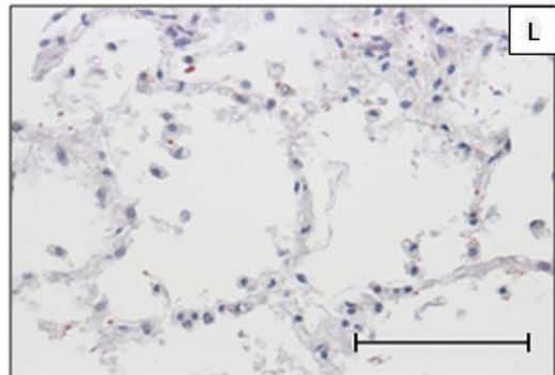
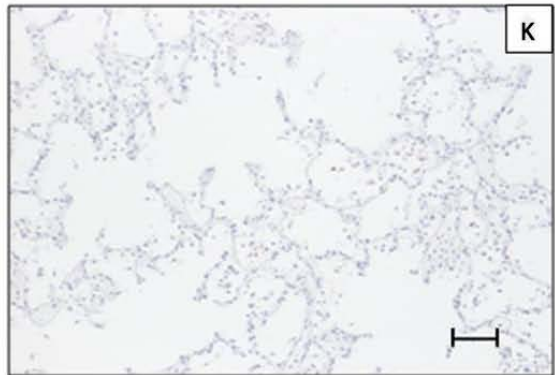
FPI



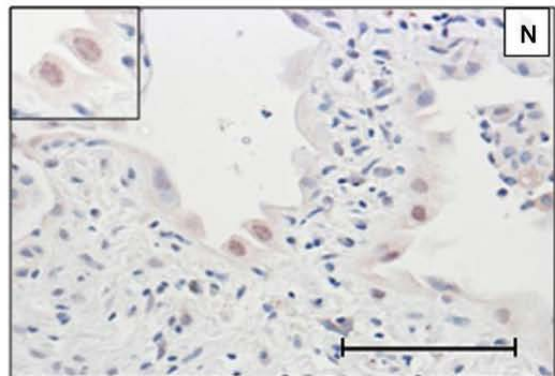
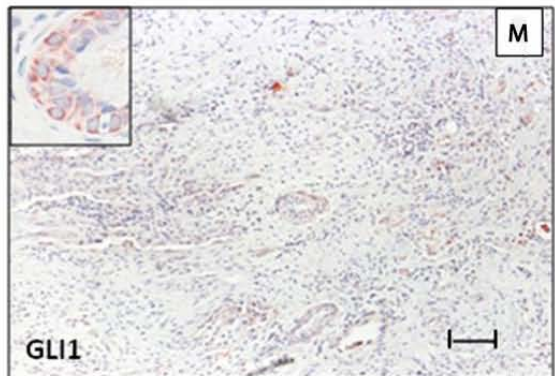
PN



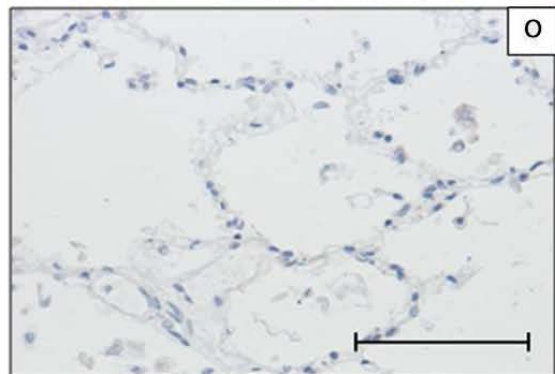
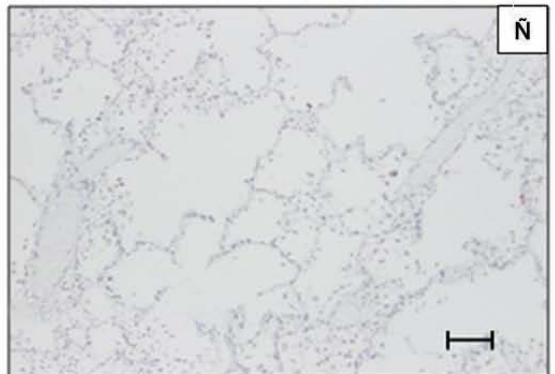
FPI



PN



FPI



PN

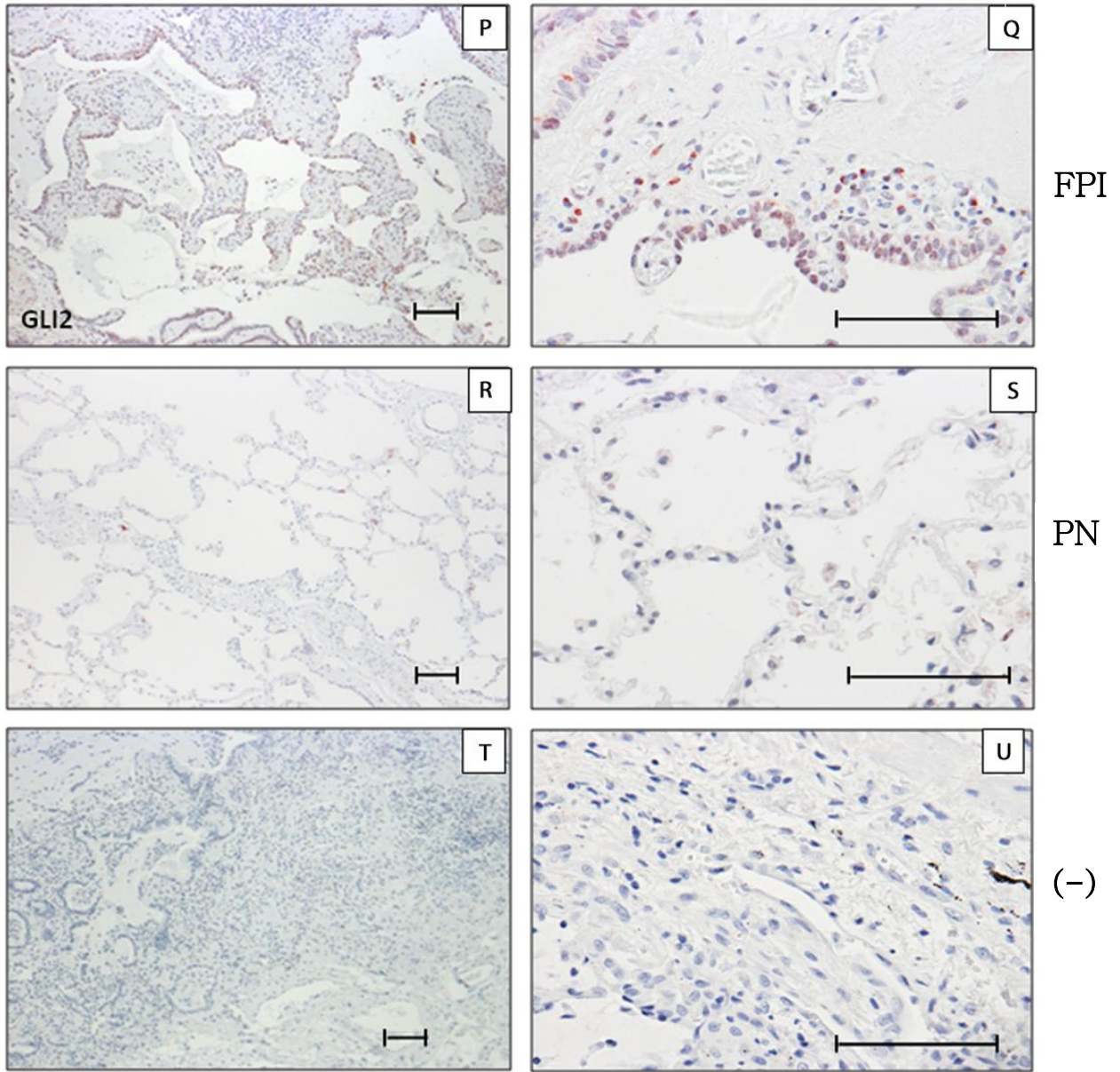


Figura 7. Inmunolocalización de SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2 en tejidos pulmonares de pacientes con FPI y en tejido pulmonar normal. La barra de escala representa 100 μm. Tinción para SHH (A-D), PTCH1 (E-H), SMO (I-L), GLI1 (M-O), GLI2 (P-S). FPI = Fibrosis Pulmonar Idiopática; PN = Pulmón Normal; (-) = Control Negativo.

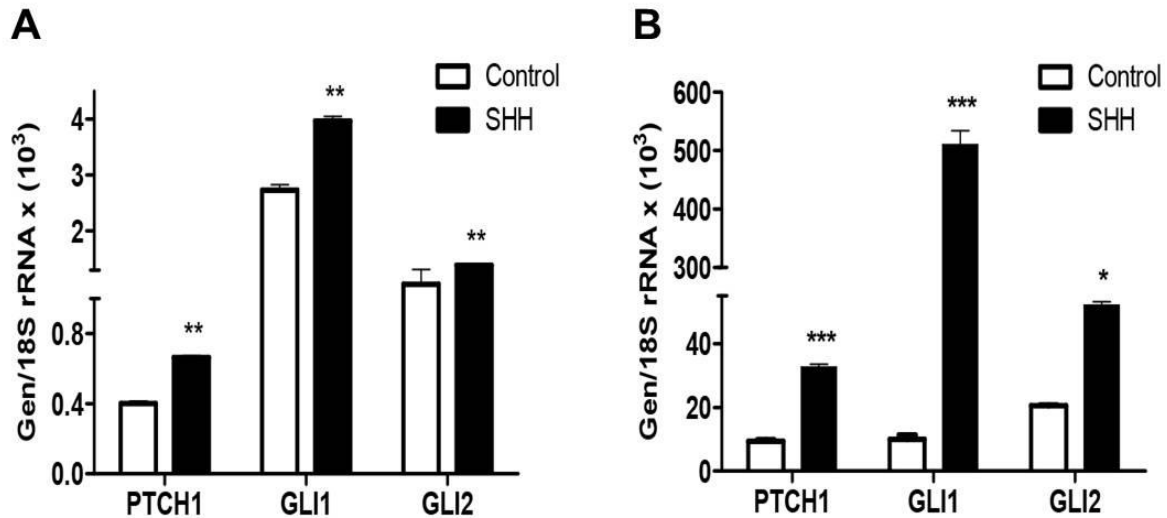


Figura 8. Activación de la vía canónica Sonic Hedgehog. Fibroblastos normales de la línea CCD25-Lu (A) y una línea de fibroblastos primarios de FPI (B), fueron estimulados con 2 μ g/ml de la proteína recombinante SHH y se analizó la expresión génica de PTCH1, GLI1 y GLI2 por PCR en tiempo real.

Fibroblastos de Pacientes con FPI Sobre-expresan los Principales Componentes de la Ruta de Señalización de Sonic Hedgehog.

Los niveles de expresión del ARN mensajero de Sonic hedgehog, Patched1, Smoothed, Gli1 y Gli2 fueron cuantificados por PCR en tiempo real (Figura 9). Con excepción de SMO, los niveles de ARN mensajero de todos los componentes analizados, se encontraron sobre-expresados en líneas primarias de fibroblastos de FPI ($n = 6$). Se utilizaron tres líneas primarias de fibroblastos normales. La línea CCD25-Lu mostró también una robusta sobre-expresión de PTCH1 en comparación con las líneas primarias normales, por lo que se utilizó junto con líneas primarias de FPI en los diferentes ensayos funcionales.

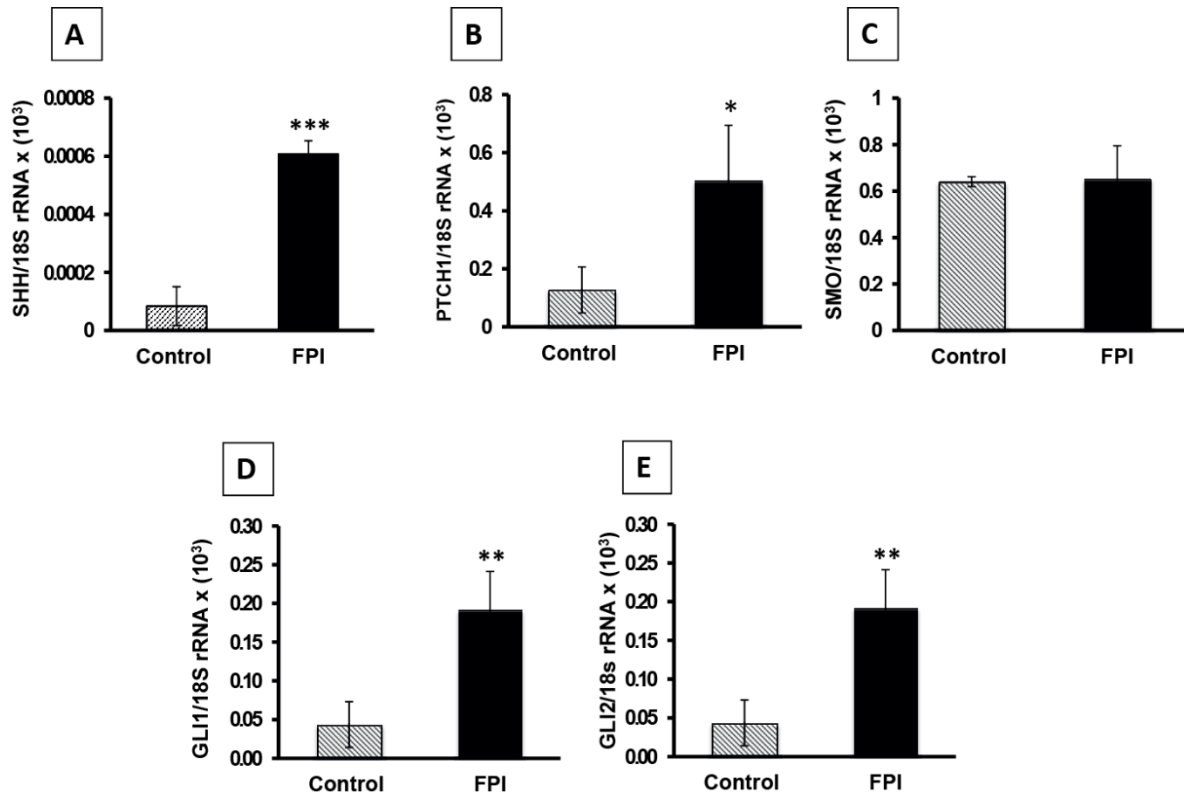


Figura 9. Análisis de la expresión génica de los diferentes componentes de la ruta de señalización Sonic Hedgehog cuantificado por PCR en tiempo real en fibroblastos de pacientes con FPI y en líneas primarias de fibroblastos normales. Sonic hedgehog (A), Patched1 (B), Smoothened (C), Gli1 (D) y Gli2 (E).

SHH Incrementa la Tasa de Crecimiento de Fibroblastos Normales y FPI.

La tasa de crecimiento se evaluó con el reactivo WST-1 en la línea de fibroblastos normales CCD25-Lu que expresa el receptor PTCH1 (Figura 10, A) y en cuatro líneas primarias de fibroblastos con FPI (Figura 10, B, C, D y E). Se estimularon los fibroblastos con la proteína recombinante humana Sonic Hedgehog. SHH indujo un incremento significativo en la tasa de crecimiento, a partir de las 72 horas en la línea de fibroblastos normales y a partir de las 96 horas en los fibroblastos derivados de FPI. Para corroborar que efectivamente el efecto en la tasa de crecimiento se debía a SHH, tratamos a los fibroblastos con ciclopamina 5 μ M, que es un inhibidor específico de la vía, y encontramos que la ciclopamina abate el efecto de SHH e interesantemente, también disminuyó la tasa de crecimiento de fibroblastos control.

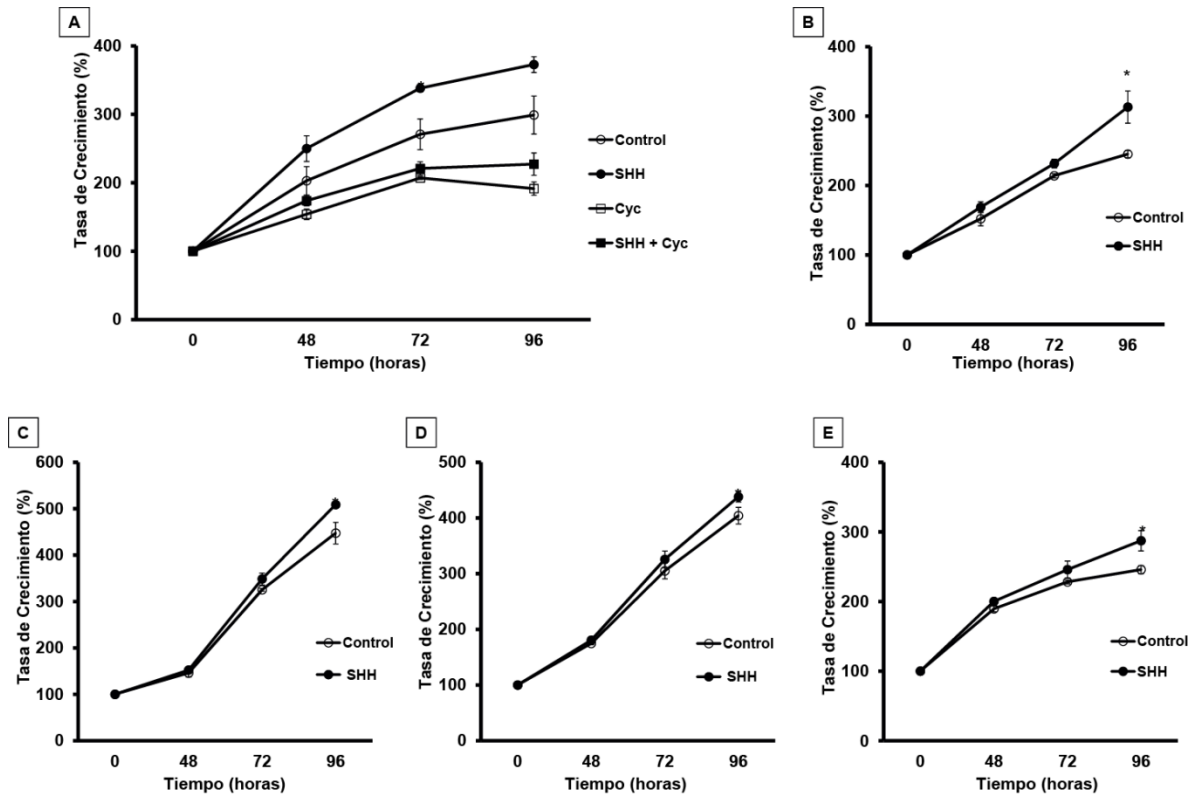


Figura 10. Tasa de crecimiento de fibroblastos estimulados con SHH recombinante. Fibroblastos de la línea CCD25-Lu estimulados con SHH (2 µg/ml) y ciclopamina [Cyc (5µM)] hasta por 96 horas (A). Cuatro líneas de fibroblastos de pacientes con FPI estimulados con SHH (B-E).

