



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA DE IFN- $\gamma$   
EN PACIENTES CON NEUMONITIS POR  
HIPERSENSIBILIDAD Y FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MARÍA FERNANDA TOSCANO MÁRQUEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA**

**2014**



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.

## DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno  
Toscano  
Márquez  
María Fernanda  
5564150308  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
304715888
2. Datos del tutor  
Dr.  
José Guadalupe  
Cisneros  
Lira
3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
Lourdes María  
Barrera  
Ramírez
4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Jorge Antonio  
García  
Álvarez
5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Julia  
Pérez  
Ramos
6. Datos del sinodal 4  
M. en C.  
María de los Remedios Josefina  
Ramírez  
Rangel
7. Datos del trabajo escrito.  
Análisis de la metilación y expresión génica de IFN- $\gamma$  en pacientes con  
neumonitis por hipersensibilidad y fibrosis pulmonar idiopática.  
54p  
2014

## **AGRADECIMIENTOS**

Le dedico este trabajo al amor de mi vida, mi hija, quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para ella.

Le doy gracias a mis padres Rubén y Yolanda, porque detrás de este logro esta su apoyo incondicional, confianza y cariño. Por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación y alentarme a seguir adelante. Sobre todo por ser el mejor ejemplo a seguir.

A mi familia Daniel y Montse por creer en mí, por su comprensión, paciencia y por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación.

A mis hermanas Brenda y Lorena por ser parte importante en mi vida, que me han apoyado en las buenas y en las malas, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A mis amigos que me han apoyado en todo momento y todas aquellas personas que han sido importantes para mí durante todo este tiempo. A todos mis maestros que aportaron a mi formación.

Agradezco a la Dra. Lourdes por su esfuerzo, dedicación y el apoyo que me brindó en la elaboración de este proyecto.

A mi director de tesis el Dr. José Cisneros por haber confiado en mí, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y su apoyo me ayudó terminar con éxito este proyecto.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABLAS .....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
MARCO TEÓRICO .....	12
1. Enfermedades intersticiales difusas .....	12
1.1 Neumonitis por hipersensibilidad .....	12
1.2 Fibrosis pulmonar idiopática .....	14
2. Linfocitos, macrófagos y el perfil th1/th2 en EPID.....	15
2.1 Linfocitos .....	15
2.1.1 Linfocitos T citotóxicos (CD8+) .....	16
2.1.2 Linfocitos T cooperadores (CD4+).....	16
2.2 Macrófagos.....	17
3. EPIGENÉTICA .....	18
3.1 Modificación de histonas.....	19
3.1.1 Acetilación.....	19
3.1.2 Metilación .....	20
3.2 RNA's no codificantes.....	20
3.3 Metilación del DNA .....	21
3.3.1 Represión génica por metilación .....	22
3.3.2 Mantenimiento de la metilación .....	22
4. ANTECEDENTES .....	23
4.1 Patogénesis de la NH, la FPI y el balance Th1/Th2.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPOTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL .....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
1. Población de estudio.....	30
2. Células de lavado broncoalveolar (LBA).....	30
3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	30
4. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1.....	31
5. Extracción y Tratamiento de DNA.....	31
6. Evaluación de Metilación.....	32
7. Digestión de DNA con endonucleasa McrBc .....	32
8. Análisis estadístico .....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN .....	43
CONCLUSIONES .....	50
REFERENCIAS .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

5mC:	5-metilcitosina
acetil-CoA:	acetil coenzima A
CXCL9:	Ligando de la quimiocina 9
CXCL10:	Ligando de la quimiocina10
CCL17:	Ligando de la quimiocina 17
CCL22:	Ligando de la quimiocina 22
CCL24:	Ligando de la quimiocina 24
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DNMT:	DNA metiltransferasas
EPID:	Enfermedades pulmonares intersticiales difusas
FPI:	Fibrosis pulmonar idiopática
H2:	Histona 2
H3:	Histona 3
H4:	Histona 4
HAT:	Acetil-transferasa de histonas
HDAC:	Desacetilasa de histonas
HMT's:	metil-transferasas de histonas
IFN-γ:	Interferon gamma
IgE:	Inmuno globulina E
IL-2:	Interleucina 2
IL-4:	Interleucina 4
IL-5:	Interleucina 5
IL-10:	Interleucina 10
IL-12:	Interleucina 12
IL-13:	Interleucina 13
IL-18:	Interleucina 18
IL-23:	Interleucina 23
LBA:	Lavado broncoalveolar
M1:	Macrófagos activados por la vía clásica
M2:	Macrófagos activados por la vía alterna
μl:	Microlitros
ml:	Mililitros
ncRNA:	ácido ribonucleico no codificante

NH:	Neumonitis por hipersensibilidad
NK:	Células asesina natural
RNA:	Ácido ribonucleico
SAH:	S-adenosil-L-homocisteina
SAM:	S-adenosilmetionina
Th0:	Linfocitos T cooperadores vírgenes
Th1:	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th2:	Linfocitos T cooperadores tipo2
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformante beta
TNF $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg:	Células t reguladoras

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de los principales mecanismos epigenéticos .....	19
Figura 2: Modelos de inhibición génica por metilación del DNA .....	22
Figura 3: Mecanismos de mantenimiento de la metilación. ....	23
Figura 4: Conteo diferencial de macrófagos (A) y linfocitos (B) en LBA.....	35
Figura 5: Expresión de IFN- $\gamma$ en células de LBA.....	36
Figura 6: Expresión de IL-4 en células de LBA.....	38
Figura 7: Cuantificación relativa de la DNMT1. ....	39
Figura 8: Análisis de correlación de la expresión génica del IFN- $\gamma$ contra la expresión de DNMT1 .....	39
Figura 9: Análisis del estado de metilación .....	41
Figura 10: Amplificación del promotor de IFN $\gamma$ en DNA genómico.. ....	42

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de primers utilizados para la MS-PCR. ....	32
Tabla 2: Características clínicas de la población de estudio.....	34

## RESUMEN

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) y la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) son dos de las enfermedades pulmonares intersticiales más complejas. La FPI es una devastadora enfermedad pulmonar de etiología desconocida, crónica y letal que se caracteriza por desarrollo de un proceso fibrótico en ausencia de inflamación. Por su parte, la NH es una enfermedad provocada por una reacción inmunológica exagerada ante la inhalación de un antígeno, en la cual se puede observar una fase inflamatoria crónica que puede progresar a fibrosis pulmonar. Sin embargo, la patogénesis de ambas enfermedades, así como el papel de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4) en el desarrollo y progresión a fibrosis no es clara. En pulmón el IFN- $\gamma$  y la IL-4 son producidos principalmente por linfocitos T y macrófagos alveolares, en estas células se desconoce si la metilación del DNA desempeña un papel crítico en la polarización de la respuesta inmune. En el presente trabajo se cuantificó la expresión de IFN- $\gamma$  y de IL-4 por qPCR y se analizó el estado de metilación del promotor de IFN- $\gamma$  por MS-PCR en células de lavado broncoalveolar de pacientes con FPI y NH crónica y subaguda. Los resultados muestran que la expresión de IFN- $\gamma$  se encuentra significativamente disminuida en FPI y está aumentada en pacientes con NH, particularmente en los pacientes con NH subaguda. La expresión de IL-4 mostró una tendencia de incremento en NH crónica pero no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio. El análisis de MS-PCR mostró que la mayoría de las muestras de FPI tienen una mayor proporción del promotor de IFN- $\gamma$  metilado mientras que en pacientes con NH crónica, solo el 50% la presentan. Este resultado fue corroborado con un ensayo de digestión con la enzima McrBc. Los resultados de este trabajo sugieren que la baja expresión de IFN- $\gamma$  en células de lavado broncoalveolar de pacientes con FPI podría estar asociada a un incremento en la metilación del promotor. Sin embargo, es necesario realizar un estudio más amplio para establecer si la metilación del DNA es determinante para influir el establecimiento de una respuesta pro-inflamatoria o pro-fibrótica dada por la expresión de IFN- $\gamma$  ó IL-4.

## INTRODUCCIÓN

Los pulmones comprenden una barrera entre el cuerpo y el medio ambiente, presentando una barrera mínima entre el espacio aéreo alveolar y la microvasculatura pulmonar. Aunque esta configuración es ideal para el intercambio de gas, también aumenta la vulnerabilidad ante estímulos nocivos y patógenos. En patologías como las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), la inflamación crónica y los procesos fibroticos pueden resultar en una lesión pulmonar grave e irreversible, dañando la arquitectura del parénquima pulmonar e impidiendo el intercambio gaseoso.