SHH Incrementa la Expresión de Moléculas de Matriz Extracelular.

El estímulo de fibroblastos con la proteína recombinante SHH incrementó significativamente los niveles del ARN mensajero de colágena tipo I $\alpha 1$, (Figura 11, A). Asimismo, a nivel proteína evaluamos la cantidad de colágena secretada al medio de cultivo en fibroblastos CCD25-Lu por el ensayo de Sircol. Se observó que SHH aumenta significativamente la secreción de colágena (de 2.5 ± 0.2 a 4.5 ± 1.0 µg colágena/ml; $*p < 0.05$). Con el fin de descartar que este incremento en los niveles de colágena en los medios condicionados se debiera a un mayor número de fibroblastos dado que SHH induce su proliferación, en un nuevo experimento ajustamos la síntesis de colágena por el número de fibroblastos. Los resultados confirmaron que SHH induce la producción de colágena tanto en fibroblastos normales como en fibroblastos de FPI, aunque, su efecto es menor que el que produce TGF- β . La ciclopamina inhibió parcialmente este incremento pero no tuvo efecto sobre la producción de colágena inducida por TGF- β (Figura 11, B).

También cuantificamos la expresión de fibronectina, otro componente importante de la matriz extracelular, en una línea de fibroblastos normales y en dos líneas de fibroblastos de FPI. Nuestros resultados mostraron que el estímulo con la proteína recombinante SHH aumenta significativamente la expresión de fibronectina (2-3 veces a las 6 horas) especialmente en fibroblastos FPI (Figura 11, C).

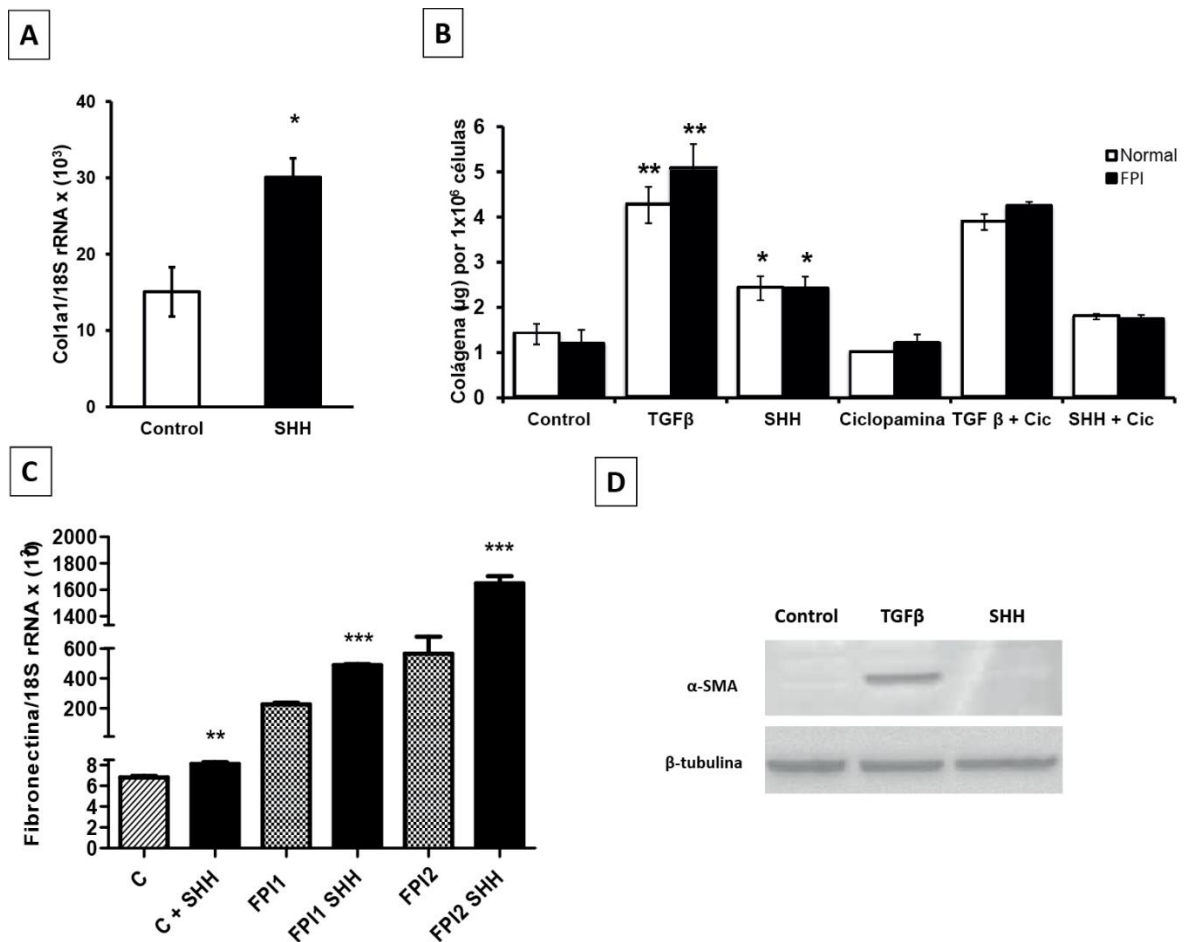


Figura 11. Efecto de SHH sobre la expresión de moléculas de matriz extracelular y de α -actina de músculo liso. Expresión génica de colágena tipo I $\alpha 1$ a 24 horas (A), y cuantificación de colágena en medios condicionados por la técnica de Sircol de fibroblastos CCD25-Lu y una línea primaria de FPI estimulados con SHH (2 μ g/ml), TGF- β (5ng/ml) y/o ciclopamina (5 μ M) (B). Expresión génica de fibronectina en dos líneas primarias de fibroblastos FPI y una línea normal estimuladas con SHH (2 μ g/ml) por 6 horas (C). Western-Blot para detectar α -actina de músculo liso en lisados de fibroblastos normales CCD25-Lu estimulados con SHH (2 μ g/ml) y con TGF- β (5 ng/ml) como control positivo (D).

Durante el curso de la fibrosis, los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos, la cuál es la célula clave en la fibrogénesis; estas células comparten características con las células de músculo liso ya que son contráctiles y poseen fibras de estrés de α -actina de músculo liso. Se localizan en los focos de fibroblastos y otros sitios en donde la fibrosis está presente y son el principal tipo celular responsable de la síntesis y depósito de matriz extracelular. Es por ello que exploramos si SHH contribuía en esta diferenciación. Como se muestra en la **Figura 11D**, los fibroblastos CCD25-Lu tratados con SHH por 48 horas no expresaron el marcador de miofibroblastos α -actina de músculo liso, mientras que TGF- β (un potente inductor de esta diferenciación) incrementó la expresión de este marcador. Este ensayo también se realizó en otras líneas primarias de FPI estimuladas con SHH y tampoco mostraron cambios (datos no mostrados).

Sonic Hedgehog Protege a los Fibroblastos de la Apoptosis Inducida por TNF α /IFN γ /FAS.

Diversos estudios han señalado la relevancia de la eliminación y muerte celular programada de la células encargadas de reparación cuando existe un daño; tal es el caso del miofibroblasto que es necesario en la resolución apropiada de respuestas de reparación tisular.⁶⁸ La resistencia a la apoptosis de los miofibroblastos podría resultar en un proceso de remodelación persistente que culminaría en fibrosis tisular. Es por ello que evaluamos el efecto de SHH sobre la apoptosis de fibroblastos. Encontramos que SHH disminuyó significativamente el porcentaje de apoptosis basal de fibroblastos normales CCD25-Lu en comparación con el grupo control ($9.5 \pm 1.4\%$ a $5.3 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$).

Se ha reportado que TNF α sensibiliza a fibroblastos normales y de FPI a la apoptosis inducida por FAS y que ésta respuesta incrementa con IFN γ .⁶⁴ En base a este reporte usamos esta combinación para inducir apoptosis en fibroblastos CCD25-Lu y evaluamos el efecto de SHH en este mecanismo por citometría de flujo. Como se señala en la **Figura 12A**, la apoptosis temprana (es decir, las células que fueron positivas para la tinción con Anexina-V y negativas para IPI) aumentó con la combinación de TNF α /IFN γ /FAS y disminuyó significativamente en presencia de SHH ($p < 0.0001$) llegando incluso a niveles basales. La apoptosis tardía (es decir, células positivas para Anexina-V e IP) también se incrementó por la inducción de TNF α /IFN γ /FAS, y también se redujo substancialmente con el tratamiento de SHH (**Figura 12B**). Resultados similares se obtuvieron al inducir

apoptosis con TNF α /IFN γ pero en ausencia de FAS, sin embargo, la apoptosis inducida fue menor.

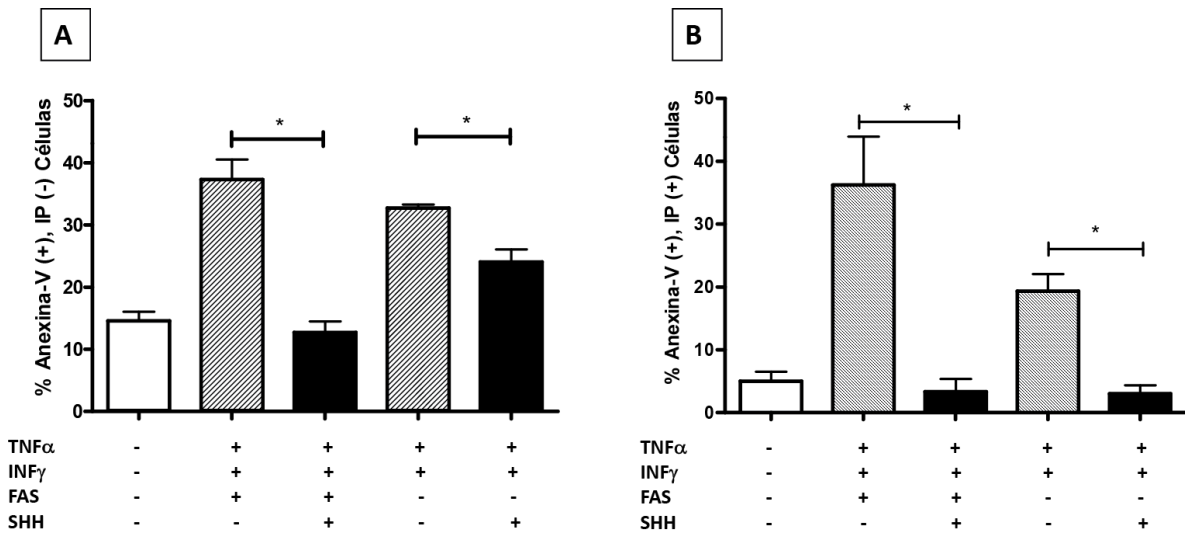


Figura 12. Sonic Hedgehog protege de la apoptosis inducida por TNF α /IFN γ /FAS a fibroblastos CCD25-Lu. Apoptosis temprana (A) y apoptosis tardía (B).

Posteriormente, analizamos los efectos del tratamiento de los fibroblastos CCD25-Lu con TNF α /IFN γ /FAS y/o SHH sobre un arreglo de anticuerpos contra proteínas relacionadas con apoptosis. Se observó que el estímulo de fibroblastos con la proteína recombinante SHH disminuye los niveles de HIF-1 α , SMAC/DIABLO y TNFR1 en comparación con el control (**Figura 13A**). Por su parte la mezcla TNF α /IFN γ /FAS incrementó diversos marcadores pro-apoptóticos, como la Caspasa-3 activa y disminuyó los niveles de proteínas anti-apoptóticas como cIAP-1, Bax, HO-1 y CDKN1A. Estos efectos de la combinación pro-apoptótica fueron atenuados con el tratamiento con SHH. Los niveles de caspasa-3 activa descendieron, así como HIF-1 α y de p53 (fosforilado en Ser 46) y aumentó la expresión de cIAP-1, cIAP-2 y XIAP (**Figura 13B**).

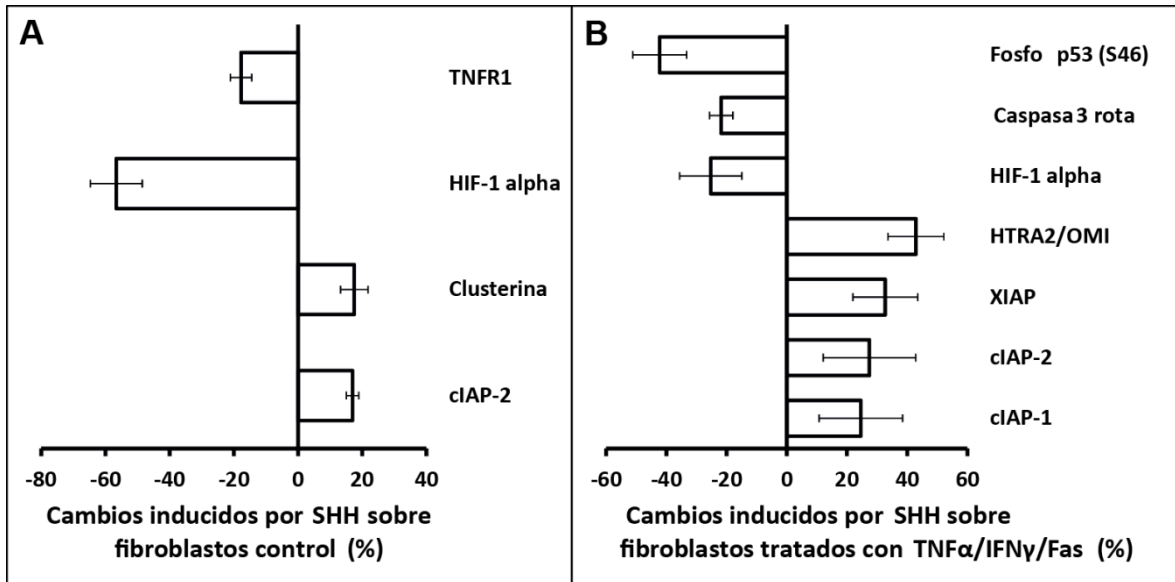


Figura 13. Efectos inducidos por SHH en proteínas relacionadas con apoptosis sobre fibroblastos CCD25-Lu. Cambios inducidos por SHH en la expresión de proteínas relacionadas con apoptosis en comparación con fibroblastos no tratados (control) (A). Cambios inducidos por SHH en fibroblastos tratados con TNF α /IFN γ /FAS para inducir apoptosis (B).

Sonic Hedgehog Induce la Migración de Fibroblastos.

SHH provocó un aumento significativo en la migración de fibroblastos CCD25-Lu (dos veces sobre el control). Aunque este incremento fue menor que el que se observó con el PDGF-BB (control positivo) un potente quimiotáctico de fibroblastos. El receptor de PDGF-BB es PGFR- β , el cual es un receptor con actividad de cinasa de tirosina y altera la dinámica de la membrana plasmática asociada con la migración celular, un proceso dependiente de la PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc). Recientemente se encontró que PDFG-BB indujo significativamente el tránsito de SMO desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática, a través de PKA, activando a SMO en células de colangiocarcinoma, protegiéndolas de apoptosis.⁶⁹ Interesantemente se ha observado el incremento en la expresión del ARN mensajero de SHH por PDGF-BB en colangiocitos inmaduros,⁷⁰ en conjunto estos datos sugieren que existe una comunicación entre estas dos rutas de señalización (SHH y PDGF-BB), es por ello que decidimos determinar si la migración inducida por SHH estaba mediada por PDGF-BB, añadiendo un anticuerpo neutralizante contra este factor. La neutralización de PDGF-BB redujo significativamente la migración inducida por SHH (*p<0.05), indicando que

PDGF-BB contribuye al menos en parte al efecto producido por SHH (Figura 14).

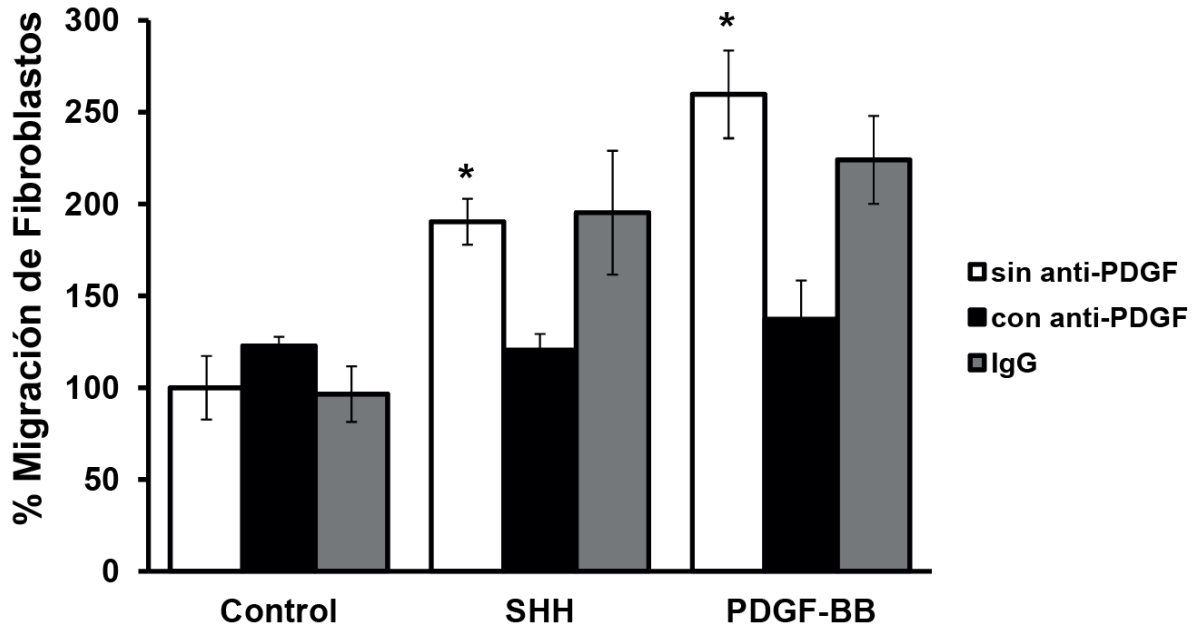


Figura 14. Migración de Fibroblastos CCD25-Lu producida por SHH en cámaras Boyden recubiertas con colágena. Los fibroblastos fueron tratados con SHH (2 μ g/ml), PDGF-BB (10 ng/ml) como control positivo, con el anticuerpo neutralizante anti-PDGF-BB o no tratados (control) durante 8 horas y se cuantificó la migración en cámaras Boyden recubiertas con colágena. La IgG se utilizó como control de isotipo.

SHH no Induce Transición Epitelio-Mesénquima en la Línea Celular A549.

Un mecanismo relevante en el desarrollo embrionario son las interacciones epitelio-mesénquima en el que SHH participa activamente. En este contexto nos preguntamos si SHH podría contribuir en la TEM. En este proceso, los marcadores típicos de células epiteliales disminuyen progresivamente y aparecen moléculas de células mesenquimatosas. Analizamos la expresión de un marcador de epitelio, E-cadherina por Western-Blot en la línea celular A549 (células epiteliales de pulmón) estimuladas con la proteína recombinante humana SHH. Como se muestra en la **figura 15**, SHH no indujo TEM en esta línea celular, ya que la expresión de E-cadherina no disminuyó, contrariamente al efecto observado por TGF- β un potente inductor de la transición epitelio-mesénquima.

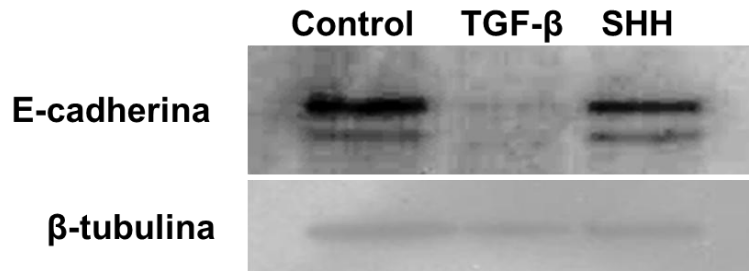


Figura 15. Western blot mostrando uno de los marcadores de células epiteliales: E-cadherina en células A549. La proteína recombinante humana SHH (5 $\mu\text{g/ml}$) no produjo cambios en la expresión de este marcador epitelial a 5 días de estímulo.

SHH no Induce Cambios en la Actividad Gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en la Línea Celular A549.

La MMP-2 y la MMP-9 se encuentran sobre-expresadas en la FPI⁷¹ y se ha propuesto que inducen el descontrol de las membranas basales ya que degradan diversos componentes de ésta y al parecer es un evento importante en la patogénesis de la FPI ya que aumentaría la invasión de fibroblastos dentro de los espacios alveolares.⁵⁰ Es por ello que exploramos si SHH inducía cambios en la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas de matriz 2 y 9 en la línea celular A549. Como se observa en la **figura 16A**, la proteína recombinante SHH no tiene ningún efecto en la actividad enzimática de la MMP-2 y -9, a diferencia de TGF- β que aumenta la actividad de MMP-2 y -9 como ya se ha reportado en ésta línea celular.⁷²

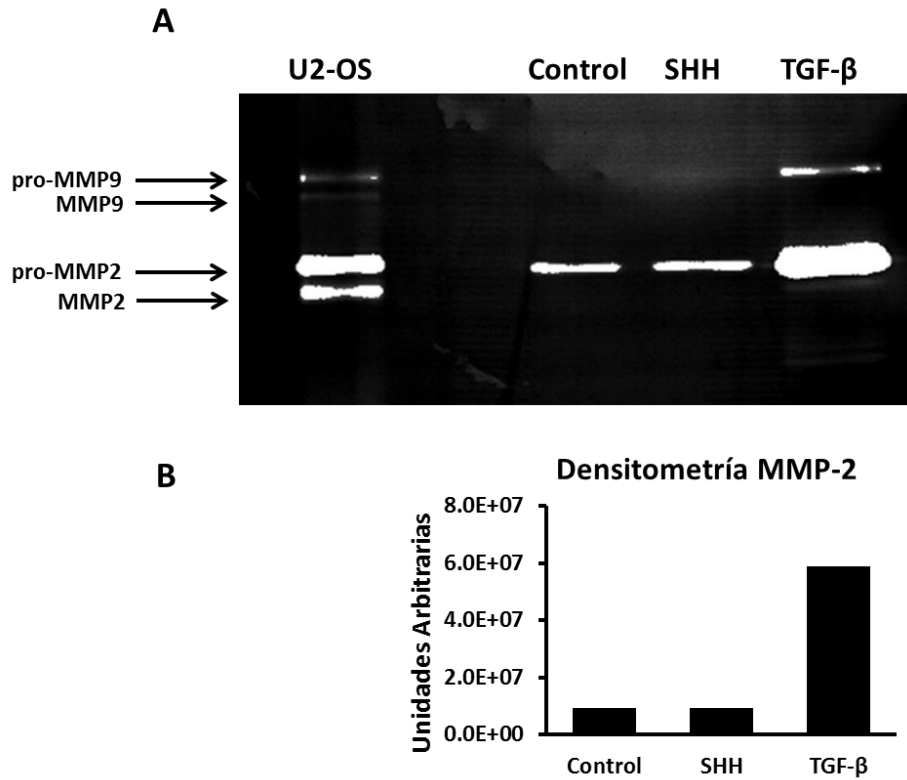


Figura 16. Zimograma de gelatina. Actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 de medios condicionados de células A549, células no estimuladas (control) y estimuladas con SHH y TGF- β por 72 horas (A). Densitometría de la banda correspondiente a pro-MMP-2 (B). El medio condicionado de células U2-OS fue utilizado como control positivo para MMP-9.

DISCUSIÓN

Numerosas investigaciones realizadas en la última década apoyan fuertemente la hipótesis de que la FPI se desarrolla por una comunicación aberrante entre epitelio-fibroblasto, en donde células del epitelio alveolar anormalmente activas secretan los mediadores responsables de la migración, proliferación, diferenciación a miofibroblastos y activación de las células mesenquimatosas. En este contexto, evidencias recientes apoyan la hipótesis que ésta comunicación anormal resulta al menos en parte por la reactivación de diferentes vías de señalización propias del desarrollo embrionario.^{55, 73, 74} Así por ejemplo, el análisis conjunto de nuestros estudios relacionados con el perfil de expresión de genes a través de microarreglos^{61, 75, 76} donde se usaron herramientas analíticas que permitieron el mapeo global no sesgado de temas genómicos funcionales revelaron que los pulmones de pacientes con FPI se encontraban significativamente enriquecidos con genes asociados con el desarrollo pulmonar.⁵⁵ Entre los genes sobre-expresados asociados al desarrollo embrionario estaba el receptor de Sonic Hedgehog, PTCH1. Asimismo, análisis de rutas de los blancos predichos para los microARNs que se encuentran diferencialmente expresados en pulmones con FPI mostraron también, un enriquecimiento de blancos pertenecientes a la ruta de SHH.⁵⁶

En este trabajo, se examina por primera vez la expresión génica de los principales componentes de la ruta de señalización SHH así como su inmunolocalización en pulmones con fibrosis pulmonar idiopática. Nuestros hallazgos muestran que esta ruta se encuentra activada en esta enfermedad, ya que todos los componentes estudiados, SHH, su receptor PTCH1, el co-receptor SMO, y los factores de transcripción GLI1 y GLI2 se encontraron sobre-expresados. SHH se observó principalmente en el epitelio alveolar y bronquiolar, mientras que su receptor PTCH1 fue detectado en células mesenquimatosas en focos de fibroblastos, así como en células inflamatorias intersticiales. Estudios previos, también encontraron que SHH es expresado por células epiteliales en el pulmón mientras que el receptor ha sido observado en macrófagos y en linfocitos T.^{32, 33} El efecto funcional de la expresión de PTCH1 en células mononucleares es incierto, pero estudios recientes señalan que SHH es un potente quimio-atrayente de monocitos.⁷⁷ Por otro lado, el papel de SHH en la función de células T es controversial.

Por ejemplo, en linfocitos T periféricos, los cambios transcripcionales inducidos por la activación de esta ruta de señalización conducen a una reducida activación de células T.⁷⁸ Sin embargo, la activación de la vía Hedgehog en linfocitos puede contribuir a la expansión local de poblaciones invariantes de células NKT durante cierto tipo de daño fibrosante del hígado.⁷⁹

De manera interesante, también encontramos la expresión del factor de transcripción GLI1 en fibroblastos y en células inflamatorias. En cambio, el co-receptor SMO estuvo presente fundamentalmente en los focos de fibroblastos, sugiriendo que el ligando de esta ruta (SHH) es producido por células epiteliales y señala a través de su receptor y co-receptor expresados en fibroblastos. Sin embargo, alguna implicación de la ruta de Sonic Hedgehog en la migración de macrófagos o en algunas funciones de linfocitos no puede descartarse.

Por otro lado, cuando estudiamos los fibroblastos *in vitro* también observamos una fuerte sobre-expresión de los componentes de la ruta de señalización de SHH en fibroblastos de pacientes con FPI en comparación con los fibroblastos humanos de pulmón normal. Incluso fibroblastos obtenidos directamente de focos de fibroblastos por microdissección con láser, expresaron cantidades significativamente mayores del receptor PTCH1 en comparación con fibroblastos derivados de cuerpos de Masson de pulmones con neumonía organizada.

La unión de SHH con PTCH1 permite que SMO sea desinhibido por la represión de PTCH1, lo que provoca que la señal se transmita al núcleo a través de los factores de transcripción GLI. Un hallazgo interesante de este estudio, fue que mientras GLI1 fue expresado por fibroblastos, la expresión de GLI2 se localizó en el epitelio, sugiriendo que la señalización de SHH puede darse también por una activación de células epiteliales de manera autocrina y/o paracrina.

Para determinar si SHH afectaba el comportamiento de los fibroblastos, exploramos el efecto de esta ruta en fibroblastos de pacientes con FPI y en fibroblastos normales en diferentes procesos que se encuentran desregulados en la FPI, incluyendo la migración, proliferación, apoptosis, expresión de colágena y fibronectina, y la diferenciación a miofibroblasto.

La migración y la proliferación son pasos críticos en la reparación de heridas, a través de los cuales los fibroblastos llegan y se expanden en los sitios dañados. Una excesiva migración y proliferación, en conjunto con una subsiguiente síntesis exagerada de moléculas de matriz extracelular, conduce a una respuesta fibrótica. En este contexto, nuestros resultados revelaron que SHH participa en ambos procesos. Así, por un lado encontramos que SHH es un potente quimio-atrayente de fibroblastos pulmonares. Este proceso de migración fue atenuado mediante la neutralización de PDGF-BB lo que sugiere que la actividad quimiotáctica de Sonic es parcialmente mediada por este factor de crecimiento. Asimismo, un estudio reciente sugiere que al menos en fibroblastos embrionarios de ratón, se requiere de la activación de GTPasas pequeñas (Rac1 y RhoA) para la inducción de migración celular por SHH. Este hallazgo indica que la migración puede llevarse a cabo por una vía no-canónica, esto es, independientemente de los factores de transcripción GLI.^{69, 80} Sin embargo, estos resultados no han sido repetidos en fibroblastos obtenidos de tejidos adultos.

Asimismo, nuestros hallazgos muestran que SHH incrementó la proliferación de fibroblastos derivados de pulmones con FPI y normales e incrementaron la expresión de colágena y fibronectina. Un incremento en la producción de colágena también se ha reportado recientemente en fibroblastos derivados de piel de individuos normales y pacientes con esclerosis sistémica.⁸¹ Por otro lado, debido a que se ha reportado la existencia de una comunicación cruzada entre las rutas de SHH y TGF- β ,⁸²⁻⁸⁴ y este último es un potente inductor de la síntesis de colágena, hipotetizamos que este efecto del TGF- β podría deberse en parte al SHH. Sin embargo, el uso de ciclopamina (un inhibidor específico de ésta ruta de señalización) no tuvo ningún efecto en la síntesis de colágena inducida por TGF- β en fibroblastos de pulmón.

Existe evidencia que indica que la persistencia de fibroblastos/miofibroblastos en los focos de fibroblastos, una característica que desempeña un papel importante en la patogénesis de la FPI, está probablemente relacionado con la resistencia a apoptosis. Sin embargo, los mecanismos responsables de esta posible resistencia a la muerte celular programada de los fibroblastos de pacientes con FPI no se conocen con precisión.^{43, 85} Algunos estudios han sugerido que la endotelina 1 activa la

vía de señalización PI3K/AKT e inhibe la apoptosis de fibroblastos pulmonares normales y de FPI, y esta inhibición se revierte al bloquear la MAPK p38 o PI3K. Además, TGF- β 1 enciende la misma vía de señalización (PI3K/AKT) pero independientemente de endotelina 1. Por otro lado, se ha observado que fibroblastos de FPI presentan una expresión reducida de la molécula pro-apoptótica p14^{ARF}. Esta disminución fue atribuida a la hipermetilación del promotor de p14^{ARF}, ya que la mayoría de los fibroblastos de FPI revelaron esta hipermetilación, y los que la presentaban fueron más resistentes a la apoptosis inducida por estaurosporina en comparación con fibroblastos normales y de FPI no metilados; así, mecanismos epigenéticos también podrían regular la resistencia a apoptosis de fibroblastos pulmonares.^{86, 87}

Nosotros decidimos evaluar si la ruta de señalización de SHH tenía algún efecto en este proceso en fibroblastos pulmonares humanos para lo cual indujimos la muerte celular con la combinación de TNF- α , IFN- γ , y FAS.⁶⁴ Nuestros resultados mostraron que SHH posee un potente efecto antiapoptótico sobre fibroblastos, tanto en la apoptosis basal (espontánea) o inducida, indicando que esta ruta de señalización está involucrada en la resistencia a apoptosis. Para identificar componentes de la maquinaria apoptótica de los fibroblastos que pueden responder a la señalización de SHH, empleamos un arreglo de anticuerpos contra proteínas involucradas en apoptosis. Este arreglo determina cambios semi-cuantitativos en proteínas críticas de apoptosis y de punto de control del ciclo celular. Nuestros hallazgos revelaron que las alteraciones en el equilibrio bien regulado de señales proapoptóticas y antiapoptóticas que son inducidas por el tratamiento con TNF- α /IFN- γ /FAS son fuertemente contrarrestadas por SHH. SHH incrementó la expresión de cIAP-1, cIAP-2 y XIAP, los miembros más representativos de la familia de inhibidores de apoptosis IAP, que suprimen la activación de la vía extrínseca de muerte celular inducida por la señalización de TNF- α a través de TNF-R1.⁸⁸ XIAP inhibe la apoptosis a través de la unión y la consecuente inhibición de la caspasa-9 iniciadora y de las caspasas efectoras.⁸⁹ Un estudio reciente indica que la regulación de la expresión de XIAP por la señalización de Hedgehog es mediada por GLI2 ya que este factor de transcripción se une a la región promotora de XIAP y regula su expresión.⁹⁰ Interesantemente, SHH

disminuyó la expresión en fibroblastos de HIF-1 α , que al parecer posee un papel dual en el destino celular. HIF-1 α incrementa la sobrevivencia celular en respuesta a hipoxia pero también se le ha asociado con la inducción de muerte celular en otros escenarios.^{91, 92} Por otro lado, se sabe que la hipoxia induce una repuesta de Hedgehog mediada por HIF-1 α , pero el efecto de SHH en la expresión de HIF-1 α no se conoce.⁹³ Nuestros hallazgos sugieren que bajo condiciones normóxicas, SHH disminuye la expresión de HIF-1 α en fibroblastos, aunque si esto ocurre por un efecto directo en la expresión génica o por un efecto indirecto en la estabilidad del ARN mensajero o proteína actualmente se desconoce.

Finalmente, se exploró la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en fibroblastos de pulmón humano de diferentes fuentes por dos técnicas diferentes (expresión de α -SMA por Western blot e inmunofluorescencia) sin observar algún efecto de SHH. Asimismo, quisimos averiguar si SHH inducía transición epitelio-mesénquima, un proceso que ha sido involucrado en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática. Para este propósito, células del epitelio alveolar A549 fueron estimuladas con diferentes dosis de la proteína recombinante SHH y a diferentes tiempos, sin observar cambios en la expresión de E-cadherina. Además, evaluamos la actividad gelatinolítica de MMP-2 y -9 en zimogramas de gelatina de medios condicionados de células A549 estimuladas con SHH por 24 y 72 horas y tampoco encontramos diferencias.

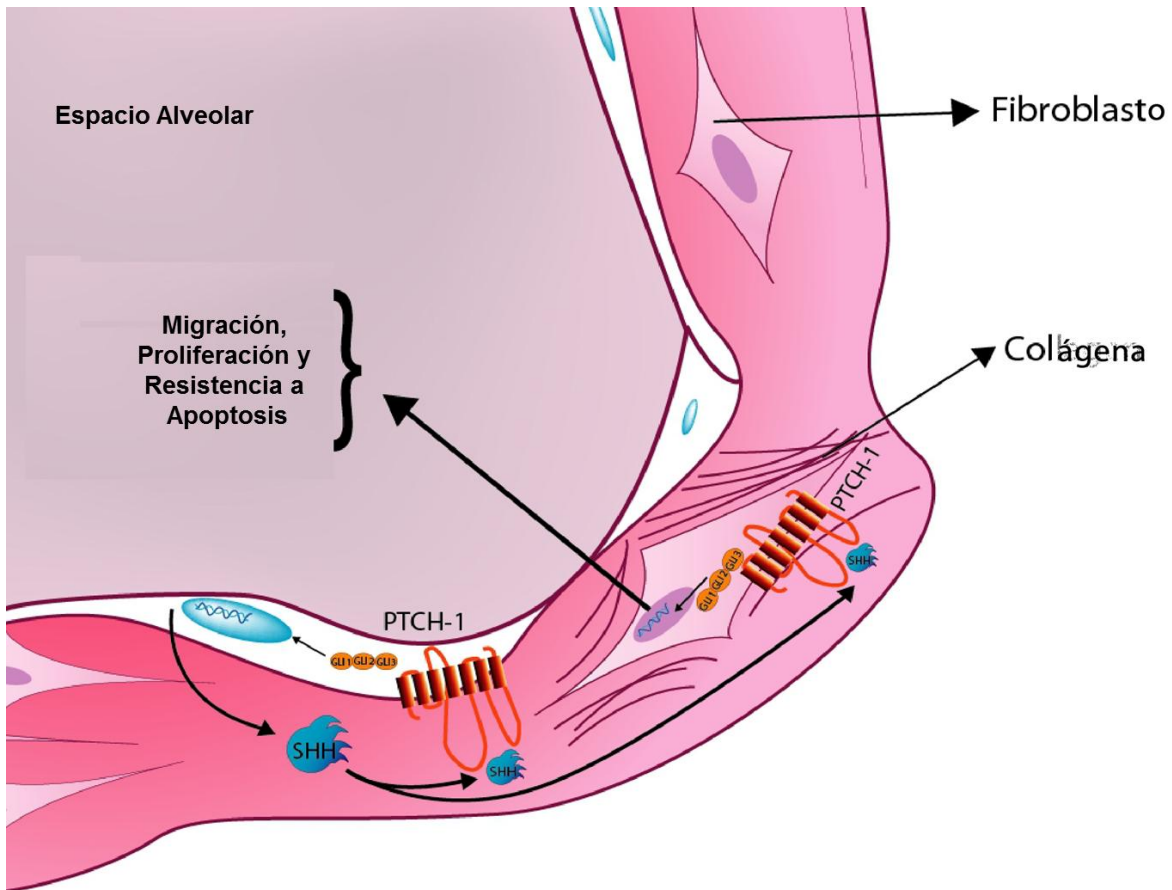


Figura 17. Modelo de la Ruta de Señalización Sonic Hedgehog en el Desarrollo de la Fibrosis Pulmonar Idiopática. Las células del epitelio alveolar secretan al SHH el cual se une a su receptor PTCH1 presente en fibroblastos, encendiendo los mecanismos de señalización, los factores de transcripción GLI se translocan al núcleo en su forma completa activando genes blanco. Esta ruta conduce a que los fibroblastos migren, proliferen, se vuelvan resistentes a apoptosis, secreten moléculas de matriz intersticial como colágena y fibronectina, contribuyendo al desarrollo de fibrosis y la consecuente destrucción del parénquima pulmonar.