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una de las EPID más común en nuestro país y la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es poco frecuente, aunque las dos son enfermedades muy complejas. La Neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad caracterizada por una respuesta inmune inflamatoria exagerada en las vías aéreas pequeñas y parénquima pulmonar ante partículas antigénicas inhaladas<sup>1</sup>. La patogénesis de la enfermedad es compleja y los mecanismos involucrados están poco descritos. Sin embargo, existe evidencia de que una respuesta tipo Th1, debida a la sobreproducción de IFN- $\gamma$  así como un aumento en la secreción de IL-12 e IL-18 por macrófagos de lavado broncoalveolar en la etapa aguda y sub-aguda, son procesos involucrados en la enfermedad. Así mismo, existen estudios que demuestran que en la etapa crónica de la enfermedad ocurre un cambio en el balance de citocinas a una respuesta Th2<sup>2</sup>.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial difusa, progresiva y letal cuyos mecanismos patogénicos aún no están bien esclarecidos<sup>3,4</sup>. Como parte de los mecanismos involucrados en el origen de la FPI se ha propuesto la hipótesis de un cambio en el perfil de citocinas, con una considerable disminución de IFN- $\gamma$  e IL-12, que suprimen las respuestas fibróticas, a un perfil de tipo Th2 con una secreción de IL-4 e IL-13, favoreciendo la activación de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular<sup>5-7</sup>.

La interacción entre las células del sistema inmune y los componentes no inmunes presentes en el tejido pulmonar en la NH y FPI aún no ha sido completamente aclarada. Cada vez más pruebas sugieren que el desequilibrio en el perfil de citocinas (Th1/Th2) juega un papel importante en el establecimiento y progresión de las EPID a fibrosis pulmonar. La comprensión de que las citocinas características del perfil Th1 y Th2 pueden

ser expresadas y reconocidas por diferentes tipos celulares y que las funciones de éstas son diferentes, sugiere que el desequilibrio en la expresión de estas citocinas puede ser importante en el desarrollo de respuestas inmunopatológicas<sup>6</sup>.

Por un lado IFN- $\gamma$  es un potente inductor de la respuesta pro-inflamatoria, participa en la activación y diferenciación de los linfocitos Th1, así como en el desarrollo y progresión de enfermedades pro-inflamatorias. Ejerce efectos anti-fibroticos al inhibir la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular y deposición de colágena por parte de los fibroblastos. Mientras que la IL-4 induce la diferenciación de células Th0 a las células Th2 activa la síntesis de colágena, promueve la progresión de fibrosis e inhibe la producción de citocinas inflamatorias<sup>6</sup>

Recientemente se ha estudiado si los procesos epigenéticos como las modificaciones post-traduccionales de histonas, los patrones de metilación del DNA y la conformación de la cromatina contribuyen en la expresión o el silenciamiento de los distintos genes de citocinas<sup>8</sup>. En el presente estudio se desea evaluar el papel que tiene la metilación del DNA en la expresión del IFN- $\gamma$  en ambas enfermedades. La metilación del DNA es uno de los procesos epigenéticos más estudiados la cual involucra una modificación covalente a través de la incorporación de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina, la cual es llevada a cabo por una DNA metil-transferasa. Esta modificación ocurre principalmente en citocinas que se encuentran en los dinucleótidos CpG's localizados en las regiones promotoras del gen<sup>8</sup>. Se ha observado que el patrón de distribución de los CpG's en el promotor del IFN- $\gamma$  es diferente en linfocitos T vírgenes respecto a las células que ya se han diferenciado hacia un perfil Th1 o Th2. Este patrón diferencial sugiere que existe un reclutamiento de la enzima encargada de remover la metilación en el DNA que acompaña a la expresión del IFN- $\gamma$ . Así mismo, existen evidencias de que la DNA metiltransferasa (DNMT) se recluta a la región promotora del IFN- $\gamma$  durante la diferenciación Th2<sup>9,10</sup>.

El lavado broncoalveolar es una herramienta comúnmente utilizada para el diagnóstico de la FPI y la NH y las células que de ahí son recuperadas han sido utilizadas en diferentes estudios para incrementar el conocimiento de los posibles mecanismos involucrados en la patogénesis de estas enfermedades. Sin embargo, los estudios encaminados al estudio de la participación de los procesos epigenéticos en la regulación de un fenotipo Th1 o Th2 en células de lavado broncoalveolar son escasos o nulos. El presente trabajo es una primera aproximación para evaluar el papel de la metilación en células de LBA de

pacientes con NH y FPI y su probable participación en la expresión de citocinas que pueden influir en el establecimiento de una respuesta pro-inflamatoria o profibrótica.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Enfermedades intersticiales difusas

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos con manifestaciones clínicas, radiológicas y funcionales similares. Las EPID afectan principalmente el intersticio pulmonar y las vías aéreas pequeñas, alveolos y bronquiolos. A pesar de que representan un grupo de enfermedades con una prevalencia baja, se estima que constituyen cerca del 15% de las enfermedades respiratorias. Su etiología es variada y actualmente se conocen más de 150 agentes causales tanto orgánicos como inorgánicos. Las EPID se clasifican en tres grupos: 1) neumonías intersticiales idiopáticas o de causas desconocidas, 2) neumonías de causas conocidas, y 3) neumonías asociadas a otros procesos<sup>11</sup>.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), una devastadora enfermedad pulmonar de etiología desconocida y la neumonitis por hipersensibilidad (NH), una enfermedad provocada por la reacción inmunopatológica a antígenos inhalados, representan dos de las EPID más frecuentes y complejas. Es importante destacar que los pacientes con NH crónicas pueden evolucionar a fibrosis intersticial y en algunos casos pueden presentar un cuadro similar al de la fibrosis pulmonar idiopática con la presencia de un patrón reticular o aspecto del pulmón de panal de abejas; por lo que sin la historia clínica adecuada puede ser muy difícil de distinguir de la FPI y proporcionar el tratamiento adecuado<sup>12</sup>.

#### *1.1 Neumonitis por hipersensibilidad*

La neumonitis por hipersensibilidad, también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una de las EPID más frecuentes. Esta enfermedad causada por una respuesta inmune inflamatoria exagerada en las vías aéreas pequeñas y parénquima pulmonar ante partículas antigénicas inhaladas presentes en el ambiente. Se ha descrito una amplia variedad de antígenos pero los más comunes son partículas orgánicas como: hongos, bacterias, proteínas animales y de protozoos, así como compuestos químicos de bajo peso molecular los cuales funcionan como haptenos que se unen a la albumina para crear una partícula antigénica<sup>2,13,14</sup>.

La neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad con síntomas de disnea y tos, resultado de la inhalación de un antígeno al cual el paciente ha sido previamente

sensibilizado. Cormier la define como una respuesta inmune inapropiada ante un antígeno inhalado, ocasionando problemas para respirar por acumulación de linfocitos T activados infiltrados al intersticio pulmonar<sup>2,14</sup>.

El desarrollo y progresión de la enfermedad depende de varios factores como la cantidad de antígeno inhalado, la intensidad y frecuencia de exposición al antígeno, así como la respuesta inmune del hospedero. Otro factor importante es la susceptibilidad genética, con lo cual se explica porque una persona que se expone a un determinado antígeno desarrolla la enfermedad y otra permanece sana<sup>13</sup>.

Basándose en las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes, la neumonitis por hipersensibilidad se puede dividir en tres categorías que son aguda, subaguda y crónica. En la aguda, síntomas como escalofríos, fiebre, sudoración, dolor de cabeza y náuseas se presentan de 2 a 9 horas después de la exposición al antígeno. Estos síntomas duran pocas horas y se pueden acompañar de síntomas respiratorios como tos y disnea. La NH subaguda se caracteriza por la presencia de tos y disnea que puede llegar a ser severa, se presenta gradualmente en días o semanas después de la exposición. La NH crónica cursa con periodos de tos y disnea que pueden durar meses y se acompaña de fatiga y pérdida de peso<sup>15</sup>.

La NH aguda y la sub-aguda se caracterizan por presentar un proceso inflamatorio con presencia de infiltrados linfocitarios intersticiales con formación de granulomas y en lavado broncoalveolar (LBA) se observa linfocitosis y macrófagos alveolares activados. Por su parte, la NH crónica es una entidad clínica caracterizada por una destrucción del parénquima pulmonar y desarrollo de fibrosis pulmonar progresiva, como resultado de una respuesta inflamatoria de causa inmunológica a diversos antígenos tras una sensibilización previa<sup>2,13</sup>.

La prevalencia de la NH es difícil de estimar ya que varía dentro de un mismo lugar, estas variaciones están influenciadas por características como son: el clima local, costumbres locales, condiciones geográficas y estación del año, además aunado a ello existe el problema que la NH representa una entidad con diferentes agentes causales. Es difícil determinar cuántas personas expuestas a agentes causales, desarrollan NH por la dificultad que encierra el diagnóstico, la mayoría de los expertos consideran que entre un

5 a 10% de las personas expuestas a niveles altos de agentes causales desarrollan la enfermedad, pero cuando la exposición es a concentraciones bajas, se desconoce la frecuencia. Además, la baja prevalencia e incidencia que se reporta puede ser un tanto artificial, porque a un gran número de individuos con NH leve o subclínica no se les detecta o se diagnostica mal. La falta de reconocimiento y comprensión limitada de los mecanismos de la enfermedad han contribuido al desarrollo de presentaciones crónicas o recurrentes donde los sujetos permanecen expuestos al antígeno causal durante periodos prolongados de tiempo, dando como resultado un daño pulmonar irreversible<sup>16</sup>.

### *1.2 Fibrosis pulmonar idiopática*

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad crónica y letal de etiología desconocida que afecta principalmente a adultos mayores entre los 50 y 70 años. La prevalencia de la enfermedad en la población es baja y oscila entre 14 a 43 por cada 100,000 habitantes. En la mayoría de los pacientes, la FPI tiene una progresión lenta y se estima que la supervivencia media es de dos a cinco años después de ser diagnosticada. Sin embargo, existe un grupo de pacientes en donde la enfermedad es de corta duración, con una progresión acelerada y los individuos mueren en los primeros 6 meses después del diagnóstico. Esta enfermedad afecta en mayor proporción a los hombres que a las mujeres, en relación de 1 a 1.5, no tiene ninguna relación con la raza o grupos étnicos y se estima que afecta a cinco millones de personas a nivel mundial. Las manifestaciones clínicas suelen caracterizarse por disnea de esfuerzo progresiva que en muchas ocasiones es acompañada por tos y reducción del volumen pulmonar con el subsecuente deterioro del intercambio gaseoso<sup>3,17</sup>.

La fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza por la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos que secretan cantidades excesivas de componentes de la matriz extracelular, principalmente colágenas, lo que resulta en la distorsión irreversible de la arquitectura del pulmón. Las lesiones fibrosantes en esta enfermedad ocurren preferentemente en el parénquima subpleural periférico. Las zonas fibróticas se presentan de forma alternada con áreas no afectadas; estas zonas varían en actividad y edad de la lesión. Una característica fundamental en esta enfermedad es la presencia de zonas con tejido cicatrizante con una alta proliferación de fibroblastos y miofibroblastos; éstas zonas con alta proliferación se denominan focos de fibroblastos y generalmente se encuentran subyacentes a un área de tejido epitelial dañado<sup>3</sup>.

Existen varias propuestas para explicar el origen de los focos de fibroblastos, algunas posibilidades incluyen la diferenciación de fibroblastos residentes, el reclutamiento de precursores de fibroblastos por torrente sanguíneo y la transición epitelio-mesénquima. En modelos experimentales se ha observado que células derivadas de médula ósea con fenotipo fibroblástico migran al pulmón de animales que sufren de daño epitelial<sup>18</sup>.

En el desarrollo de la fibrosis pulmonar están implicadas muchas citocinas, como la IL-1, TNF $\alpha$  y especialmente, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). El TGF- $\beta$  juega un papel esencial en la fisiopatología de la FPI; es una citocina pleiotropica que se expresa de manera natural en varios tipos celulares. TGF- $\beta$  participa activamente en el desarrollo y homeostasis de los tejidos, regula procesos celulares como la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis de células. Adicionalmente, induce la quimiotaxis de células inflamatorias y es regulador en los procesos de reparación tisular<sup>19</sup>.

En la FPI hay un aumento en la concentración del TGF $\beta$ 1 el cual tiene una actividad profibrogénica la cual estimula la proliferación de fibroblastos, promueve la transformación a miofibroblastos, participa en la transición epitelio-mesénquima, promueve la acumulación de matriz extracelular al estimular la síntesis y acumulación de proteínas que forman la matriz extracelular, como fibronectina y diferentes tipos de colágena y evita la degradación de la matriz extracelular mediante la producción de inhibidores de proteasas. El resultado final es la acumulación excesiva de matriz extracelular con una destrucción de unidades alveolocapilares y la formación de espacios fibróticos, lo cual lleva a la destrucción de la arquitectura del parénquima pulmonar<sup>19</sup>.

## **2. Linfocitos, macrófagos y el perfil th1/th2 en EPID**

### *2.1 Linfocitos*

Los pulmones se encuentran expuestos a una gran cantidad de microorganismos y sustancias tóxicas que fácilmente pueden acceder al torrente sanguíneo a través de la membrana alveolo-capilar. Los mecanismos inmunológicos del pulmón son proporcionados por diferentes tipos de células inmunocompetentes, entre éstos, algunos de los más importantes son los linfocitos y macrófagos alveolares.

Los linfocitos T son mediadores de la respuesta inmune adaptativa, se originan en médula ósea y migran al timo donde maduran y dan origen a las células T “vírgenes”, las cuales migran a órganos linfoides secundarios donde se lleva a cabo la presentación de antígeno por parte de las células dendríticas, al entrar en contacto con un antígeno se da la activación y diferenciación a linfocitos<sup>20</sup>.

### *2.1.1 Linfocitos T citotóxicos (CD8+)*

Los linfocitos CD8+ participan en el respuesta inmune mediada por células, eliminan patógenos intracelulares y atacan tumores. Las células T efectoras CD8+ son fundamentales y su función se distingue por la citotoxicidad específica. Producen proteínas citotóxicas, que incluyen la perforina y granzimas para inducir apoptosis celular. Además de citólisis, los linfocitos CD8 producen IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$  para activar macrófagos y estimular la respuesta inflamatoria<sup>20,21</sup>.

### *2.1.2 Linfocitos T cooperadores (CD4+)*

Los linfocitos CD4+ participan en la respuesta inmune humoral y celular; partiendo de un linfocito T cooperador virgen (Th0) y de acuerdo al tipo de función que va a efectuar y a las citocinas que puede secretar, se pueden dividir en células Th1/Th2. Las células Th1 se especializan en la activación de macrófagos mediante la secreción de IFN- $\gamma$  potenciando su acción microbicida y la estimulación de otras células contacto-dependiente a través de ligandos que poseen en la superficie celular. Adicionalmente, las citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$ ) promueven la diferenciación de los linfocitos citotóxicos y la activación de neutrófilos y células NK (natural killers). Algunas de las citocinas que secretan a menudo tienen actividad pro-inflamatoria, por lo que las respuestas Th1 pueden contribuir a la lesión tisular. Por otra parte, las células Th1 pueden responder a antígenos propios y causar patologías autoinmunes<sup>20,21</sup>.

Las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, y se especializan en facilitar la respuesta de las células B y estimular la producción de anticuerpos. Conducen la proliferación de células B mediante la IL-4. Además la IL-4 e IL-5 permiten la producción de IgE, la diferenciación, activación e inflamación por parte de los eosinófilos. La secreción de IL-4 e

IL-13 desempeñan un papel importante en la activación alternativa de los macrófagos, actuando como antagonista del IFN- $\gamma$ . Adicionalmente las células Th2 producen IL-10 que suprime la actividad de los macrófagos y TGF- $\beta$  que inhibe la activación de los linfocitos. Por lo tanto las citocinas Th2 pueden inhibir la inflamación aguda y crónica, para limitar el daño potencial por respuestas Th1 persistentes<sup>21</sup>.

La diferenciación de linfocitos en Th1 o Th2 se regula a través de diferentes factores y en particular por las citocinas presentes en el medio. La presencia de IL-12 promueve la transformación a células Th1, mientras que la IL-4 a células Th2. Sin embargo, también se sabe que la secreción de IFN- $\gamma$  inhibe selectivamente la actividad de Th2 mientras que linfocitos Th2 inhiben la proliferación de Th1 mediante la secreción de IL-10 y IL-4<sup>22</sup>.

## 2.2 Macrófagos

Los macrófagos son probablemente las células con mayor plasticidad entre las células de origen hematopoyético. En los tejidos, los macrófagos pueden adquirir propiedades morfológicas y funcionales únicas y distintas. Desempeñan un papel central en la homeostasis, remodelación de tejidos, defensa del hospedero y en la respuesta ante partículas extrañas, fagocitan células apoptóticas y patógenos, pero también contribuyen a la patogénesis de enfermedades inflamatorias y degenerativas<sup>23</sup>.

La activación de los macrófagos en dos subpoblaciones funcionalmente diferentes, M1 (clásica) o M2 (alternativa), se debe entre otras cosas a las citocinas presentes en el medio. La activación M1 es inducida por IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y estímulos microbianos, mientras que la activación M2 es inducida por IL-4 e IL-13, IL-33; que reflejan la polarización Th1 o Th2 respectivamente. Los macrófagos M1 se caracterizan por su capacidad para liberar grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-23 y TNF). Forman parte de una respuesta Th1 y median la resistencia a los patógenos intracelulares y los tumores. A través de su expresión de citocinas y quimiocinas, como IL-12, CXCL9 y CXCL10, favorecen la polarización y el reclutamiento de las células Th1, de este modo amplifican la respuesta tipo Th1<sup>23,24</sup>.