En resumen, nuestros hallazgos demostraron que la señalización de la vía de SHH se encuentra sobre-expresada en pulmones de pacientes con FPI, lo que probablemente contribuye a su patogénesis. Específicamente, SHH podría contribuir a la expansión (como mitógeno y quimio-atrayente) y sobrevivencia de la población de fibroblastos, así como a la producción de matriz extracelular (Figura 17).

CONCLUSIONES

La ruta de señalización Sonic Hedgehog tiene relativamente pocos años de haber sido descubierta; desde entonces ha sido relacionada con diversos síndromes, malformaciones y con diferentes tipos de cáncer. Presenta una gama amplia de funciones biológicas dependiendo del modelo o sistema fisiológico en el que se expresa. En este trabajo estudiamos la señalización de Sonic Hedgehog y su participación en el proceso fibrogénico en la Fibrosis Pulmonar Idiopática, y encontramos que:

- Los principales componentes de la vía (SHH, PTCH1, SMO, GLI1 y GLI2) se encuentran sobre-expresados en pulmones de pacientes con FPI, tanto a nivel de ARN mensajero como proteína.
- Los fibroblastos provenientes de FPI sobre-expresan estos genes: SHH, PTCH1, GLI1 y GLI2.
- SHH aumenta la proliferación de fibroblastos normales y de pacientes con FPI.
- SHH incrementa significativamente moléculas de la matriz extracelular como fibronectina y colágena.
- SHH atenúa la apoptosis espontánea y la inducida por TNF α /IFN γ /FAS, protegiendo a los fibroblastos de la muerte celular programada. Esta protección se correlaciona con la disminución de marcadores pro-apoptóticos, ejemplificado en el marcado descenso de la caspasa-3 activa.
- SHH induce la migración de fibroblastos y este proceso está parcialmente mediado por PDGF-BB.
- SHH no tuvo ningún efecto en la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, en la transición epitelio-mesénquima, ni en la actividad gelatinolítica de MMP-2 y -9.

Por lo tanto, encontramos que la ruta de señalización de Sonic Hedgehog se expresa y opera en la Fibrosis Pulmonar Idiopática, estos hallazgos, sugieren que inhibir esta vía, podría ser una prometedora estrategia terapéutica para ésta devastadora enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795–801 (1980).
2. Guerrero, I. & Chiang, C. A conserved mechanism of Hedgehog gradient formation by lipid modifications. *Trends Cell Biol* **17**, 1–5 (2007).
3. Eaton, S. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 437–45 (2008).
4. McMahon, A.P. More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* **100**, 185–8 (2000).
5. Mann, R.K. & Beachy, P.A. Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem* **73**, 891–923 (2004).
6. Ingham, P.W. Hedgehog signalling. *Curr Biol* **18**, R238–41 (2008).
7. Chang, S.C., Mulloy, B., Magee, A.I. & Couchman, J.R. Two distinct sites in sonic Hedgehog combine for heparan sulfate interactions and cell signaling functions. *J Biol Chem* **286**, 44391–402 (2011).
8. Hooper, J.E. & Scott, M.P. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 306–17 (2005).
9. Rubin, L.L. & de Sauvage, F.J. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 1026–33 (2006).
10. Ayers, K.L. & Therond, P.P. Evaluating Smoothed as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling. *Trends Cell Biol* **20**, 287–98 (2010).
11. Cohen, M.M., Jr. Hedgehog signaling update. *Am J Med Genet A* **152A**, 1875–914 (2010).
12. Ingham, P.W. & McMahon, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059–87 (2001).

13. Jenkins, D. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal* **21**, 1023–34 (2009).
14. Riobo, N.A. & Manning, D.R. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J* **403**, 369–79 (2007).
15. Simpson, F., Kerr, M.C. & Wicking, C. Trafficking, development and hedgehog. *Mech Dev* **126**, 279–88 (2009).
16. Eggenchwiler, J. Hedgehog signaling and the cilium: in the zone. *Dev Cell* **23**, 677–8 (2012).
17. Varjosalo, M. & Taipale, J. Hedgehog signaling. *J Cell Sci* **120**, 3–6 (2007).
18. Huangfu, D. & Anderson, K.V. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* **133**, 3–14 (2006).
19. Shannon, J.M. & Hyatt, B.A. Epithelial–mesenchymal interactions in the developing lung. *Annu Rev Physiol* **66**, 625–45 (2004).
20. Bellusci, S. et al. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* **124**, 53–63 (1997).
21. van Tuyl, M. & Post, M. From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Respir Res* **1**, 30–5 (2000).
22. Bitgood, M.J. & McMahon, A.P. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell–cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* **172**, 126–38 (1995).
23. Shi, W., Chen, F. & Cardoso, W.V. Mechanisms of lung development: contribution to adult lung disease and relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **6**, 558–63 (2009).

24. Warburton, D., Gauldie, J., Bellusci, S. & Shi, W. Lung development and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 668–72 (2006).
25. Watkins, D.N. et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* **422**, 313–7 (2003).
26. Vestergaard, J. et al. Hedgehog signaling in small-cell lung cancer: frequent in vivo but a rare event in vitro. *Lung Cancer* **52**, 281–90 (2006).
27. Park, K.S. et al. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med* **17**, 1504–8 (2011).
28. Gialmanidis, I.P. et al. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* **66**, 64–74 (2009).
29. Velcheti, V. & Govindan, R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *J Thorac Oncol* **2**, 7–10 (2007).
30. Fabian, S.L. et al. Hedgehog-Gli pathway activation during kidney fibrosis. *Am J Pathol* **180**, 1441–53 (2012).
31. Omenetti, A. et al. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* **118**, 3331–42 (2008).
32. Stewart, G.A. et al. Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *J Pathol* **199**, 488–95 (2003).
33. Coon, D.R., Roberts, D.J., Loscertales, M. & Kradin, R. Differential epithelial expression of SHH and FOXF1 in usual and nonspecific interstitial pneumonia. *Exp Mol Pathol* **80**, 119–23 (2006).
34. Fitch, P.M., Howie, S.E. & Wallace, W.A. Oxidative damage and TGF- β differentially induce lung epithelial cell sonic hedgehog and tenascin-C expression: implications for the regulation of lung

- remodelling in idiopathic interstitial lung disease. *Int J Exp Pathol* **92**, 8–17 (2011).
35. Cigna, N. et al. The Hedgehog System Machinery Controls Transforming Growth Factor- β -Dependent Myofibroblastic Differentiation in Humans: Involvement in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* **181**, 2126–37 (2012).
 36. Selman, M. & Pardo, A. Alveolar epithelial cell disintegrity and subsequent activation: a key process in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 119–21 (2012).
 37. Raghu, G. et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 788–824 (2011).
 38. Scotton, C.J. & Chambers, R.C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* **132**, 1311–21 (2007).
 39. Garcia-Sancho, C. et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **105**, 1902–7 (2011).
 40. Garcia-Sancho Figueroa, M.C. et al. Risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican population. A case-control study. *Respir Med* **104**, 305–9 (2010).
 41. Selman, M., King, T.E. & Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* **134**, 136–51 (2001).
 42. Selman, M. & Pardo, A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 364–72 (2006).
 43. King, T.E., Jr., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **378**, 1949–61 (2011).
 44. Pardo, A. & Selman, M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci* **7**, d1743–61 (2002).

45. Fernandez, I.E. & Eickelberg, O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **380**, 680–8 (2012).
46. Uhal, B.D. et al. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* **269**, L819–28 (1995).
47. Uhal, B.D. et al. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* **275**, L1192–9 (1998).
48. Wang, R. et al. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol* **277**, L1158–64 (1999).
49. Selman, M. et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L562–74 (2000).
50. Pardo, A. & Selman, M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 383–8 (2006).
51. Kis, K., Liu, X. & Hagood, J.S. Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease. *Expert Rev Mol Med* **13**, e27 (2011).
52. Garcia-de-Alba, C. et al. Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 1144–52 (2010).
53. Mendoza, C. et al. DHEA has strong antifibrotic effects and is decreased in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* (2012).
54. Selman, M., Rojas, M., Mora, A.L. & Pardo, A. Aging and interstitial lung diseases: unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **31**, 607–17 (2010).
55. Selman, M., Pardo, A. & Kaminski, N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* **5**, e62 (2008).

56. Pandit, K.V., Milosevic, J. & Kaminski, N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* **157**, 191–9 (2011).
57. Pardo, A. et al. CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis. *J Leukoc Biol* **70**, 610–6 (2001).
58. Ramos, C. et al. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK/ERK kinase pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **299**, L222–31 (2010).
59. Mikulowska-Mennis, A. et al. High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection. *Biotechniques* **33**, 176–9 (2002).
60. Witchell, J., Varshney, D., Gajjar, T., Wangoo, A. & Goyal, M. RNA isolation and quantitative PCR from HOPE- and formalin-fixed bovine lymph node tissues. *Pathol Res Pract* **204**, 105–11 (2008).
61. Pardo, A. et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* **2**, e251 (2005).
62. Selman, M. et al. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* **2**, e482 (2007).
63. van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. & Reutelingsperger, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31**, 1–9 (1998).
64. Frankel, S.K. et al. TNF- α sensitizes normal and fibrotic human lung fibroblasts to Fas-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 293–304 (2006).
65. Kasper, J. et al. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicol* **8**, 6 (2011).
66. Ray, R.B., Raychoudhuri, A., Steele, R. & Nerurkar, P. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. *Cancer Res* **70**, 1925–31 (2010).

67. Cabrera, S. et al. Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 2324–38 (2007).
68. Thannickal, V.J. & Horowitz, J.C. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 350–6 (2006).
69. Fingas, C.D. et al. Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* **54**, 2076–88 (2011).
70. Omenetti, A. et al. The hedgehog pathway regulates remodelling responses to biliary obstruction in rats. *Gut* **57**, 1275–82 (2008).
71. Pardo, A. & Selman, M. Role of matrix metalloproteases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5 Suppl 1**, S9 (2012).
72. Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M. & Niedzwiecki, A. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep* **21**, 1323–33 (2009).
73. Konigshoff, M. & Eickelberg, O. WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 21–31 (2010).
74. Vuga, L.J. et al. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 583–9 (2009).
75. Selman, M. et al. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 188–98 (2006).
76. Zuo, F. et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6292–7 (2002).
77. Dunaeva, M., Voo, S., van Oosterhoud, C. & Waltenberger, J. Sonic hedgehog is a potent chemoattractant for human monocytes: diabetes mellitus inhibits Sonic hedgehog-induced monocyte chemotaxis. *Basic Res Cardiol* **105**, 61–71 (2010).

78. Rowbotham, N.J., Hager-Theodorides, A.L., Furmanski, A.L. & Crompton, T. A novel role for Hedgehog in T-cell receptor signaling: implications for development and immunity. *Cell Cycle* **6**, 2138-42 (2007).
79. Syn, W.K. et al. Role for hedgehog pathway in regulating growth and function of invariant NKT cells. *Eur J Immunol* **39**, 1879-92 (2009).
80. Polizio, A.H. et al. Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem* **286**, 19589-96 (2011).
81. Horn, A. et al. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **64**, 2724-33 (2012).
82. Fisher, C.E., Ahmad, S.A., Fitch, P.M., Lamb, J.R. & Howie, S.E. FITC-induced murine pulmonary inflammation: CC10 up-regulation and concurrent Shh expression. *Cell Biol Int* **29**, 868-76 (2005).
83. Li, M. et al. Mesodermal deletion of transforming growth factor-beta receptor II disrupts lung epithelial morphogenesis: cross-talk between TGF-beta and Sonic hedgehog pathways. *J Biol Chem* **283**, 36257-64 (2008).
84. Maitah, M.Y., Ali, S., Ahmad, A., Gadgeel, S. & Sarkar, F.H. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF-beta1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells. *PLoS One* **6**, e16068 (2011).
85. Maher, T.M. et al. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 73-82 (2010).
86. Cisneros, J. et al. Hypermethylation-mediated silencing of p14(ARF) in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **303**, L295-303 (2012).
87. Kulasekaran, P. et al. Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 484-93 (2009).

88. Darding, M. & Meier, P. IAPs: guardians of RIPK1. *Cell Death Differ* **19**, 58–66 (2012).
89. Kaufmann, T., Strasser, A. & Jost, P.J. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ* **19**, 42–50 (2012).
90. Kurita, S. et al. Hedgehog inhibition promotes a switch from Type II to Type I cell death receptor signaling in cancer cells. *PLoS One* **6**, e18330 (2011).
91. Bruick, R.K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9082–7 (2000).
92. Carmeliet, P. et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485–90 (1998).
93. Bijlsma, M.F. et al. Hypoxia induces a hedgehog response mediated by HIF-1alpha. *J Cell Mol Med* **13**, 2053–60 (2009).

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AMPc: Adenosín Monofosfato cíclico
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
ARNr: Ácido Ribonucleico ribosomal
ATCC: del inglés, American Type Culture Collection
ATS: del inglés, American Thoracic Society
BMP: Proteína Morfogenética del Hueso
BOC: del inglés, Brother of CDO
BSA: Albúmina de Suero Bovino
c/u: cada uno
CDO: del inglés, CAM-related 1 downregulated by oncogenes
CEAs: Células Epiteliales Alveolares
Ci: Cubitus interruptus
CK1a: Caseína Cinasa 1a
CO₂: Dióxido de Carbono
Cos2: Costal 2
C-terminal: Carboxilo terminal
Cyc: Ciclopamina
DEPC: Dietilpirocarbonato
DHEA: Dehidroepiandrosterona
DHH: Desert Hedgehog
DISP: Dispatched
EC: reactivo de acoplamiento a electrones
EDTA: Ácido Etilendiamintetraacético
ELISA: del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPOC: Enfermedad Pulmonar Crónico-Obstructiva
ERS: del inglés, European Respiratory Society
FACS: del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*
FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática
FSP-1: Proteína Específica de Fibroblastos 1
Fu: Fused
GAS1: del inglés, Growth Arrest-Specific 1
GLI: del inglés, Glioma-associated oncogene
GLI1: del inglés, Glioma-associated oncogene 1
GLI2: del inglés, Glioma-associated oncogene 2
GLI3: del inglés, Glioma-associated oncogene 3

GPCR: Receptor Acoplado a Proteínas G
GSK3 β : Glucógeno Sintasa Cinasa 3 β
H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
Hh: del inglés, Hedgehog
HHIP: del inglés, Human Hedgehog Interacting Protein
HIF-1 α : Factor 1 α inducido por hipoxia
HRP: Peroxidasa de Rábano
IFN γ : Interferón γ
IgG: Inmunoglobulina G
IHH: Indian Hedgehog
INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
kDa: kilodaltones
MEC: Matriz Extracelular
mg: miligramo
MgCl₂: Cloruro de Magnesio
ml: mililitro
MMP: Metaloproteasa de Matriz Extracelular
ng: nanogramo
NKT: del inglés Natural Killer T cell
nm: nanómetros
N-terminal: Amino terminal
PBS: del inglés, Phosphate Buffered Saline
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF-BB: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas isoforma BB
PE: Ficoeritrina
PGFR- β : Receptor del Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas β
PI: Yoduro de Propidio
PKA: Proteína Cinasa A
PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PN: Pulmón Normal
PS: Fosfatidilserina
Ptc: Patched
PTCH1: Patched1
PTCH2: Patched2
Rab23: del inglés, RAB23, member RAS oncogene family
RS: sistema mitocondrial succinato tetrazolio reductasa
RT-PCR: Transcripción Reversa-PCR
SCUBE2: del inglés, Signal Peptide, CUB Domain, EGF-like 2
SDS: Dodecilsulfato Sódico
SFB: Suero Fetal Bovino
SHH: Sonic Hedgehog

Ski: Skinny hedgehog

SMO: Smoothened

SP-C: Proteína Surfactante C

SuFu: Supressor of Fused

TEM: Transición Epitelio-Mesénquima

TGF β 1: Factor de Crecimiento Transformante β 1

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral α

V: Volt

WNT: del inglés, Wingless-type

WST-1:(4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3 benzeno disulfonato)

ZO-1: Zona Oclusiva 1

α -SMA: del inglés, α -Smooth Muscle Actin

β -TrCP: Ligasa de Ubiquitina

μ g: microgramo

μ l: microlitro

ANEXO

Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis

Alfredo Lozano Bolaños, Criselda Mendoza Milla, José Cisneros Lira, Remedios Ramírez, Marco Checa, Lourdes Barrera, Jorge García-Alvarez, Verónica Carbajal, Carina Becerril, Miguel Gaxiola, Annie Pardo and Moisés Selman

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 303:L978-L990, 2012. First published 28 September 2012;
doi: 10.1152/ajplung.00184.2012

You might find this additional info useful...

This article cites 51 articles, 18 of which you can access for free at:
<http://ajplung.physiology.org/content/303/11/L978.full#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
<http://ajplung.physiology.org/content/303/11/L978.full>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* can be found at:
<http://www.the-aps.org/publications/ajplung>

This information is current as of December 4, 2012.

American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology publishes original research covering the broad scope of molecular, cellular, and integrative aspects of normal and abnormal function of cells and components of the respiratory system. It is published 24 times a year (twice monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2012 the American Physiological Society. ISSN: 1522-1504. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.

Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis

Alfredo Lozano Bolaños,¹ Criselda Mendoza Milla,¹ José Cisneros Lira,¹ Remedios Ramírez,² Marco Checa,¹ Lourdes Barrera,¹ Jorge García-Alvarez,² Verónica Carbajal,¹ Carina Becerril,¹ Miguel Gaxiola,¹ Annie Pardo,² and Moisés Selman¹

¹Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, ²Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Submitted 11 June 2012; accepted in final form 21 September 2012

Lozano Bolaños A, Mendoza Milla C, Cisneros Lira J, Ramírez R, Checa M, Barrera L, García-Alvarez J, Carbajal V, Becerril C, Gaxiola M, Pardo A, Selman M. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L978–L990, 2012. First published September 28, 2012; doi:10.1152/ajplung.00184.2012.— Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal disease of unknown etiology and uncertain pathogenic mechanisms. Recent studies indicate that the pathogenesis of the disease may involve the abnormal expression of certain developmental pathways. Here we evaluated the expression of Sonic Hedgehog (SHH), Patched-1, Smoothened, and transcription factors *glioma-associated oncogene homolog* (GLI)1 and GLI2 by RT-PCR, as well as their localization in IPF and normal lungs by immunohistochemistry. The effects of SHH on fibroblast proliferation, migration, collagen and fibronectin production, and apoptosis were analyzed by WST-1, Boyden chamber chemotaxis, RT-PCR, Sircol, and annexin V-propidium iodide binding assays, respectively. Our results showed that all the main components of the Sonic signaling pathway were overexpressed in IPF lungs. With the exception of Smoothened, they were also upregulated in IPF fibroblasts. SHH and GLI2 localized to epithelial cells, whereas Patched-1, Smoothened, and GLI1 were observed mainly in fibroblasts and inflammatory cells. No staining was detected in normal lungs. Recombinant SHH increased fibroblast proliferation ($P < 0.05$), collagen synthesis, (2.5 ± 0.2 vs. 4.5 ± 1.0 μg of collagen/ml; $P < 0.05$), fibronectin expression (2–3-fold over control), and migration ($190.3 \pm 12.4\%$ over control, $P < 0.05$). No effect was observed on α -smooth muscle actin expression. SHH protected lung fibroblasts from TNF- α /IFN- γ /Fas-induced apoptosis ($14.5 \pm 3.2\%$ vs. $37.3 \pm 7.2\%$, $P < 0.0001$). This protection was accompanied by modifications in several apoptosis-related proteins, including increased expression of X-linked inhibitor of apoptosis. These findings indicate that the SHH pathway is activated in IPF lungs and that SHH may contribute to IPF pathogenesis by increasing the proliferation, migration, extracellular matrix production, and survival of fibroblasts.

lung fibrosis; fibroblasts; apoptosis

IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS (IPF) is a progressive and lethal disease of unknown etiology, characterized by alveolar epithelial injury, fibroblast activation, migration, proliferation and differentiation to myofibroblasts, and abnormal accumulation of extracellular matrix, all leading to destruction of lung architecture (13, 20, 39, 46). Recent studies indicate that the pathogenesis of the disease may involve the abnormal expression of certain developmental pathways (22, 41, 48). In this context, we found that Patched-1 (PTCH1), the Hedgehog receptor, is one of the upregulated genes that characterize the transcriptional signature of IPF lungs (41).

Address for reprint requests and other correspondence: M. Selman, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan 4502, CP 14080, México DF, México (e-mail: mselman@yahoo.com.mx)

The Hedgehog signaling pathway is highly regulated, as it plays critical roles in embryonic development, tissue patterning, and organogenesis (14, 36). There are three hedgehog homologs in mammals, Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH), and Desert hedgehog (DHH) (1, 14). Hedgehog signaling responses are mediated by PTCH1, a 12-pass integral membrane protein, and Smoothened (SMO), a seven-pass integral membrane protein (1).

The three hedgehog homologs identified in humans have different spatial and temporal distribution patterns. SHH is the most broadly expressed, and it has been shown to be responsible for patterning the lung, where it is important for branching morphogenesis (25, 32). By contrast, DHH and IHH have more restricted roles. Thus DHH expression is largely restricted to gonads (germ cells in the testis), whereas IHH is primarily involved in the development of long-bone growth and cartilage (1, 43, 47).

During mouse lung development, SHH is highly expressed in the distal epithelium and diffuses from there to activate signaling in the nearby mesenchyme via PTCH1, SMO, and their transcriptional effectors *glioma-associated oncogene homolog* (GLI)1, GLI2, and GLI3 (1, 2, 15, 17, 42). In mice lung development, *Shh* overexpression increases the ratio of interstitial mesenchyme to distal epithelial tubules, an effect that is most pronounced just before birth, when transgenic lungs contain excessive mesenchyme (2).

Studies in human adult lungs have revealed overexpression of SHH in the alveolar epithelium of patients with IPF and other idiopathic interstitial pneumonias (6, 11, 44). Likewise, upregulation of SHH has been also immunohistochemically detected in fibrotic remodeling after exposure to fluorescein isothiocyanate (10). SHH is released by human type-II alveolar epithelial cells in vitro, which is stimulated by oxidative injury and inhibited by TGF- β (11). However, studies of all the components of the SHH signaling pathway, as well as the effect of Sonic on adult human lung fibroblasts, have not been previously explored.

The present study was designed to examine the expression of all the components of this pathway, e.g., SHH, PTCH1, SMO, GLI1, and GLI2, in IPF lungs and to determine the effects of SHH on several cell processes in fibroblasts obtained from IPF and normal human lungs.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Science and Bioethical Committee at the National Institute of Respiratory Diseases.

Immunohistochemistry. We examined the localization of SHH, PTCH1, SMO, GLI1, and GLI2 in seven IPF and three normal lungs. Immunohistochemical analysis was performed as described (31). Briefly, lung sections were incubated for 18 h at 4°C with one of

the following primary monoclonal antibodies: anti-SHH [Abcam/ab73958 (1:100)], anti-PTCH1 [Abcam/ab27529 (1:50) and Novus Biologicals/NBP1-47945 (1:25), which was better to reveal positive staining in fibroblast foci], anti-SMO [Abcam/ab72130 (1:100)], anti-GLI1 [RayBiotech/805-820 (1:100) and Abcam/ab49314 (1:50), which allow a better observation of nuclear staining], anti-GLI2 [Abcam/ab26056 (1:700)]. Sections were incubated with a secondary biotinylated anti-immunoglobulin antibody followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA). 3-Amino-9-ethylcarbazol in acetate buffer containing 0.05% H₂O₂ was used as substrate. The primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative control slides (31).

Fibroblasts. Primary human IPF and normal lung fibroblasts were obtained as described (34). The CCD25-Lu normal fibroblast cell line, which is derived from a seven-yr-old child was obtained from ATCC (Rockville, MA). We performed a dose-response pilot experiment using SHH from 50 ng/ml to 2 μg/ml to evaluate several fibroblasts functions. We found that concentrations of 1.5 and 2.0 μg/ml gave significant and reproducible results, and, accordingly, the dose of 2 μg/ml was used for all fibroblasts experiments. This concentration has been widely used (7, 18, 21, 49).

Laser capture microdissection. Fibroblasts from IPF and cryptogenic organizing pneumonia (COP) lungs were obtained by laser capture microdissection (LCM). Two pooled samples from three IPF lungs and two COP were used. Tissue samples were incubated first in the aqueous protection-solution HOPE (DCS; Innovative, Berlin, Germany) for 24 h (0–4°C), then in a premixed ice-cold acetone solution (100 ml acetone and 100 μl HOPE II solution) for 2 h, and then dehydrated in acetone (0–4°C) for 2 h. Paraffin-embedded tissues were microdissected on an Arcturus: PixCell IIE Laser capture microdissection system (28, 50).

Real-time PCR. Total RNA was obtained from LCM samples using the PicoPure RNA Isolation kit (Arcturus). Total RNA from IPF tissues (*n* = 7) and from human lung fibroblasts (3 primary cell

cultures from control lungs, and 6 derived from IPF lungs) were extracted using the TRIzol™ reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). For tissue control, we used six commercial human normal lung RNAs (Ambion AM7968, Agilent 540019, Origene HT1009, Zyagen HR-601, BD 64092-1, and USBiological T5595–7343). RNA was reverse transcribed into cDNA, and real-time PCR was performed using an Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) with TaqMan probes labeled with FAM [Hs00970980_m1 for PTCH-1, Hs00164004_m1 for α1-type-I collagen, Hs00365052_m1 for fibronectin, Hs0109024_m1 for SMO, Hs00179843_m1 for SHH, Hs01110768_m1 for GLI 1, Hs01119974_m1 for GLI 2, and 18S rRNA (4352930E) as endogenous control]. PCR was performed in a 25-μl reaction volume containing 4 μl of cDNA and PCR Master Mix 20× (Applied Biosystems), and the PCR conditions were 2 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. A dynamic range was constructed for each PCR product on serial dilutions of copy number from 1 × 10¹⁰ to 1 × 10². All PCRs were performed in triplicate, and the results are expressed as the number of copies of the target gene normalized to 18S ribosomal RNA.

Western blot. Fibroblasts were stimulated with SHH (2 μg/ml) in serum-free DMEM for 48 h and lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml aprotinin). Protein concentration was quantified using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules CA). Aliquots containing 30 μg of protein mixed with Laemmli sample buffer were used for electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes blocked with 5% skim milk for 1 h and treated overnight at 4°C with monoclonal antibody anti-α-smooth muscle actin (SMA) (1:200, A2547; Sigma Aldrich, St. Louis, MO), and rabbit anti-β-tubulin (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse

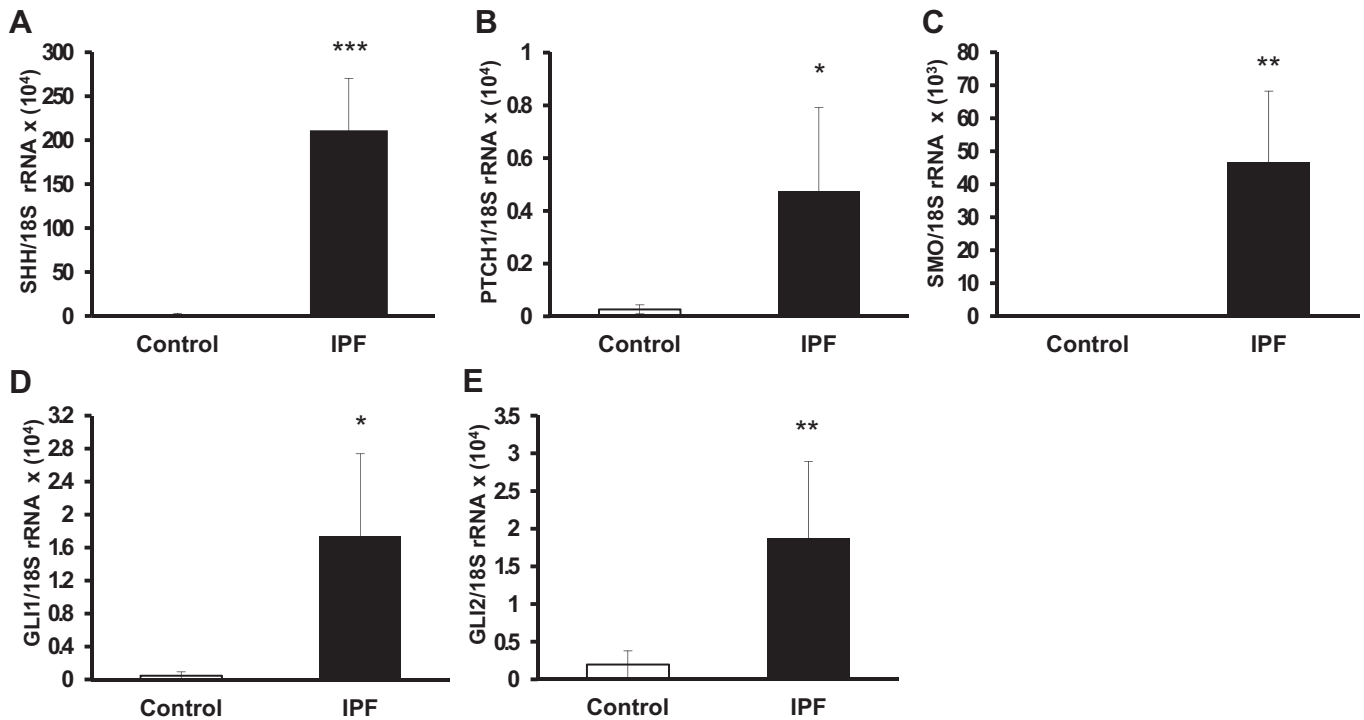


Fig. 1. Components of the Sonic signaling pathway are upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lungs. Gene expression of Sonic Hedgehog (SHH, A), Patched-1 (PTCH1, B), Smoothened (SMO, C), and transcription factors *glioma-associated oncogene homolog* (GLI)1 (D) and GLI2 (E) was quantified by real-time RT-PCR in total RNA obtained from IPF (*n* = 7) and human normal lungs (*n* = 6). Data are expressed as means ± SD of copy number normalized to 18S rRNA. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 compared with normal human lungs.

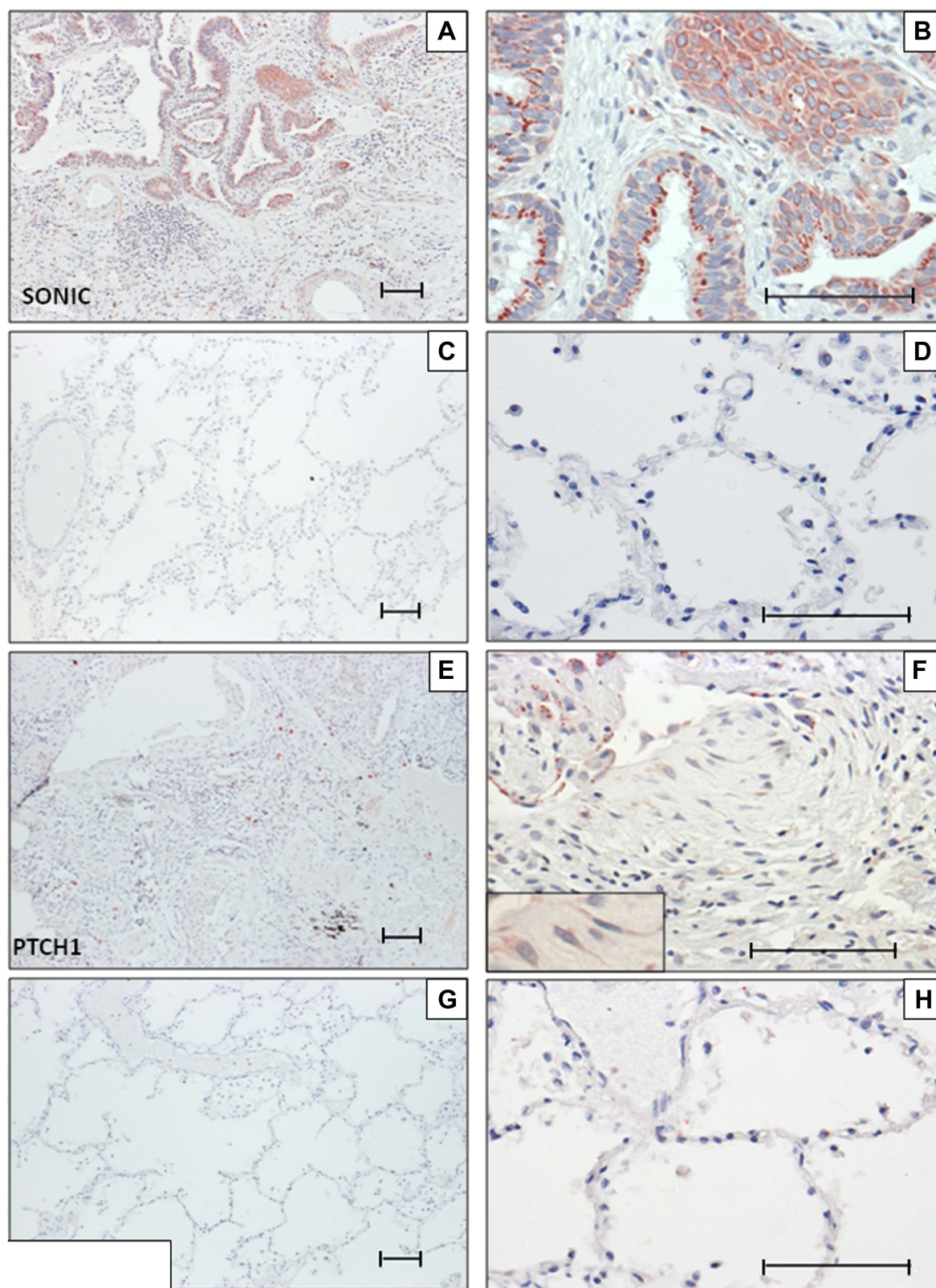


Fig. 2. Immunolocalization of Sonic Hedgehog and Patched1 in IPF and control lungs. Representative photomicrographs of immunohistochemical staining performed with antibodies against SHH (A and B), PTCH1 (E and F), in lung tissue sections from IPF patients. Strong staining was observed in IPF, whereas none of these components were detected in normal lungs, as exemplified in C, D, G, and H, respectively. The scale bars represent 100 μ m. All sections were counterstained with hematoxylin.