Por otro lado los macrófagos M2 tienen una alta expresión de IL-10, expresan un conjunto distinto de quimiocinas, CCL17, CCL22 y CCL24, los receptores de dichas citocinas están presentes en las células Treg, Th2, eosinófilos y basófilos. Por lo tanto, la

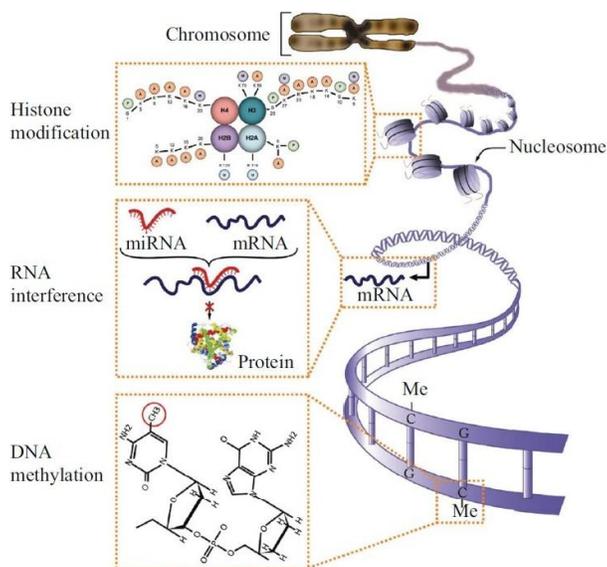
liberación de estas quimiocinas da como resultado el reclutamiento de estas células y la amplificación de la respuesta Th2. En general, las células M2 participan en las respuestas polarizadas Th2, atenúan procesos inflamatorios, promueven la remodelación de tejidos, angiogénesis, la progresión tumoral<sup>23,25</sup>.

El estudio de las EPID resulta difícil debido a la complejidad y heterogeneidad de los mecanismo patogénicos. Los patrones de citocinas Th1 y Th2 son considerados como factores determinantes de la progresión o no de las EPID hacia la fibrosis, debido a que desequilibrios en la expresión de estos dos perfiles de citocinas resulta en respuestas inmunopatológicas diferentes. Por un lado pueden inducir la activación y proliferación de fibroblastos, así como el depósito de matriz extracelular o ejercer el efecto contrario induciendo una actividad reguladora y antifibrótica<sup>26</sup>.

### **3. EPIGENÉTICA**

La epigenética es el estudio de los cambios heredables que afectan la expresión génica, pero que no implican modificaciones en la secuencia de DNA. La información genética de un organismo es diferencialmente expresada en tiempo y espacio a través de mecanismos epigenéticos que modifican la conformación de la cromatina y consecuentemente la expresión de los genes. El establecimiento y mantenimiento de patrones heredables de expresión génica se basa en la arquitectura de la cromatina. Mecanismos como la metilación del DNA, modificaciones de histonas y RNA no codificantes, sirven como señales que son reconocidas por moléculas que modifican la estructura de la cromatina, dando lugar a cromatina transcripcionalmente activa o inactiva<sup>27</sup>.

En la cromatina activa el DNA se encuentra no metilado y hay acetilación de histonas, mientras que en la cromatina inactiva se presenta metilación del DNA y deacetilación de histonas que compactan la cromatina impidiendo la unión de los factores de transcripción y de la polimerasa (Figura 1)<sup>28</sup>. Aunque son varios los mecanismos epigenéticos que pueden regular la transcripción, los más estudiados incluyen: metilación del DNA, modificación de histonas y RNAs no codificantes (miRNA).



**Figura 1:** Esquema de los principales mecanismos epigenéticos: metilación del DNA, modificaciones de las histonas y silenciamiento génico mediado por RNA. La metilación del DNA es una modificación covalente de la citosina en un dinucleótido CpG. Modificaciones de histonas son modificaciones post-traduccionales de las colas N-terminales de las histonas (H3, H4, H2A y H2B). El más reciente mecanismo epigenético involucra RNAs no codificantes (Imagen tomada de Kim, G. H., *et.al.*, *Pulm. Circ.*, 2014).

### 3.1 Modificación de histonas.

La información genética se encuentra empaquetada en estructuras llamadas nucleosomas. El nucleosoma consiste en DNA genómico, aproximadamente 146 pares de bases, enrollado sobre un octámero de histonas, formado por un tetrámero de H3/H4 y dos dímeros de H2A y H2B, más una molécula de la histona H1 que participa en la formación de estructuras de orden superior. Aparte de organizar al DNA en el núcleo, los nucleosomas juegan un papel crítico en la regulación génica mediante el control de su accesibilidad y por lo tanto su actividad transcripcional. Las histonas pueden ser modificadas post-traduccionalmente en los extremos amino terminal, los mecanismos más estudiados son la acetilación y metilación de histonas<sup>29,30</sup>.

#### 3.1.1 Acetilación.

Se refiere a la adición de un grupo acetilo en el aminoácido lisina del extremo amino terminal de la histona. Esta modificación es catalizada por la acetil-transferasa de histonas (HAT), que utiliza como sustrato al acetil-CoA. Por otra parte la desacetilasa de histonas (HDAC) revierte la modificación retirando los grupos acetilo. La acetilación de lisinas en

las colas de las histonas H3 y H4 está asociada con la activación de la transcripción. La adición de grupos acetilo en las colas de las histonas neutraliza la carga positiva de la histona, con lo que la interacción DNA-histona dependiente de cargas se debilita permitiendo la relajación de la estructura de la cromatina y por lo tanto se facilita el acceso de la maquinaria de transcripción<sup>30</sup>.

### 3.1.2 *Metilación*

A diferencia de la acetilación, la metilación de histonas puede activar o inhibir la transcripción, dependiendo del lugar y el número de grupos metilo agregados donde se produce la modificación. La metilación de las histonas en los residuos de lisina y arginina, se lleva a cabo por las metil-transferasas de histonas (HMTs). Al igual que DNMTs, HMTs utilizan S-adenosilmetionina (SAM) para metilar los aminoácidos diana. La metilación no neutraliza la carga pero favorece el silenciamiento mediante el reclutamiento de proteínas reguladoras que se unen a histonas metiladas<sup>31</sup>. Sin embargo, existen otras modificaciones como fosforilación, ubiquitinación, poli-ADP-ribosilación y biotilación, todas estas modificaciones permiten reestructurar la cromatina a una forma transcripcionalmente activa o inactiva. Las modificaciones de histonas actúan en combinación para formar el código de histonas<sup>30</sup>.

### 3.2 *RNA's no codificantes*

El termino RNAs no codificantes (ncRNAs) se emplea para referirse a RNAs que se transcriben a partir del DNA, pero no se traducen en proteínas. Muchos son funcionales y están involucrados en el procesamiento y la regulación de otros RNA como RNAm, RNAt y RNAr. Los ncRNAs se clasifican en dos subgrupos: largos y cortos. Los ncRNA largos constituye una gran porción del transcriptoma en mamíferos; sin embargo, se desconocen las funciones biológicas que desempeñan. Se han estudiado pocos ncRNA largos, algunos de los cuales se ha visto que participan en la inactivación del cromosoma X, en la regulación de la expresión génica y que algunos tienen funciones similares a las de un enhancer. Por otro lado los ncRNA cortos son moléculas de RNA de aproximadamente 20pb, como los microRNAs y los RNAs de interferencia. Éstos participan en procesos como la regulación de genes para incrementar o disminuir su expresión, para inhibir la traducción de los RNAm, en la degradación del RNAm, uniéndose al RNAm por

complementariedad de bases, para guiar la metilación del DNA y silenciamiento génico por remodelación de la cromatina<sup>32</sup>.

### 3.3 *Metilación del DNA*

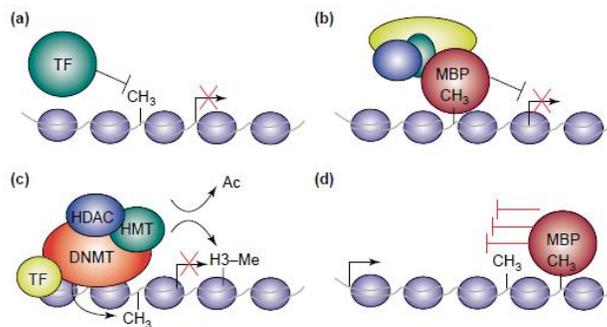
La metilación de DNA es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados, es un proceso heredable y reversible que se lleva a cabo durante la mitosis y meiosis. La metilación es una modificación covalente que consiste en la adición de un grupo metilo en el carbono 5 del anillo de pirimidina de la citosina (C), lo que da como resultado la formación de 5-metilcitosina (5mC). La formación de 5mC es llevada a cabo por las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT), las cuales transfieren el grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) al carbono 5 de la citosina, liberando S-adenosil-L-homocisteina (SAH).

La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del DNA, lo cual puede actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica, es decir que a mayor metilación menor expresión. Las 5mCs se encuentran distribuidas a lo largo de todo el genoma, principalmente en los dinucleótidos CpG, dando lugar a metilaciones simétricas en ambas cadenas del DNA<sup>33</sup>.

En las células somáticas humanas, cerca del 1% del total de las bases son citosinas metiladas, por lo que afecta del 70 al 80% de todos los dinucleótidos en el genoma. Una característica distintiva de los patrones de metilación del DNA en mamíferos es que ésta ocurre en regiones conocidas como "islas CpG", que son fragmentos de DNA de 0.5 a 5kb con una densidad alta de GC (>50%). En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción y en menor proporción dentro del cuerpo del gen. En el genoma humano aproximadamente el 60% de las islas CpG están asociadas con promotores y la metilación en estas regiones se asocian con el silenciamiento génico<sup>33,34</sup>.

### 3.3.1 Represión génica por metilación

La metilación del DNA puede regular de diferentes maneras la transcripción de los genes (figura 2): a) Bloquea directamente la unión de los factores de transcripción con su gen blanco. b) Inhibe indirectamente la actividad del promotor mediante la unión de proteínas de unión a sitios metilados (MBD Methyl Bindig Domain), que reconocen las citosinas metiladas y bloquean el acceso al promotor. c) Mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDAC) mediada por las DNMT. La Dnmt1 puede reclutar HDAC en su porción amino terminal, lo cual favorece la formación de cromatina compacta. d) La metilación en el cuerpo del gen (intrones y exones) puede dificultar la elongación de la transcripción, ya que reduce la accesibilidad de la RNA polimerasa II<sup>35</sup>.



**Figura 2:** Modelos de inhibición génica por metilación del DNA: a) modelo de interferencia: el factor de transcripción no puede unirse al promotor, b) las MDP se unen a las citosinas metiladas y bloquean el promotor; c) las DNMT reclutan HDAC y forman cromatina cerrada; d) la metilación en el cuerpo del gen interfiere con la RNA Pol II. (Imagen tomada de Klose & Bird, Trends in Biochemical Sciences, 2006).

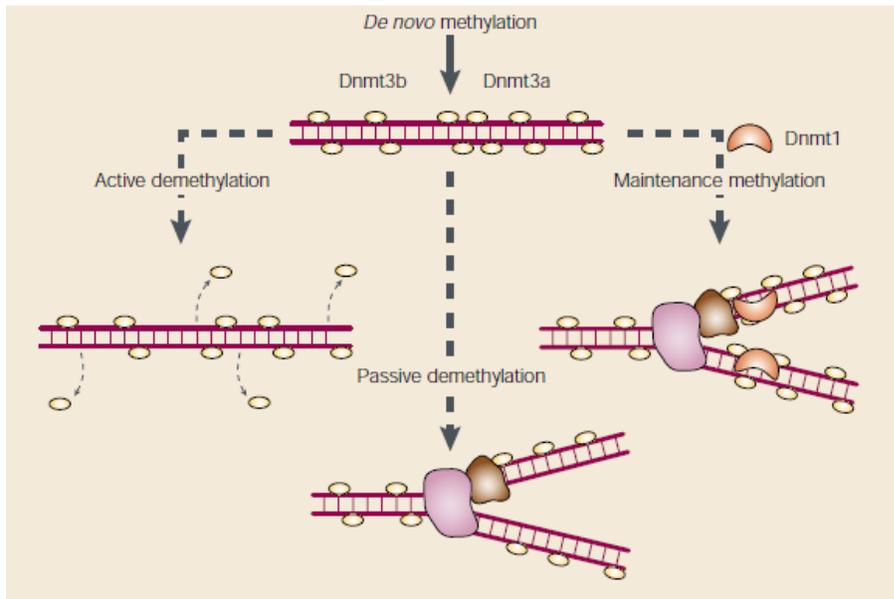
### 3.3.2 Mantenimiento de la metilación

La metilación del DNA es un proceso dinámico, las secuencias no metiladas pueden ser metiladas y los grupos metilo pueden perderse, el patrón de metilación en las células de un individuo no permanece constante a lo largo de la vida y los cambios se producen a través de mecanismos de metilación y desmetilación (figura 3):

- Metilación *de novo*: se lleva a cabo por las DNMT3a y DNMT3b y se refiere a la adición del grupo metilo en secuencias no metiladas, estableciendo así un nuevo patrón de metilación.
- Metilación de mantenimiento: se lleva a cabo por la DNMT1, la cual como su nombre lo indica, mantiene el patrón de metilación durante la replicación del DNA.

Cuando el DNA es replicado, el grupo metilo en la hebra molde es reconocido por la DNMT1 y coloca la marca de metilación en la hebra no metilada, con lo cual se logra mantener los patrones de metilación en las células hijas.

- La desmetilación puede ocurrir de forma pasiva, en ausencia de la DNMT1 y tras continuas rondas de la replicación la metilación se pierde. Mientras que la desmetilación activa se lleva a cabo sin que se replique el DNA y es llevada a cabo por las desmetilasas, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual remueven los grupos metilo<sup>33,36</sup>.



**Figura 3:** Mecanismos de mantenimiento de la metilación. La metilación del DNA en mamíferos se produce en citosinas de dinucleótidos CpG. El grupo metilo es agregado por la enzima de novo Dnmt3a y Dnmt3b. Cuando el DNA es replicado, el grupo metilo en hebra sintetizada es introducido por la Dnmt1. La desmetilación puede ocurrir en la ausencia de Dnmt1 (pasiva) o activa mediante las desmetilasas (Imagen tomada de Reik, W. & Walter, J., *Nat. Rev. Genet*, 2001).

#### 4. ANTECEDENTES

La diferenciación de los linfocitos T en las diferentes sub-poblaciones puede representar un ejemplo de cómo influyen los mecanismos epigenéticos en el fenotipo celular. La diferenciación hacia una de las opciones de linaje Th1 o Th2 requiere que en las células se transcriban conjuntos específicos de genes y la represión o silenciamiento de otros. Estos cambios en la expresión génica no están codificados por los cambios permanentes

en la información genética de la célula y en este caso la transcripción puede ser controlada por mecanismos epigenéticos, entre ellos la metilación del DNA.

El IFN- $\gamma$  es una citocina soluble producida por linfocitos T CD4+ y CD8+ activados y células NK (natural killer) en respuesta a diversos estímulos. Existe evidencias de que también las células B y las células presentadoras de antígeno son capaces de producirlo. El IFN- $\gamma$  es la citocina característica del perfil Th1, ejerce efectos antivirales, anti-proliferativos, inmunoreguladores, pro-inflamatorios y desempeña un papel importante en los mecanismos de defensa del sistema inmune. Induce la expresión de algunas proteínas y la represión de otras en otras líneas celulares y tiene influencia sobre el fenotipo y función de varias células *in vivo* e *in vitro*. En pulmón, IFN- $\gamma$  es producida principalmente por macrófagos alveolares y linfocitos T del intersticio pulmonar y se ha visto que inhibe la proliferación de fibroblastos pulmonares y reduce la producción de colágena<sup>37</sup>.

La IL-4 es una citocina producida principalmente por las células T CD4+, tiene una amplia gama de actividades biológicas en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, participa en la activación de las células B, en la diferenciación de células T CD4+ vírgenes hacia un fenotipo Th2 y en la quimiotaxis de eosinófilos y macrófagos. Además de estas propiedades la IL-4 tiene actividad anti-inflamatorias al inhibir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Está implicada en la patogénesis de la fibrosis debido a que puede regular diversas funciones de los fibroblastos incluyendo la quimiotaxis, proliferación, síntesis de colágeno y la diferenciación de miofibroblastos<sup>6</sup>.

En enfermedades pulmonares como la neumonitis por hipersensibilidad y la fibrosis pulmonar idiopática es común el uso del lavado broncoalveolar (LBA) como un procedimiento estándar para establecer el diagnóstico clínico de la enfermedad. El LBA es un procedimiento que permite analizar las células inmunes e inflamatorias del tracto respiratorio inferior del pulmón para evaluar los mecanismos patogénicos de las enfermedades respiratorias. En pacientes con neumonitis por hipersensibilidad en etapa sub-aguda las células recuperadas mediante LBA consisten en su mayor parte de linfocitos, alrededor del 60-70%, y el porcentaje de macrófagos puede oscilar entre 15-30%; mientras que en pacientes en etapa crónica el porcentaje de linfocitos y macrófagos es de alrededor de 40%<sup>38</sup>. Las células recuperadas en pacientes con FPI son en su mayoría macrófagos (80-95%) y un porcentaje de linfocitos menor al 15%<sup>39</sup>.

#### *4.1 Patogénesis de la NH, la FPI y el balance Th1/Th2.*

La patogénesis de la neumonitis por hipersensibilidad es compleja y muchos de los mecanismos involucrados están poco descritos. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que las diferentes poblaciones de linfocitos T juegan un papel importante en el desarrollo e influir en el curso clínico de la enfermedad. Varios estudios han indicado que la respuesta inmune tipo Th1 media el desarrollo de la NH tanto en modelos animales como en humanos. Sin embargo, un cambio en el perfil de Th1 a Th2 parece ser determinante en la progresión de la inflamación a la fibrosis. Estas observaciones sugieren que el IFN- $\gamma$  podría ser esencial en el mantenimiento del proceso inflamatorio en las etapas iniciales de la enfermedad con una participación significativa de la respuesta Th2 en la atenuación de la inflamación. Mientras que en las últimas etapas el predominio de citocinas Th2 contribuye a la inducción de factores pro-fibróticos<sup>13</sup>.

Existe evidencia que sugiere que la NH está asociada a una respuesta tipo Th1 ya que se ha reportado un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  por células T de LBA de pacientes con NH y un aumento en la expresión de IL-12 e IL-18 por macrófagos alveolares<sup>40</sup>. En modelos animales se ha reportado que citocinas tipo Th1, en particular el IFN- $\gamma$ , es necesario para el desarrollo de NH ya que solo los ratones que expresan esta citocina y que son expuestos a un antígeno desarrollan la enfermedad<sup>41</sup>.