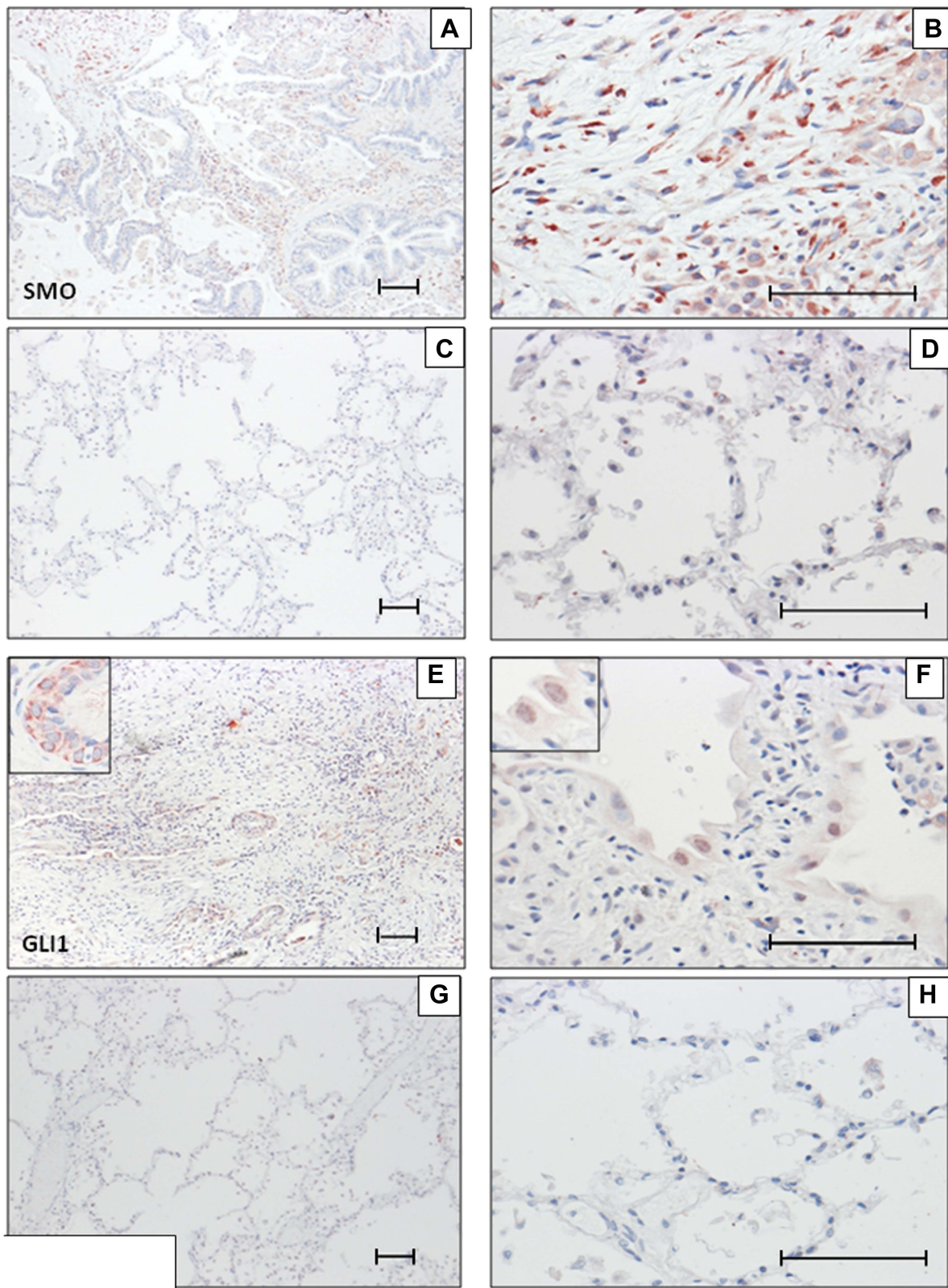


Fig. 3. Immunolocalization of Smoothened and the transcription factor GLI1 in IPF and control lungs. Representative photomicrographs of immunohistochemical staining performed with antibodies against Smoothened (A and B) and GLI1 (E and F) in lung tissue sections from patients with IPF. Expression of these components of the Sonic pathway was virtually absent in control lungs (C, D, G, and H, respectively). The scale bars represent 100 μ m. All sections were counterstained with hematoxylin.

IgG or anti-rabbit IgG antibodies (Invitrogen Life Technologies) for 1 h at room temperature and visualized on X-ray film with a Super Signal West Femto Enhanced Chemiluminescence detection system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Cell migration. Fibroblast migration was assayed using 24-well collagen-coated Boyden chambers (Chemicon, Temecula, CA) with 8- μ m pore size (31, 38). Fibroblasts (2×10^5 cells/well) resuspended in Ham's F-12 medium containing 5% BSA were added to the upper chamber. The lower chamber contained 0.5 ml of medium with 5% BSA alone or with 2 μ g/ml of recombinant human SHH (R&D

Systems, Minneapolis, MN). To evaluate whether the effect of SHH on lung fibroblasts was mediated by PDGF-BB, specific neutralizing anti-PDGF-B antibody (2 μ g/ml) was used in parallel experiments (R&D Systems). Isotype IgG was used as a control. After incubation for 8 h at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂-95% air), the nonmigrating cells remaining on top of the membrane were scraped and washed. The migrating cells were stained and the color eluted with 300 μ l of extraction buffer. Aliquots (150 μ l) were measured in an ELISA plate reader at 545 nm. All assays were performed in duplicate.

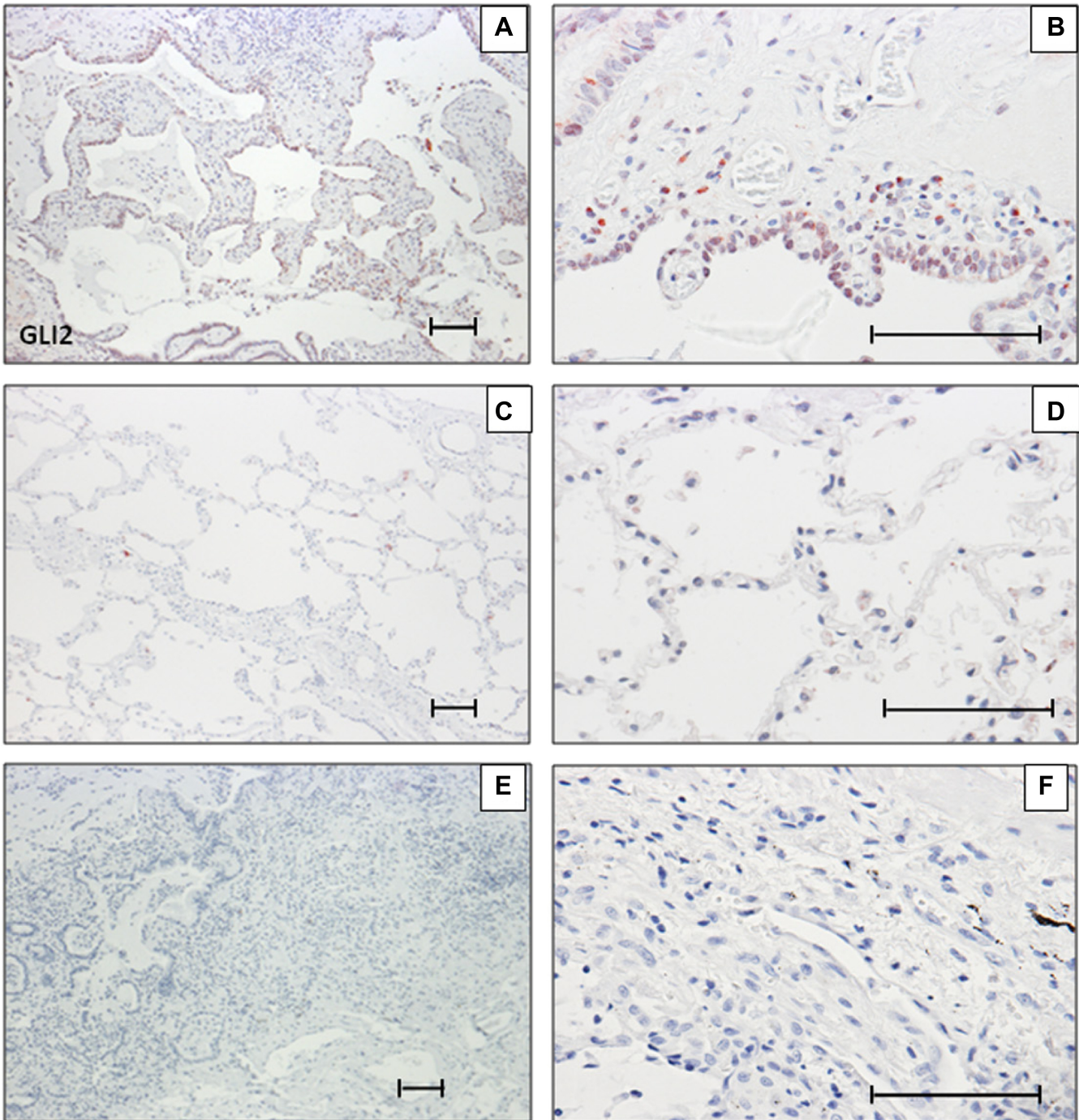


Fig. 4. Immunolocalization of the transcription factor GLI2 in IPF and control lungs. Representative photomicrographs of immunohistochemical staining performed with antibody against GLI2 (A and B) in lung tissue sections from patients with IPF. Expression of this transcription factor was virtually absent in control lungs (C and D). The scale bars represent 100 μ m. E and F: negative controls in which the primary antibody was replaced by nonimmune serum.

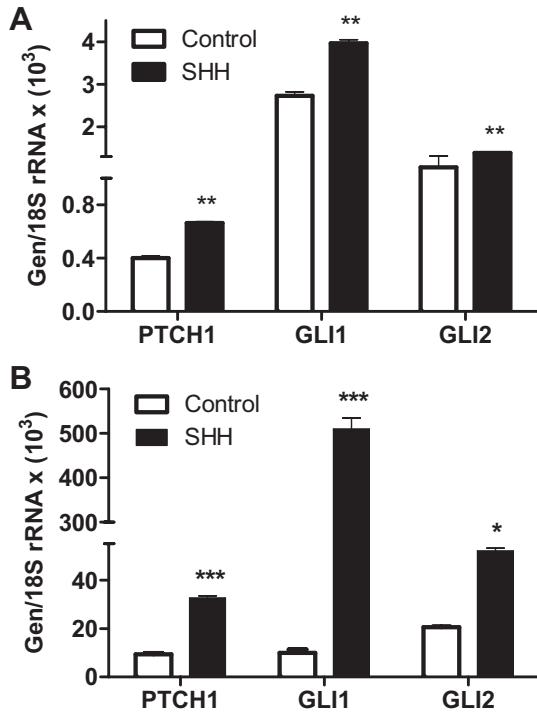


Fig. 5. Sonic hedgehog activates the canonical pathway. Normal (CCD25-Lu, A) and IPF fibroblasts (B) were stimulated with recombinant SHH, and the expression of PTCH1, GLI1, and GLI2 was examined by real-time PCR. Data are expressed as means \pm SD of copy number normalized to 18S rRNA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Growth rate assay. Lung fibroblasts were seeded in 96-well culture plates at a cell density of 10×10^3 and incubated in DMEM supplemented with 10% FBS at standard conditions. After 24 h, the medium was replaced by serum-free medium alone or with human recombinant SHH (2 μ g/ml), and the cells were maintained in culture for 48, 72, or 96 h. Cell growth was determined using the cell proliferation reagent WST-1 (Boehringer, Mannheim, Germany) as described (31). All assays were performed in triplicate. In a parallel experiment, the growth rate of the CCD25-Lu fibroblast cell line was analyzed after treatment with 5 μ M cyclopamine a specific inhibitor of SHH signaling.

Apoptosis assay. Apoptosis was induced by incubating the fibroblasts with TNF- α (20 ng/ml) and IFN- γ (50 ng/ml) for 48 h and then adding a FAS agonist (250 ng/ml) for additional 48 h (12). To evaluate the effect of SHH, fibroblasts were cultured after TNF- α /IFN- γ /FAS treatment with 2 μ g recombinant SHH for 48 h. Apoptosis was examined with the Annexin V-propidium iodide (PI) binding assay, followed by flow cytometry analysis (Annexin V-PE Apoptosis detection kit; BD Pharmingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. Cells were acquired in a FACSaria flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Annexin-positive/PI-negative (early apoptotic) cells and Annexin V-positive/PI-positive (apoptosed) cells were determined as percentages of the total cell population. Data were analyzed using FlowJo 7.8 software (Stanford University, Stanford, CA).

Human apoptosis antibody array. The expression profile of 35 apoptosis-related proteins was measured using a human apoptosis array kit (Proteome Profiler Array ARY009, R&D Systems) (35). The membrane containing immobilized antibodies against apoptosis-related proteins was blocked for 1 h on a rocking platform at room temperature and then incubated with lysates (400 μ g) of untreated fibroblasts or fibroblasts treated with TNF- α /IFN- γ /Fas, TNF- α /IFN- γ /Fas/SHH or SHH alone along with detection antibody cocktail overnight at 2–8°C. The membrane was incubated with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate followed by a chemiluminescent

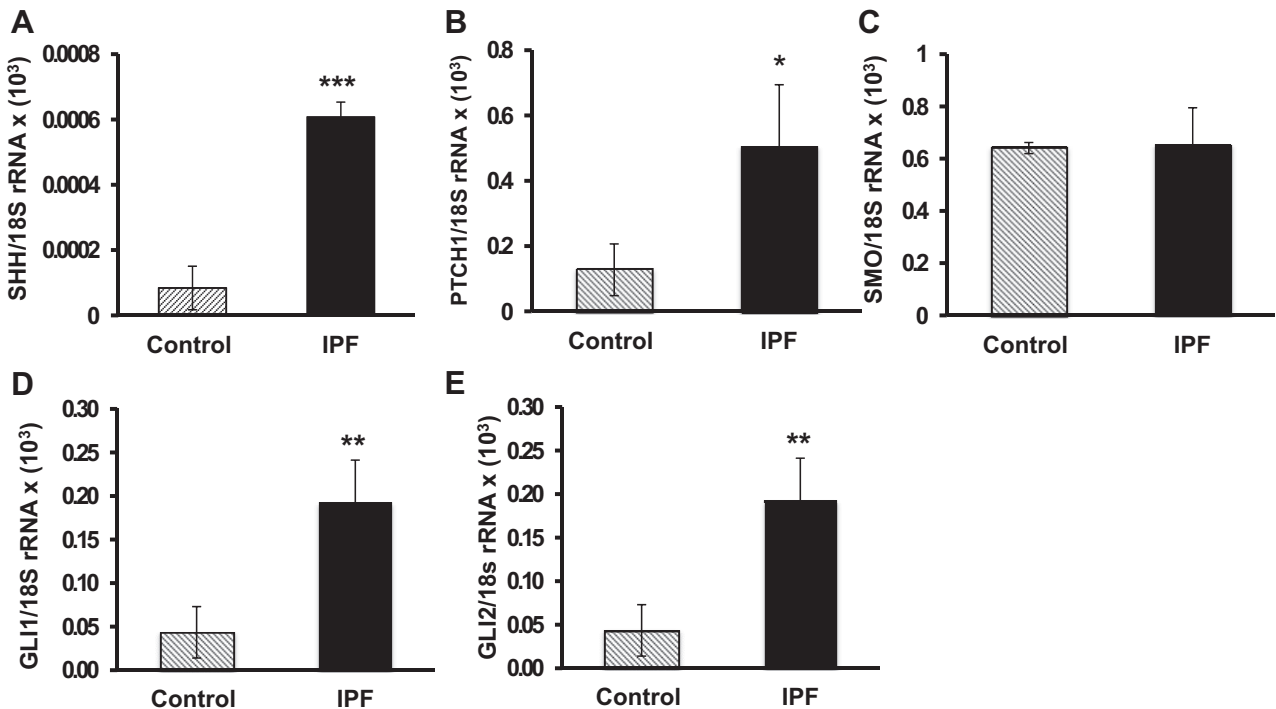


Fig. 6. SHH, PTCH1, and the transcription factors GLI1 and GLI2 are upregulated in IPF lung fibroblasts. Gene levels of SHH (A), PTCH1 (B), SMO (C), GLI1 (D), and GLI2 (E) were quantified by real-time RT-PCR in primary fibroblasts from normal and IPF lungs. Data are expressed as means \pm SD of copy number normalized to 18S rRNA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with normal human lung fibroblasts.

detection reagent. The membrane was scanned, and the resulting spots were visualized using chemiluminescence. Mean spot densities were quantified by densitometry. We expressed the data as fold change and arbitrarily considered as biologically important a change $\geq 20\%$.

Collagen measurement. Collagen was quantified in cell-conditioned medium using the Sircol collagen assay (Biocolor, Belfast, UK) as described (29).

Statistical analysis. Results are presented as means \pm SD. Differences were assessed by Tukey's test, Student's *t*-test, and Mann-Whitney *U*-test, and $P < 0.05$ was considered significant. Data were analyzed using GraphPad Prism version 5.03 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

IPF lungs overexpress the main components of the Sonic signaling pathway. The gene expression of SHH, its receptor PTCH1, the coreceptor SMO, and the transcription factors GLI-1 and -2 was quantified by RT-PCR in IPF ($n = 7$) and control lungs ($n = 6$). As illustrated in Fig. 1, all these genes were upregulated in IPF lungs compared with normal lungs. The highest expression was observed with Sonic.

Immunolocalization of SHH signaling pathway molecules. Immunohistochemical staining revealed that SHH, its receptor PTCH1, and the signaling molecules SMO, GLI1 and GLI2, were expressed in IPF lungs ($n = 7$) but not in normal lungs

($n = 3$; Figs. 2, 3, and 4), paralleling its low or absent gene expression. SHH was observed in bronchiolar and alveolar epithelial cells, in an apical distribution, and was occasionally noted in groups of basal/myoepithelial cells (Fig. 2, A and B). PTCH1 was expressed in fibroblasts and some interstitial inflammatory cells (Fig. 2, E and F), whereas strong immunostaining of the transmembrane coreceptor SMO was noted in interstitial inflammatory cells and mesenchymal cells forming fibroblast foci (Fig. 3, A and B). Transcription factor GLI1 was found in epithelial cells, fibroblasts, and inflammatory cells (cytoplasmic and nuclear localization) (Fig. 3, E and F), whereas GLI2 was observed in alveolar epithelial cells, predominantly in a nuclear distribution (Fig. 4, A and B).

Sonic hedgehog activates the canonical pathway in normal and IPF fibroblasts. To confirm that the canonical hedgehog pathway is activated in lung fibroblasts downstream SMO, fibroblasts from normal and IPF lungs were stimulated with recombinant SHH and PTCH1, and GLI1 and GLI2 were evaluated by real-time PCR. As illustrated in Fig. 5, SHH induced a significant increase of the expression of the receptor and both transcription factors, mainly in IPF fibroblasts.