A pesar de que la neumonitis por hipersensibilidad es comúnmente asociada a una respuesta tipo Th1, se ha visto que en la etapa crónica de la enfermedad y el desarrollo de fibrosis, el perfil característico es de tipo Th2 que se acompaña con una reducción significativa de las citocinas tipo Th1. Así mismo, se ha observado que las células de LBA muestran un fenotipo Th2 con un incremento de receptores de quimiocinas tipo Th2 y una disminución del receptor Th1<sup>42</sup>. En un modelo murino se demostró que la respuesta inmune tipo Th2 juega un papel importante para el desarrollo de fibrosis pulmonar en la etapa crónica de la enfermedad<sup>43</sup>.

En el caso de la FPI, durante mucho tiempo prevaleció la idea de que esta enfermedad era el resultado final de una inflamación crónica en respuesta a un estímulo antigénico.

Sin embargo, datos recientes sugieren que la inflamación no juega un papel importante en su desarrollo. Actualmente la propuesta más aceptada sugiere que la FPI se debe a una lesión del epitelio alveolar y a una reparación anormal de las lesiones en ausencia de inflamación<sup>44</sup>. En este concepto, la pérdida de células epiteliales y endoteliales, así como la proliferación y activación de fibroblastos y miofibroblastos, desempeñan un papel fundamental para que ocurra el depósito de matriz extracelular.

La interacción entre las células del sistema inmune y los componentes no inmunes presentes en el tejido pulmonar, así como el papel que el componente inmunológico desempeña dentro de la fisiopatología de la FPI aún no ha sido completamente aclarada. En este sentido, los modelos animales de fibrosis pulmonar han proporcionado evidencias de que las citocinas y quimiocinas son mediadores imprescindibles en la patogénesis de la fibrosis pulmonar<sup>45</sup>.

En la FPI existe una secreción predominante de factores pro-fibróticos, con una notable reducción de citocinas pro-inflamatorias, lo cual sugiere que este desbalance en la producción de citocinas podría estar contribuyendo a la fibrogénesis en la FPI. En varios estudios se ha observado una notable reducción en la expresión del IFN- $\gamma$ , lo cual apoya la hipótesis de que en la FPI prevalece una polarización tipo Th2<sup>26,46,47</sup>. En otro estudio se observó un aumento en la expresión de los receptores para IL-4 e IL-13 en fibroblastos provenientes de muestras de tejido pulmonar de pacientes con FPI<sup>48</sup>. Así mismo, utilizando análisis de microarreglos se ha demostrado que la firma genética distintiva de la FPI es la relativa falta de expresión de genes típicos asociados con la inflamación<sup>49</sup>.

## **JUSTIFICACIÓN**

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad crónica y mortal de causas desconocidas para la cual no existe una cura. Por su parte, la neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad que se origina en respuesta a la presencia de un antígeno. La inflamación es un componente esencial de la NH mientras que en la FPI no parece desempeñar un papel preponderante. Los estudios muestran que en la FPI puede existir una respuesta inmune predominantemente Th2 mientras que en la NH es Th1.

Aunque las células recuperadas de LBA se han utilizado para investigar diferentes mecanismos moleculares y celulares implicados en la patogénesis de la NH y la FPI, no hay trabajos hechos en células de LBA que se hayan enfocado al estudio de mecanismos epigenéticos en estas enfermedades y se desconoce si en estas células ocurren eventos de metilación que podrían modificar la expresión de moléculas como el IFN- $\gamma$  o IL-4 que pueden influir en el establecimiento de un respuesta pro-inflamatoria o profibrótica.

## **HIPOTESIS**

La expresión de IFN- $\gamma$  estará disminuida en células de lavado broncoalveolar de pacientes con FPI y esto puede ser debido a la presencia de metilación en su región promotora. Así mismo, en pacientes con FPI habrá una mayor expresión de IL-4.

En NH, la expresión de IFN- $\gamma$  estará aumentada y en estas células no habrá metilación mientras que la expresión de IL-4 estará disminuida.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Cuantificar la expresión de IFN- $\gamma$  y IL-4 en células de lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y con neumonitis por hipersensibilidad y evaluar el estado de metilación de la región promotora de IFN- $\gamma$ .

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Cuantificar por qPCR la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1 en células de lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.
- Cuantificar por qPCR la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1 en células de lavado broncoalveolar de pacientes con NH crónica y sub-aguda.
- Analizar el estado de metilación del promotor del gen de IFN- $\gamma$  en DNA de células de lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar y neumonitis por hipersensibilidad.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Población de estudio.**

Se estudiaron muestras de 24 pacientes; 8 con neumonitis por hipersensibilidad en etapa sub-aguda, 8 con neumonitis por hipersensibilidad en etapa crónica y 8 con fibrosis pulmonar idiopática. Todos los pacientes fueron ingresados y diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER) de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos por el instituto. Como grupo control se incluyeron muestras de tres sujetos sanos. En todos los casos, el instituto cuenta con las cartas de consentimiento informado.

### **2. Células de lavado broncoalveolar (LBA).**

En el presente trabajo se utilizaron células de lavado broncoalveolar (LBA) que previamente fueron obtenidos como parte de las muestras que son utilizadas para el diagnóstico de los pacientes y que forman parte del banco de células de LBA de la clínica de enfermedades intersticiales de INER. Brevemente, los LBA fueron obtenidos mediante la técnica estandarizada descrita por Anzueto<sup>50</sup>. Las células se obtuvieron por centrifugación y fueron conservadas en congelación en nitrógeno líquido en alícuotas que contenían  $5 \times 10^6$  células por mililitro en suero fetal bovino con dimetil sulfóxido al 10% (DMSO). Las células se mantuvieron congeladas hasta su uso.

### **3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.**

Las células que se utilizaron se descongelaron y se contaron con un hemocitómetro, se tiñó con azul tripano al 0.1% para excluir las células muertas. Se realizó la extracción de RNA de un millón de células vivas utilizando 1ml de reactivo TRIzol (Invitrogen™). Brevemente, después de lisar las células con el reactivo, se adicionaron 200µl de cloroformo y se recuperó la fase acuosa. El RNA se precipitó con isopropanol y se lavó 2 veces con etanol al 75%. El RNA obtenido se resuspendió en 20µl de agua libre de RNasas y DNasas y se cuantificó con un espectrofotómetro (Nanodrop) a una longitud de onda de 260nm. El RNA se guardó inmediatamente a -80°C hasta su uso.

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 1µg de RNA total de cada una de las muestras con el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR (Thermo

Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, el RNA se mezcló en una reacción que contenía la enzima Maxima Reverse Transcriptase y una mezcla de primers de oligo-(dT) y hexámeros al azar. La reacción se llevó a cabo calentando 10 minutos a 25°C seguido por 15 minutos a 50°C. El volumen final de la reacción de síntesis se ajustó a 50 µl con agua libre de RNasas y DNasas y las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

#### **4. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1.**

La expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1 se cuantificó por PCR en tiempo real (qPCR). Para la reacción se utilizaron sondas de hidrólisis (Taqman Gene Expression Assay) contra IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1, Master Mix (Maxima Probe qPCR; Thermo Scientific) y 2 µl de cDNA como templado. Los ensayos se corrieron en un termociclador LigthCycler 480 (Roche) durante 40 ciclos. Como genes de referencia se utilizaron a TBP (proteína de unión a la caja TATA) y HPTR1 (hipoxantina fosforribosiltransferasa 1). Los ensayos se hicieron dos veces por triplicado y los resultados se analizaron por cuantificación relativa utilizando el software Qgene.

#### **5. Extracción y Tratamiento de DNA.**

El DNA de las células se extrajo con el reactivo TRIzol (Invitrogen™). Después de separar la fase para extraer el RNA, el DNA se precipitó con etanol al 100% en la fracción orgánica. El DNA se lavó tres veces con 1 ml de citrato de sodio 10 mM en etanol al 10% y un lavado final con etanol al 75%. El DNA se rehidrató en 50µl de Buffer Tris-EDTA (TE) y se incubó toda la noche a 60°C, se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop) y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

El DNA (500 ng) fue sometido a un tratamiento con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ DNA methylation-Gold Kit (Zymo) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mediante este procedimiento los residuos de citosinas que no están metilados son convertidos en uracilos mientras que a las citosinas metiladas permanecen sin cambio. El DNA tratado con bisulfito de sodio se guardó a -20°C hasta su uso.

## 6. Evaluación de Metilación

El estado de metilación se analizó mediante la técnica de PCR específico para metilación (MS-PCR por sus siglas en inglés). Se utilizó como templado el DNA modificado con bisulfito de sodio y dos pares de primers que reconocen la región promotora del gen de IFN- $\gamma$ ; un par que reconoce si la secuencia esta metilada (M) y otro par que reconoce la no metilada (U) (tabla 1). Como controles de metilación se utilizó DNA comercial tratado químicamente para que todas las citosinas estuvieran metiladas y DNA que no está metilado (Zymo).

Para la reacción de amplificación se utilizaron 50ng de DNA en una mezcla que contenía MgCl<sub>2</sub> 50mM, Tris-HCL 20mM pH 8.3, mezcla de nucleótidos (200 $\mu$ M de cada uno), 0.5 $\mu$ M de cada primer, 1.25 unidades de la enzima Taq Platinum y 5% de DMSO, en un volumen final de 15 $\mu$ l. La reacción se llevo a cabo durante 31 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94°C seguido por alineación a 61°C y elongación de 72°C. Para el análisis, los productos de amplificación de la MS-PCR se corrieron en geles de poliacrilamida al 6% de 1 mm de espesor en buffer TBE (Tris-borato-EDTA) por una hora a un voltaje constante de 100V. Posteriormente los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por 20 minutos y desteñidos durante 30 minutos con agua. Las imágenes de los geles fueron digitalizadas con un fotodocumentador (BioRad).

Tabla 1: **Secuencia de primers utilizados para la MS-PCR.**

(U)IFN- $\gamma$ sentido	<sup>5</sup> TATAAATAAAAAATCAACATTTTACCAAAA <sup>3</sup>
(U)IFN- $\gamma$ anti-sentido	<sup>5</sup> TTGGTAGTAATAGTTAAGAGAATTTA <sup>3</sup>
(M) IFN- $\gamma$ sentido	<sup>5</sup> TGTGAATGAAGAGTTAATATTTTATTA <sup>3</sup>
(M)IFN- $\gamma$ anti-sentido	<sup>5</sup> TTCTACTTCTTTTACATATAAATCCTAACA <sup>3</sup>

**U**= no metilado; **M**= metilado.

## 7. Digestión de DNA con endonucleasa McrBc

Adicional al análisis de metilación por MS-PCR, el DNA (100 ng) de 4 pacientes con NH etapa sub-aguda, 2 con NH etapa crónica, 2 con FPI y 2 sujetos control, fue digerido con la endonucleasa McrBc, seguido de la amplificación mediante PCR de la región promotora del IFN- $\gamma$ . McrBc es una enzima que corta el 50% de las mCpG, por lo tanto, el DNA con regiones metiladas son cortadas y no amplifican mientras que las regiones no metiladas permanecen sin cortar y si amplifican. Después de una hora de incubación del DNA con la

enzima, se realizó una PCR y los productos de amplificación se corrieron durante 1 hora en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE (Tris-borato-EDTA). El gel fue teñido con bromuro de etidio por 20 minutos y la imagen se digitalizo con un fotodocuemntador (BioRad).

## **8. Análisis estadístico**

A los resultados de expresión por PCR en tiempo real se les aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente se le aplicó la prueba U de Mann Whitney. Se consideraron diferencias significativas los valores de  $p \leq 0.05$ . Este análisis se realizó con el programa Graph Pad Prism V.5.0.4.

## RESULTADOS

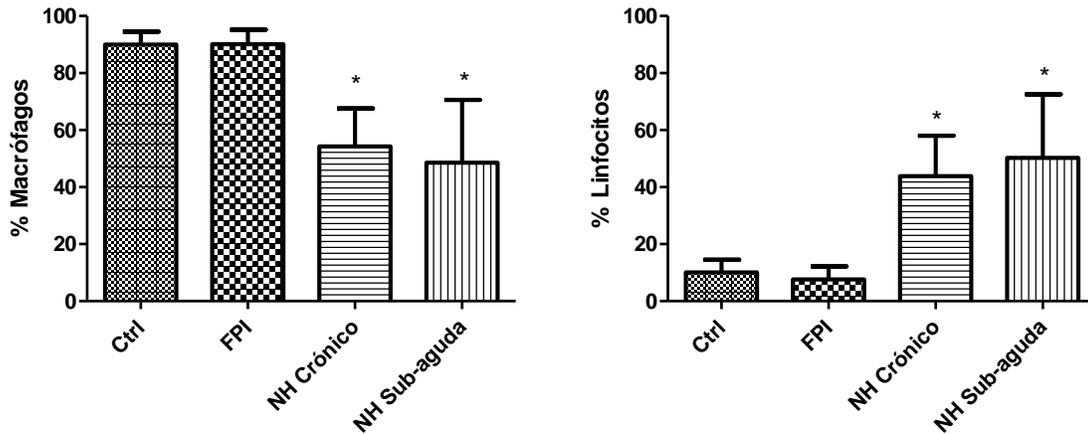
### Características clínicas de los pacientes

La tabla 2 muestra algunos de los parámetros clínicos de los pacientes y controles. Debido a la naturaleza de este estudio, las muestras utilizadas no están pareadas por edad, ni por sexo. Como se puede ver, los pacientes con FPI son los de mayor edad y esta diferencia es significativa comparando a este grupo con los pacientes de NH sub-aguda ( $p < 0.01$ ). Así mismo, la diferencia de edades entre los pacientes de NH crónica y sub-aguda, también es significativa ( $P < 0.05$ ). Respecto al sexo, la mayoría de los pacientes con NH fueron mujeres mientras que todos los de FPI fueron hombres.

Sin embargo, uno de los datos más relevante para diferenciar a las dos patologías es el conteo diferencial de las células recuperadas del LBA y como se observa en la figura 4A el porcentaje de linfocitos presente en los pacientes con NH es significativamente mayor en comparación con los controles y los pacientes con FPI ( $p < 0.05$ ). Así mismo, en pacientes con NH se observó una disminución en el porcentaje de macrófagos (figura 4B;  $p < 0.05$ ) lo cual es indicativo del perfil característico de la NH. No hubo diferencias en el perfil de macrófagos y linfocitos entre controles y FPI.

Tabla 2: Características clínicas de la población de estudio

	Ctrl (n=3)	FPI (n=8)	NH Crónica (n=8)	NH sub-aguda (n=8)	Valor de p
<b>Edad (años)</b>	38±20.2	65±9.6	59±9	46±8.8	p<0.01 FPI vs NH-s p<0.05 NH-c vs NH-s
<b>Genero F/M</b>	0/3	0/7	7/1	5/3	
<b>Tiempo de síntomas (meses)</b>	0	24.4±20.8	35.4±35.6	22.4±16.6	ns.
<b>Tabaquismo</b>		8/8	0/8	2/6	
<b>Macrófagos %</b>	90±4.5	90.17±5.04	54.25±13.41	48.5±22.14	Ctrl vs NHC p=0.012; Ctrl vs NHS p=0.02; FPI vs NHC p=0.001; FPI vs NHS p=0.001
<b>Linfocitos %</b>	10±4.58	7.67±4.5	43.88±14.21	50.25±22.3	Ctrl vs NHC p=0.012; Ctrl vs NHS p=0.02; FPI vs NHC p=0.001; FPI vs NHS p=0.001

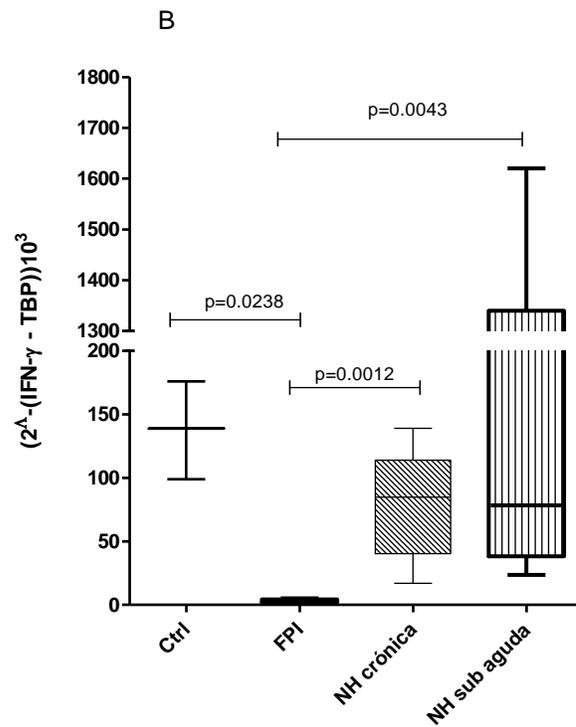
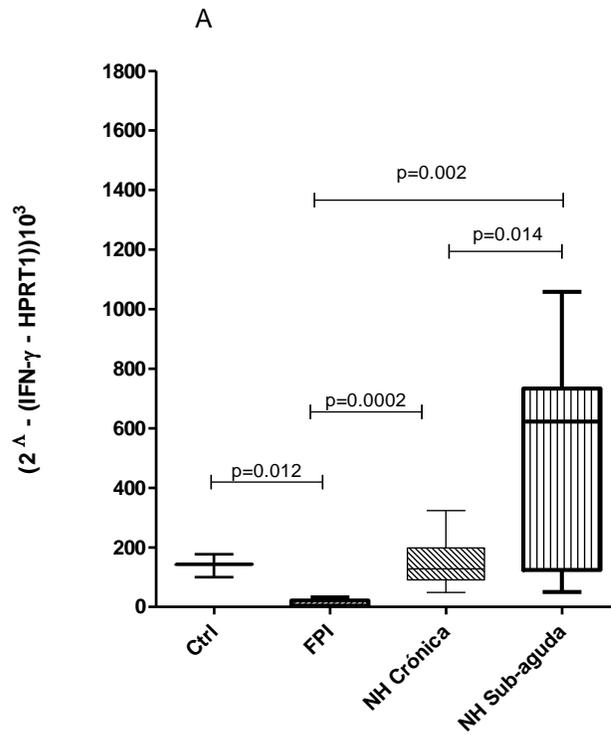


**Figura 4:** Conteo diferencial de macrófagos (A) y linfocitos (B) en LBA de los grupos de estudio. \* $p < 0.05$ .

### Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1

Para determinar las diferencias en el patrón de expresión de los genes IFN- $\gamma$ , IL-4 y DNMT1 entre sujetos control, pacientes con NH etapa sub-aguda y crónica y pacientes con FPI, se analizaron los niveles de RNAm por RT-qPCR. Con el fin de corroborar las posibles diferencias entre los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4, los datos fueron normalizados contra dos genes de referencia, TBP y HPRT1.