IPF fibroblasts overexpress the main components of the Sonic signaling pathway. The gene expression of SHH, PTCH1, SMO, GLI1, and GLI2 was quantified by RT-PCR in

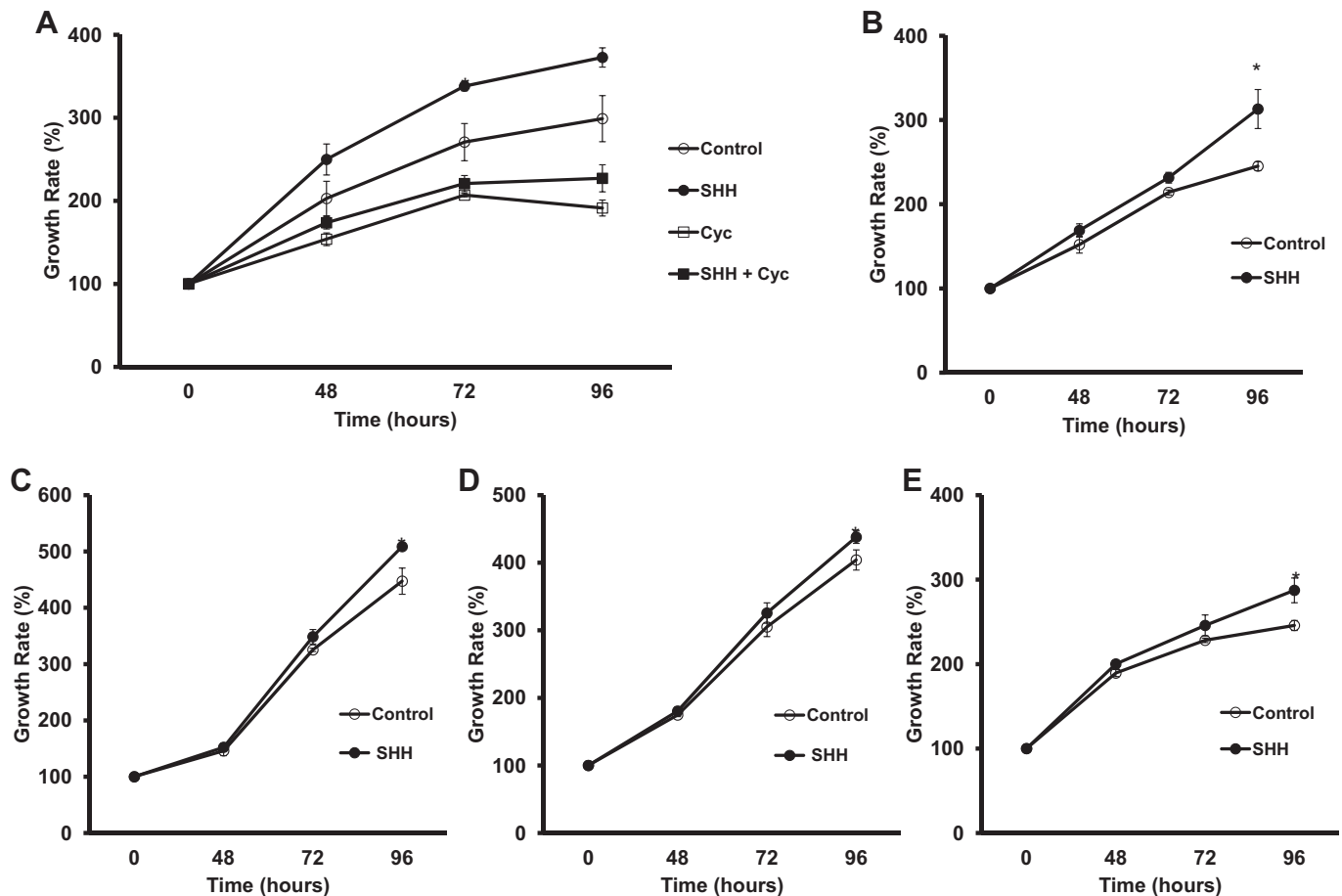


Fig. 7. SHH increases fibroblast growth rate. Human lung fibroblasts from normal (A) and IPF (B–E) lungs that were either untreated or stimulated with SHH (2 μ g/ml) were cultured in 96-well culture plates. Cell numbers were estimated by WST-1 assay at 2, 3, and 4 days of culture. Control and SHH-stimulated CCD25-Lu human normal lung fibroblasts were also treated with the specific SHH inhibitor, cyclopamine (A). Each point represents means \pm SD of 3 independent experiments performed in triplicate; * $P < 0.05$.

fibroblasts obtained from six IPF lungs and three normal human lungs, as well as in the normal fibroblast cell line CCD25-Lu. As shown in Fig. 6, with the exception of SMO, all SHH signaling pathway components were strongly upregulated in IPF fibroblasts. Interestingly, the fibroblast cell line CCD25-Lu consistently expressed higher amounts of the receptor PTCH1 compared with primary normal lung fibroblasts and was used for several functional experiments. We also examined the expression of PTCH1 by fibroblasts isolated from IPF fibroblastic foci and COP Masson bodies by laser capture microdissection and found threefold increased expression in IPF fibroblasts (not shown).

Sonic hedgehog increases fibroblast proliferation and collagen and fibronectin expression. Stimulation with SHH of either IPF fibroblasts or CCD25-Lu cell line (normal human lung fibroblasts that expresses the receptor PTCH1) induced increased proliferation. Using the WST-1 assay, differences

between SHH-treated and control cells became statistically significant at 72 h for the CCD25-Lu cells and at 96 h for the IPF primary cells (Fig. 7). To further corroborate the effect of SHH on fibroblast proliferation, we treated the cells with the specific inhibitor cyclopamine. Our results showed that cyclopamine abolished the effect of SHH. Interestingly, cyclopamine also inhibited the growth rate of control cells (Fig. 7A). Prior evidence suggests that increased proliferation induced by SHH is mediated by a decrease in cAMP levels, and we consequently analyzed the levels of cAMP in SHH-treated and untreated lung fibroblasts by ELISA. SHH lowered cAMP levels, but the decrease was nonsignificant (5.6 ± 1.1 vs. 6.9 ± 0.9 pm/mg protein; $P = 0.2$).

SHH also increased fibroblast collagen synthesis. As shown in Fig. 8A, α -1(I) collagen gene expression was significantly upregulated. Likewise, collagen protein in normal lung fibroblast (CCD25-Lu) culture supernatants increased from $2.5 \pm$

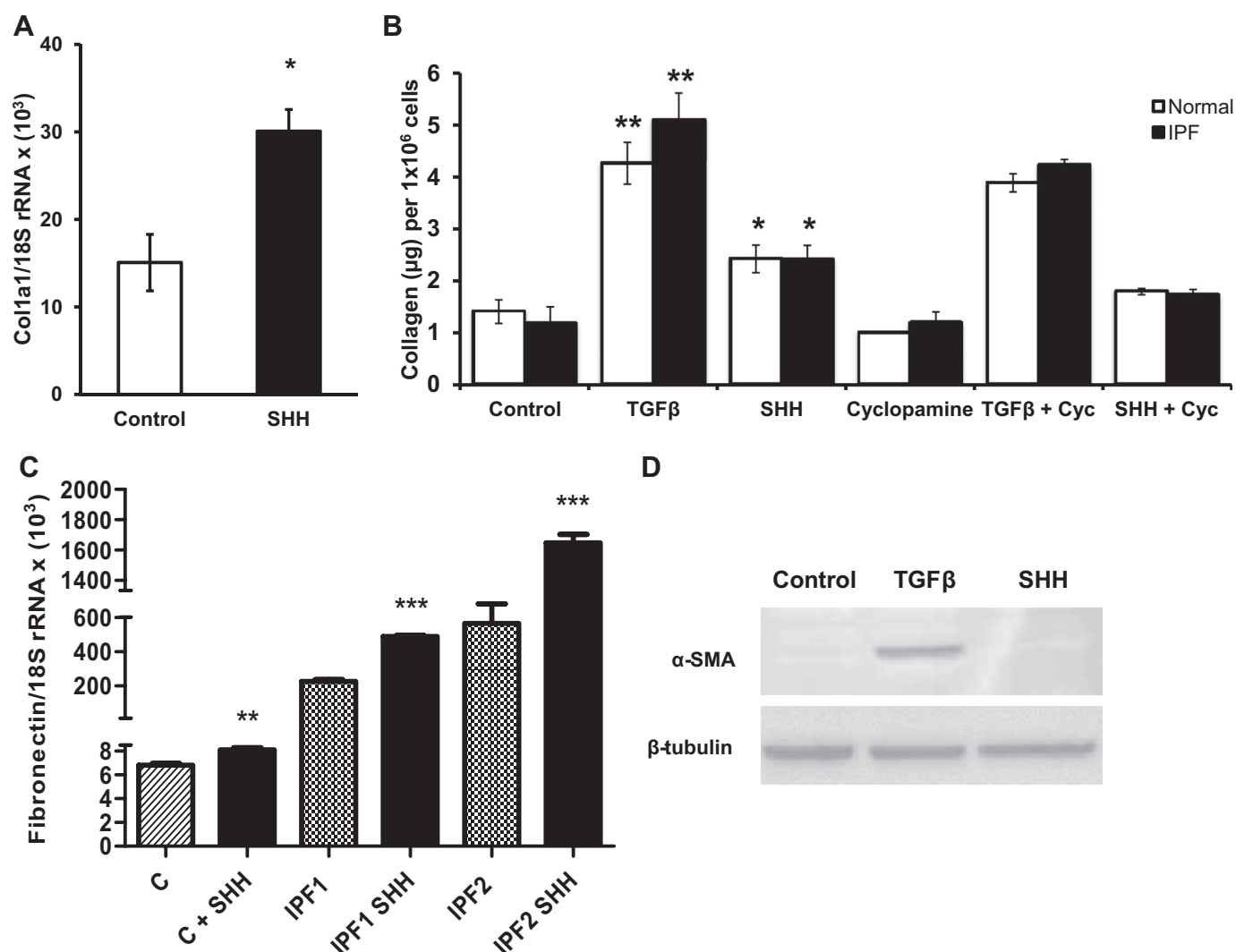


Fig. 8. SHH increases collagen and fibronectin expression without effect on α -smooth muscle actin (SMA). Human lung fibroblasts were stimulated with 2 μ g/ml of SHH, and collagen synthesis was determined by quantitative RT-PCR and Sircol assay. A: at 24 h, SHH significantly increased the level of α 1(I) collagen mRNA normalized to the level of 18S rRNA. B: at 48 h, SHH significantly enhanced the secretion of collagen protein in culture supernatants obtained from fibroblasts of 1 normal and 1 IPF lung; TGF- β was used as positive control (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). C: CCD25-Lu human normal lung fibroblasts and fibroblasts obtained from 2 IPF lungs were stimulated with 2 μ g/ml of SHH, and the expression of fibronectin at 6 h was analyzed by RT-PCR; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. D: normal human lung fibroblasts were incubated in the presence of SHH for 72 h, and then total protein was extracted and Western blot analysis performed with specific antibodies for α -SMA. TGF- β 1 was used as a positive control.

0.2 to 4.5 ± 1.0 μg collagen/ml upon SHH stimulation, as assessed by Sircol assay ($P < 0.05$). Because SHH also induced fibroblast proliferation, we examined whether the observed increase of collagen was caused by an increase in the number of cells, and in a parallel experiment we adjusted the collagen production to the number of fibroblasts. The results confirmed that SHH drives fibroblast synthesis of collagen on both IPF and normal lung fibroblasts although its effect was lower than of TGF- β (Fig. 8B). Cyclopamine partially inhibited this increase but has no effect on TGF- β -induced collagen production.

We also explored the effect of SHH on fibronectin expression. As shown in Fig. 8C, SHH stimulation induced a two- to threefold increase of fibronectin expression at 6 h in IPF fibroblasts, whereas a significant but smaller increase was detected in the normal cell line.

Because fibroblast differentiation to myofibroblasts plays an important role in the fibrogenic response, we explored whether SHH induces this process. As demonstrated in Fig. 8D, fibroblast treatment with SHH failed to increase their expression of α -SMA, a myofibroblasts marker, whereas TGF- β 1, a known inducer of this differentiation, strongly increased fibroblast α -SMA expression. Similar results were obtained with direct visualization of fibroblast α -SMA expression by immunofluorescence (not shown).

SHH protects fibroblasts from apoptosis. SHH reduced the basal (spontaneous) cell death in fibroblast cultures from $9.5 \pm 1.4\%$ to $5.3 \pm 0.8\%$, $P < 0.05$. We then examined the ability of SHH to decrease cell death induced by the proapoptotic combination of TNF- α /IFN- γ /FAS. TNF- α has been demonstrated to sensitize lung fibroblasts/myofibroblasts to apoptosis induced by Fas ligation, and IFN- γ has been demonstrated to augment this response (12). As illustrated in Fig. 9A, treatment with TNF- α /INF- γ /FAS increased fibroblast cell death (early apoptosis, as identified by cells being annexin V positive/PI negative) from $14.5 \pm 3.2\%$ to $37.3 \pm 7.2\%$ ($P < 0.0001$). SHH reduced the percentage of annexin-V positivity in TNF- α /INF- γ /FAS-treated fibroblasts down to basal levels ($P < 0.0001$). Apoptosed (annexin V-positive/PI-positive) cells were also in-

creased by treatment with TNF- α /INF- γ /FAS, and this increase was substantially reduced by SHH treatment ($36.2 \pm 17.2\%$ vs. $3.3 \pm 4.6\%$; $P < 0.0001$; Fig. 9B). Similar results were obtained when apoptosis was induced without FAS.

We then examined the effects of treating fibroblasts with SHH and/or TNF- α /INF- γ /FAS on known apoptotic/antiapoptotic signaling molecules using a human apoptosis antibody array. Compared with control fibroblasts, SHH decreased fibroblast levels of HIF-1 α , SMAC/DIABLO, and TNFR1 (Fig. 10A). TNF- α /INF- γ /FAS increased several proapoptotic markers, most noticeably cleaved caspase 3, and decreased antiapoptotic proteins or cytoprotective factors, such as cellular inhibitor of apoptosis (cIAP)-1, Bax, heme oxygenase 1, and CDNK1A (Table 1). SHH reduced these effects of TNF- α /INF- γ /FAS treatment, decreasing the expression of cleaved caspase 3, HIF-1 α , and p53 [phosphorylated at Ser(46)], and increasing the expression cIAP-1, cIAP-2, and X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) (10B).

SHH induces fibroblast migration. SHH caused a significant increase of fibroblast migration (2.0-fold over control), as measured in modified Boyden chamber assays shown in Fig. 11. This effect was slightly lower than to the that induced by PDGF-BB, a potent fibroblast chemoattractant. To determine whether SHH-induced migration was mediated by PDGF-BB, we added neutralizing antibody to this growth factor in our Boyden chamber assays. Neutralization of PDGF-BB significantly reduced SHH-induced fibroblast migration ($P < 0.05$), indicating that PDGF contributes to this migratory effect of SHH.

DISCUSSION

A growing body of evidence indicates that IPF is driven by aberrant epithelial-fibroblast communication, and recent reports support the hypothesis that this abnormal communication results at least in part from the reactivation of diverse developmental pathways (22, 41, 48). Analyses of our own published datasets (31, 40, 51) using analytical approaches allowing for global and unbiased mapping of functional genetic themes have revealed that IPF lungs are significantly enriched

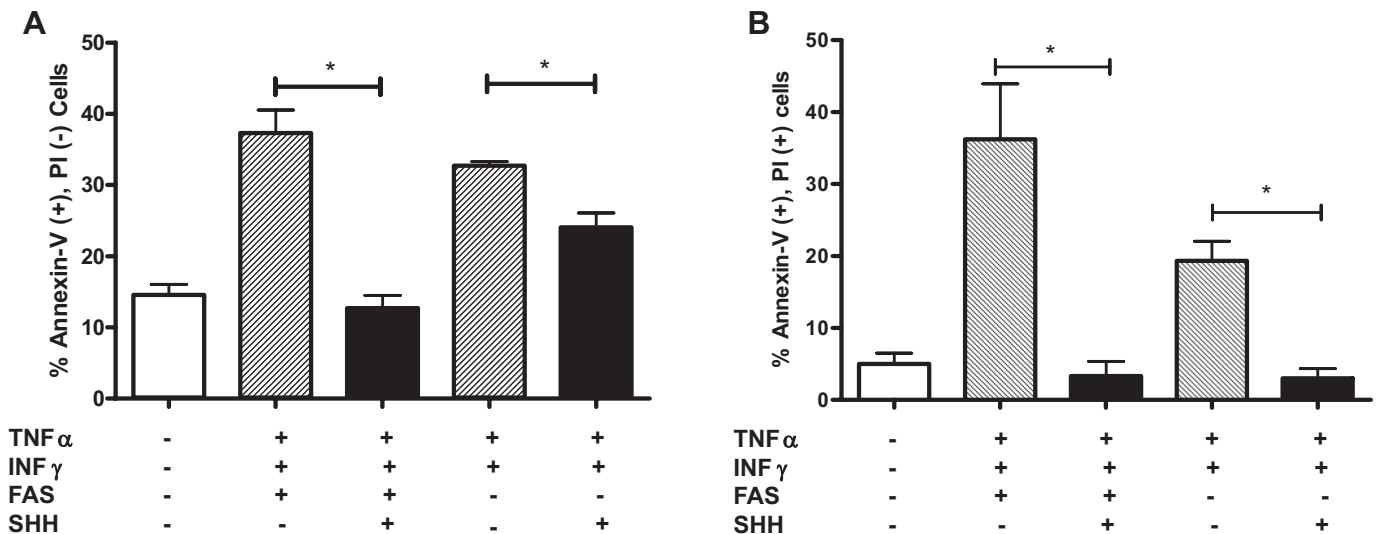


Fig. 9. SHH protects fibroblasts from apoptosis. Cell death was induced in human lung fibroblasts with TNF- α , IFN- γ , and Fas in the presence (A) or absence (B) of recombinant SHH (2 μg). Apoptosis was monitored after labeling with fluorescently-labeled annexin V and propidium iodide; $*P < 0.001$.

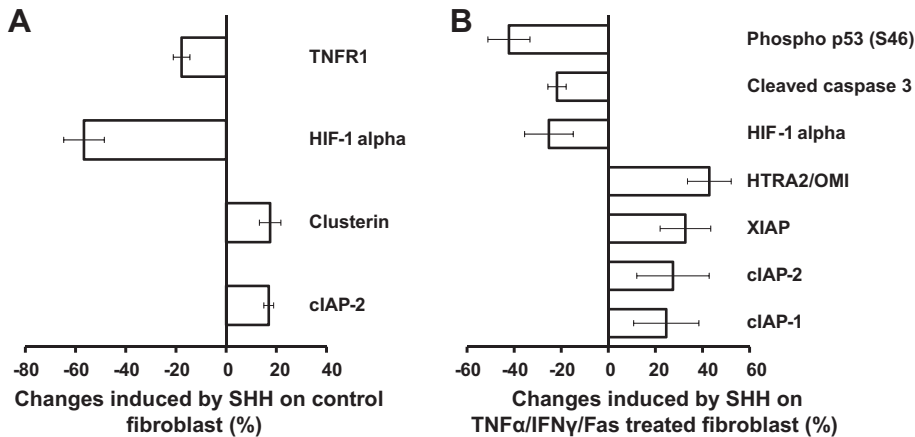


Fig. 10. Effect of SHH on proteins involved in apoptosis. The expression profile of 35 apoptosis-related proteins was measured using a human apoptosis array kit as described in MATERIALS AND METHODS. A: changes in apoptosis-related proteins induced by SHH compared with untreated control fibroblasts. B: changes in apoptosis-related proteins induced by SHH in fibroblasts treated with TNF/IFN-γ/Fas to provoke apoptosis. XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis; cIAP, cellular inhibitor of apoptosis.

with genes associated with lung development (41). These upregulated development-associated genes included the Sonic Hedgehog receptor PTCH1. Likewise, pathway analyses of the predicted targets of differentially expressed microRNAs in IPF lungs demonstrated enrichment of targets belonging to the SHH pathway as well (30).

Here, we first examined the gene expression of the main components of the SHH signaling pathway as well as their immunolocalization in the IPF lungs. Our results showed that this pathway is activated in IPF because all components examined, SHH, PTCH1, SMO, GLI1, and GLI2, were upregulated in the IPF lungs. SHH was observed mainly in the alveolar and bronchiolar epithelium, whereas its receptor PTCH1 was detected in mesenchymal cells in fibroblastic foci as well as in interstitial inflammatory cells. Previous studies have also found that SHH is expressed by lung epithelial cells, whereas the receptor has been additionally observed in macrophages and T-lymphocytes (6, 44). The functional effect of the PTCH1 expression in mononuclear cells is uncertain, but recent work indicates that SHH is a potent chemoattractant for monocytes (9). On the other hand, the role of SHH on T cell function is controversial. In peripheral T cells, the transcriptional changes induced by activation of this signaling pathway lead to reduced T cell activation (37). However, hedgehog pathway activation on lymphocytes may contribute to the local expansion of invariant NKT cell populations during certain types of fibrosing liver damage (45).

Table 1. Apoptotic/antiapoptotic signaling molecules changed after treatment of lung fibroblasts with TNF-α/INF-γ/FAS

Protein	Fold Change, %
Cleaved caspase 3	385.9
cIAP-1	-35.5
cIAP-2	66
TRAIL R2/DR5	-50.1
HO-1/HMOX1/HSP32	-48.9
HTRA2/OMI	-28.6
P21/CIP1/CDKN1A	-43.2
Phospho p53 (S15)	-27.4
Phospho p53 (S46)	-35.1
SMAC/DIABLO	-22
TNFR1	-36.9

cIAP, cellular inhibitor of apoptosis.

Interestingly, we also found the expression of the transcription factor GLI1 in both fibroblasts and inflammatory cells. By contrast, the SMO coreceptor was present mostly in fibroblastic foci, suggesting that the ligand of this pathway is produced by epithelial cells and signals through its receptor and coreceptor expressed by fibroblasts. However, a role of Sonic pathway in macrophage migration or lymphocyte functions cannot be ruled out. We also found robust overexpression of the SHH signaling pathway components in IPF fibroblasts compared with normal human lung fibroblasts. Moreover, fibroblasts obtained directly from fibroblastic foci through laser microdissection expressed significantly higher amounts of PTCH1 receptor compared with fibroblasts derived from Masson bodies of organizing pneumonia. SHH binding to PTCH1 abolishes SMO repression and causes signals to be delivered to the nucleus that activates the GLI transcription factors. Interestingly, whereas GLI1 was expressed by fibroblasts, GLI2 expression was localized to the epithelium, suggesting that SHH pathway signaling may also result in autocrine and/or paracrine activation of epithelial cells (Fig. 12).

To determine whether SHH affects the behavior of fibroblasts, we explored the effect of this pathway on IPF and

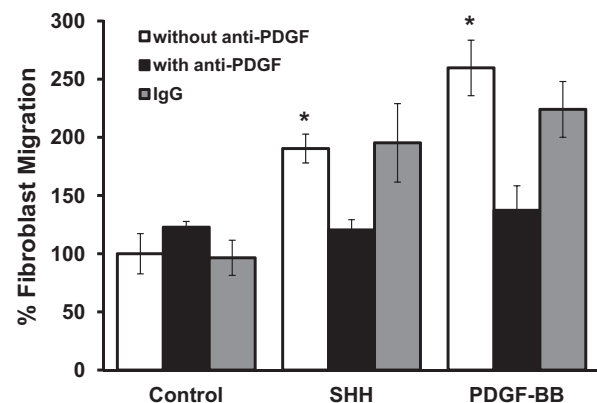
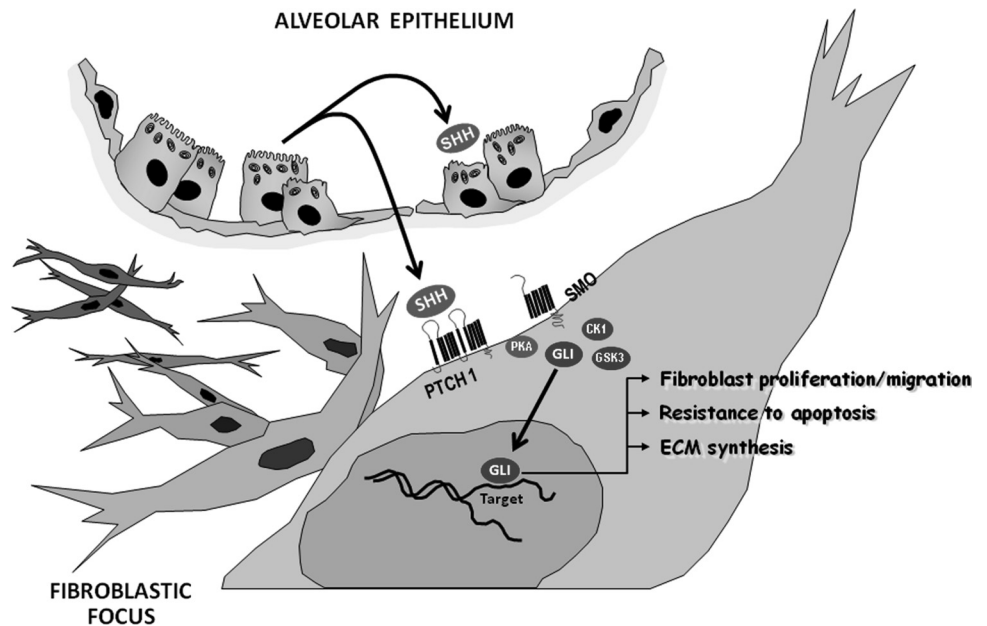


Fig. 11. SHH induces fibroblast migration. Normal human lung fibroblasts (CCD25-Lu) were seeded in the upper chamber of a Boyden chemotaxis chamber precoated with collagen. The lower chamber contained 0.5 ml of medium with 5% BSA alone or with 2 μg/ml of recombinant human SHH. The fibroblast chemoattractant PDGF-BB (10 ng/ml) was used as positive control. Isotype IgG used as control had no effect. SHH increased cell migration significantly, and this effect was partially blocked by a specific anti-PDGF-B antibody (**P* < 0.05).

Fig. 12. Schematic model for the role of SHH in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. SHH produced by aberrantly activated alveolar epithelial cells functions as paracrine molecule on fibroblasts and perhaps also on neighboring epithelial cells. On fibroblasts, SHH binds to PTCH1 receptor, relieving Smoothed from the inhibitory effects of the receptor. Then, the transcriptional factor GLI is released from the kinase complex [i.e., protein kinase A (PKA), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), casein kinase-1 (CK1)] to the cytoplasm, and migrates to the nucleus to bind specific target genes. SHH signaling on human lung fibroblasts induces an increase in fibroblast migration and proliferation and in the production of extracellular matrix (ECM) components such as collagen and fibronectin, as well as resistance to apoptosis.



normal human lung fibroblasts in several processes thought to be dysregulated in IPF, including migration, proliferation, apoptosis, collagen and fibronectin expression, and myofibroblast differentiation. Migration and proliferation are critical steps in wound healing, through which fibroblasts arrive and expand into injured sites. Excessive fibroblast migration and proliferation, in conjunction with subsequent exaggerated extracellular matrix synthesis, lead to fibrosis. We found evidence that the SHH may contribute to each of these processes. Our results indicate that SHH is a strong chemoattractant for lung fibroblasts, and the finding that PDGF-BB neutralization attenuates SHH-induced fibroblast migration suggests that the chemotactic activity of SHH is partially attributable to this growth factor. Interestingly, a recent study suggests that, at least in mouse embryonic fibroblasts, SHH activation of small GTPases required for cell migration (Rac1 and RhoA) and SHH-induced fibroblast migration may occur by noncanonical pathway, independent of the engagement of GLI (33).

Likewise, our findings showed that SHH increases the proliferation of fibroblasts derived from normal or IPF lungs and enhanced their collagen and fibronectin expression. Increased collagen production has been also recently reported in skin-derived fibroblasts from normal patients and patients with systemic sclerosis (16). Because cross-communication between SHH and TGF- β pathways has been previously described (10, 24, 27), we hypothesized that the effect of TGF- β on collagen production could be at least partially mediated by SHH. However, the use of the specific SHH inhibitor cyclopamine had no effect on the TGF- β -induced collagen synthesis by lung fibroblasts.

Accumulating evidence indicates that the persistence of fibroblasts/myofibroblasts in the fibroblastic foci, likely related to resistance to apoptosis, also plays a critical role in the pathogenesis of IPF. However, the mechanisms responsible for this putative resistance of IPF fibroblasts to cell death are unclear (20, 26). To evaluate the effects of the SHH pathway on this process in human lung fibroblasts, we induced cell death with TNF- α and IFN- γ plus FAS (12). We demonstrated

that SHH has a potent antiapoptotic effect on fibroblasts, indicating that this signaling pathway may be at least partially involved in their resistance to apoptosis. To identify components of the apoptotic machinery of fibroblasts that may be responsive to SHH signaling, we employed a human apoptosis antibody array to analyze semiquantitatively changes in critical apoptosis and checkpoint pathway proteins. Our results showed that the alterations in the finely tuned balance of proapoptotic and antiapoptotic signals that are induced by TNF- α /IFN- γ /FAS treatment are strongly counteracted by SHH. SHH increased fibroblast expression cIAP-1, cIAP-2, and XIAP, the most potent members of the IAP family, which suppress activation of the extrinsic cell death pathway induced by TNF- α signaling through TNF-R1 (8). XIAP inhibits apoptosis by binding and inactivating the initiator caspase-9 and effector caspases (19). A recent study indicates that regulation of XIAP expression by Hedgehog signaling is mediated by GLI2 because this transcription factor binds to the XIAP promoter and regulates its expression (23). Interestingly, SHH decreased the fibroblast expression of the multifunctional HIF-1 α , which appears to have a dual role in cell fate. HIF-1 α enhances cell survival in response to hypoxia but has been also associated with the induction of cell death in other settings (4, 5). On the other hand, it is known that hypoxia induces a hedgehog response mediated by HIF-1 α , but the effect of SHH on HIF-1 α expression is uncertain (3). Our results suggest that, under normoxic conditions, SHH decreases HIF-1 α expression by fibroblasts, although whether this occurs by direct effect on the gene expression or indirect effect on the stability of the mRNA or protein is presently unknown. Finally, differentiation of fibroblasts to myofibroblasts was explored in human lung fibroblasts from several sources by two different techniques, without noting effects of SHH.

In summary, our findings demonstrated that the SHH signaling pathway is upregulated in IPF lungs, likely contributing to the pathogenesis of this disease. Specifically, SHH may contribute to the expansion (as a mitogen and chemoattractant) and survival of the fibroblast population, as well as to extra-

cellular matrix production. These results suggest that targeting the Sonic hedgehog pathway may be a promising therapeutic strategy for this devastating disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biomedical Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM).

GRANTS

A. Lozano-Bolaños was supported by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM to obtain the PhD degree.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: A.L.B., C.M.M., J.C.L., R.R., M.C., L.B., J.G.-A., V.C., C.B., M.G., and A.P. performed experiments; A.L.B., C.M.M., J.C.L., R.R., M.C., L.B., V.C., C.B., M.G., A.P., and M.S. analyzed data; A.L.B., C.M.M., J.C.L., R.R., M.C., L.B., V.C., C.B., M.G., and A.P. interpreted results of experiments; A.L.B., C.M.M., L.B., C.B., M.G., and A.P. prepared figures; A.L.B., C.M.M., J.C.L., R.R., M.C., L.B., V.C., C.B., M.G., A.P., and M.S. approved final version of manuscript; M.S. conception and design of research; M.S. drafted manuscript; M.S. edited and revised manuscript.

REFERENCES

1. Beachy PA, Hymowitz SG, Lazarus RA, Leahy DJ, Siebold C. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev* 24: 2001–2012, 2010.
2. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BL. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 124: 53–63, 1997.
3. Bijlsma MF, Groot AP, Oduro JP, Franken RJ, Schoenmakers SH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Hypoxia induces a hedgehog response mediated by HIF-1alpha. *J Cell Mol Med* 13: 2053–2060, 2009.
4. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9082–9087, 2000.
5. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmanns K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485–490, 1998.
6. Coon DR, Roberts DJ, Loscertales M, Kradin R. Differential epithelial expression of SHH and FOXF1 in usual and nonspecific interstitial pneumonia. *Exp Mol Pathol* 80: 119–123, 2006.
7. Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113: 11–23, 2003.
8. Darding M, Meier P. IAPs: guardians of RIPK1. *Cell Death Differ* 19: 58–66, 2012.
9. Dunaeva M, Voo S, van Oosterhoud C, Waltenberger J. Sonic hedgehog is a potent chemoattractant for human monocytes: diabetes mellitus inhibits Sonic hedgehog-induced monocyte chemotaxis. *Basic Res Cardiol* 105: 61–71, 2010.
10. Fisher CE, Ahmad SA, Fitch PM, Lamb JR, Howie SE. FITC-induced murine pulmonary inflammation: CC10 up-regulation and concurrent Shh expression. *Cell Biol Int* 29: 868–876, 2005.
11. Fitch PM, Howie SE, Wallace WA. Oxidative damage and TGF-beta differentially induce lung epithelial cell sonic hedgehog and tenascin-C expression: implications for the regulation of lung remodelling in idiopathic interstitial lung disease. *Int J Exp Pathol* 92: 8–17, 2011.
12. Frankel SK, Cosgrove GP, Cha SI, Cool CD, Wynes MW, Edelman BL, Brown KK, Riches DW. TNF-alpha sensitizes normal and fibrotic human lung fibroblasts to Fas-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 293–304, 2006.
13. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345: 517–525, 2001.

14. Harris LG, Samant RS, Shevde LA. Hedgehog signaling: networking to nurture a promalignant tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 9: 1165–1174, 2011.
15. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 306–317, 2005.
16. Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, Dees C, Akhmetshina A, Tomcik M, Zerr P, Avouac J, Gzinska J, Zwerina J, Roudaut H, Traiffort E, Ruat M, Distler O, Schett G, Distler JH. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 64: 2724–2733, 2012.
17. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15: 3059–3087, 2001.
18. Jensen AM, Wallace VA. Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* 124: 363–371, 1997.
19. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ* 19: 42–50, 2012.
20. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378: 1949–1961, 2011.
21. Koleva M, Kappler R, Vogler M, Herwig A, Fulda S, Hahn H. Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. *Cell Mol Life Sci* 62: 1863–1870, 2005.
22. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Gunther A, Eickelberg O. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119: 772–787, 2009.
23. Kurita S, Mott JL, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Roberts LR, Fernandez-Zapico ME, Gores GJ. Hedgehog inhibition promotes a switch from Type II to Type I cell death receptor signaling in cancer cells. *PLoS One* 6: e18330, 2011.
24. Li M, Li C, Liu YH, Xing Y, Hu L, Borok Z, Kwong KY, Minoo P. Mesodermal deletion of transforming growth factor-beta receptor II disrupts lung epithelial morphogenesis: cross-talk between TGF-beta and Sonic hedgehog pathways. *J Biol Chem* 283: 36257–36264, 2008.
25. Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 20: 58–61, 1998.
26. Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, Nicholson AG, Laurent GJ, Tetley TD, Chambers RC, McAnulty RJ. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 73–82, 2010.
27. Maitah MY, Ali S, Ahmad A, Gadgeel S, Sarkar FH. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF-beta1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells. *PLoS One* 6: e16068, 2011.
28. Mikulowska-Mennis A, Taylor TB, Vishnu P, Michie SA, Raja R, Horner N, Kunitake ST. High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection. *Biotechniques* 33: 176–179, 2002.
29. Montes E, Ruiz V, Checa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J, Montano M, Ordonez-Razo R, Cisneros J, Garcia-de-Alba C, Pardo A, and Selman M. Renin is an angiotensin-independent profibrotic mediator: role in pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 39: 141–148, 2012.
30. Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* 157: 191–199, 2011.
31. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 2: e251, 2005.
32. Peppicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol* 8: 1083–1086, 1998.
33. Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR, Riobo NA. Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem* 286: 19589–19596, 2011.
34. Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 591–598, 2001.
35. Ray RB, Raychoudhuri A, Steele R, Nerurkar P. Bitter melon (Mormodica charantia) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. *Cancer Res* 70: 1925–1931, 2010.
36. Riobo NA, Manning DR. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J* 403: 369–379, 2007.

37. Rowbotham NJ, Hager-Theodorides AL, Furmanski AL, Crompton T. A novel role for Hedgehog in T-cell receptor signaling: implications for development and immunity. *Cell Cycle* 6: 2138–2142, 2007.
38. Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J, Gaxiola M, Perez-Padilla R, Navarro C, Richards T, Dauber J, King TE Jr, Pardo A, Kaminski N. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* 2: e482, 2007.
39. Selman M, King TE, Pardo A, American Thoracic Society, European Respiratory Society, American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136–151, 2001.
40. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 188–198, 2006.
41. Selman M, Pardo A, Kaminski N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* 5: e62, 2008.
42. Shannon JM, Hyatt BA. Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annu Rev Physiol* 66: 625–645, 2004.
43. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13: 2072–2086, 1999.
44. Stewart GA, Hoyne GF, Ahmad SA, Jarman E, Wallace WA, Harrison DJ, Haslett C, Lamb JR, Howie SE. Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *J Pathol* 199: 488–495, 2003.
45. Syn WK, Witek RP, Curbishley SM, Jung Y, Choi SS, Enrich B, Omenetti A, Agboola KM, Fearing CM, Tilg H, Adams DH, Diehl AM. Role for hedgehog pathway in regulating growth and function of invariant NKT cells. *Eur J Immunol* 39: 1879–1892, 2009.
46. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 14: 45–54, 2008.
47. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 22: 2454–2472, 2008.
48. Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, Feghali-Bostwick C, Kaminski N. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 583–589, 2009.
49. Wakelin SJ, Forsythe JL, Garden OJ, Howie SE. Commercially available recombinant sonic hedgehog up-regulates Ptc and modulates the cytokine and chemokine expression of human macrophages: an effect mediated by endotoxin contamination? *Immunobiology* 213: 25–38, 2008.
50. Witchell J, Varshney D, Gajjar T, Wangoo A, Goyal M. RNA isolation and quantitative PCR from HOPE- and formalin-fixed bovine lymph node tissues. *Pathol Res Pract* 204: 105–111, 2008.
51. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6292–6297, 2002.