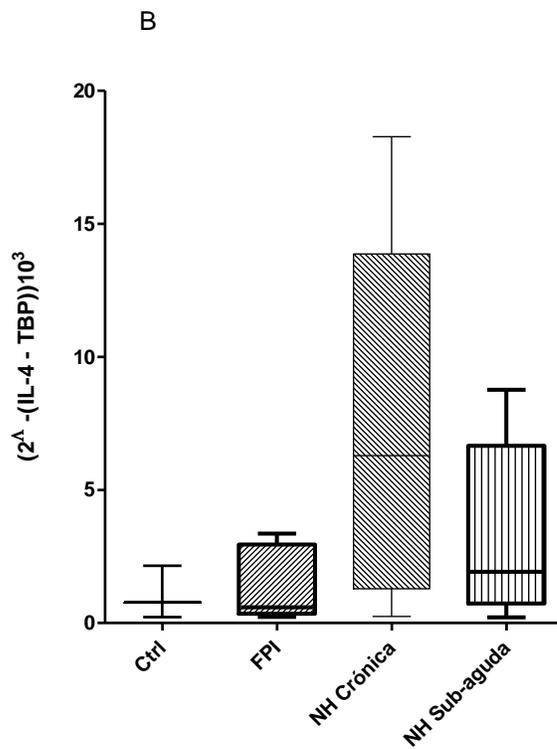
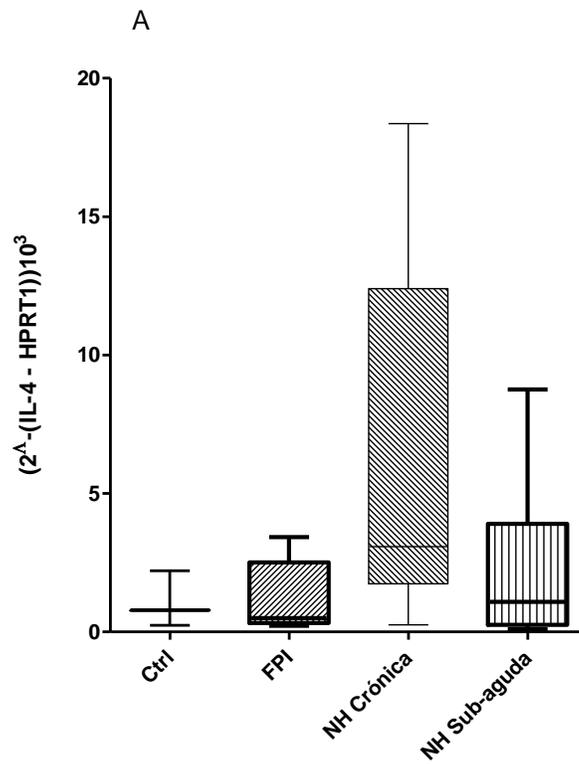
En el caso de IFN- $\gamma$  y como se muestra en la figura 5A, los niveles de expresión en pacientes con FPI se encuentran significativamente disminuidos en comparación con el grupo control y los grupos de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad ( $M_e = 143.3$  en controles;  $M_e = 3.919$  en FPI;  $M_e = 128.3$  en NH crónica;  $M_e = 510$  en NH sub-aguda). La misma tendencia de disminución en la expresión de IFN- $\gamma$  en los pacientes con FPI fue observada cuando los datos fueron normalizados contra el gen de referencia TBP (figura 5B). Así mismo, los datos obtenidos muestran un incremento significativo en la expresión de IFN- $\gamma$  en los pacientes con NH-subaguda en comparación con los controles y FPI ( $p < 0.01$ ) y este incremento también mostró diferencias significativas contra el grupo de NH-crónica cuando los datos fueron normalizados contra el gen de referencia HPRT1 ( $p < 0.05$ ).



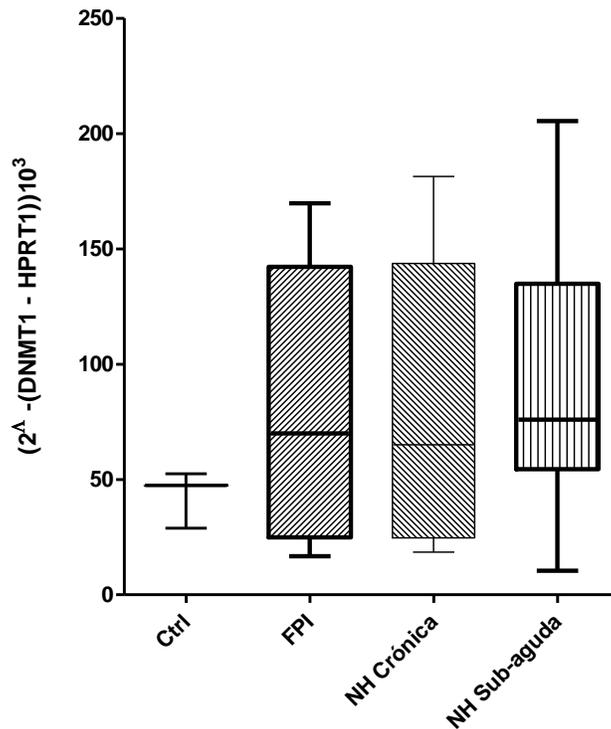
**Figura 5:** Expresión de IFN- $\gamma$  en células de LBA de controles (n=3), pacientes con FPI (n=8), con NH crónica (n=8) y pacientes con NH sub-aguda (n=8). Las barras representan la mediana y rango de la expresión normalizada contra HPRT1 (A) y contra TBP (B).

En la figura 6A se muestran los resultados de la cuantificación de IL-4 normalizando los datos contra HPRT1. Aunque se observa una tendencia de incremento en la expresión de IL-4 en los pacientes con NH crónica, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos estudiados (Control  $M_e= 0.776$ ; FPI  $M_e= 0.502$ ; NH crónica  $M_e= 6.289$  y NH-sub aguda  $M_e= 1.087$ ). La misma tendencia se observó cuando la expresión de IL-4 se ajustó contra TBP (figura 6B).

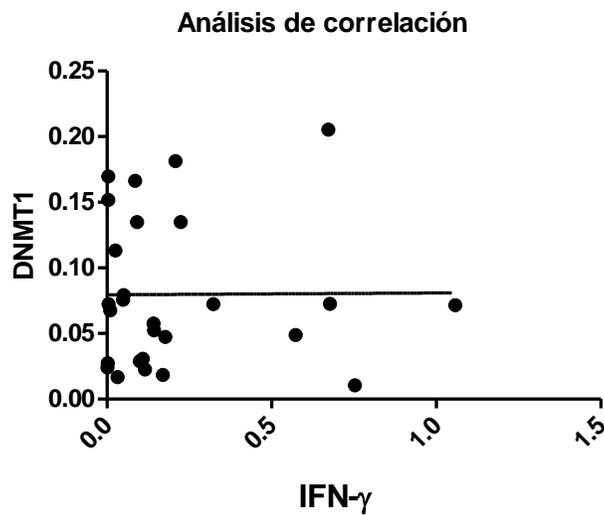
La DNMT1 es la enzima encargada de mantener el estado de metilación en el DNA y por lo tanto el incremento de su expresión se asocia a un estado de hipermetilación. El análisis de expresión de la DNMT1 se muestra en la figura 7. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de esta enzima en ninguno de los grupos estudiados (Control  $M_e= 47.4$ ; FPI  $M_e= 69.99$ ; NH crónica  $M_e= 65.07$  y NH-sub aguda  $M_e= 75.91$ ). Para establecer si existía alguna asociación entre los niveles de expresión de la DNMT1 y el IFN- $\gamma$ , se hizo un análisis de correlación (figura 8) y los resultados muestran que no existe correlación alguna.



**Figura 6:** Expresión de IFN- $\gamma$  en células de LBA de controles (n=3), pacientes con FPI (n=8), con NH crónica (n=8) y pacientes con NH sub-aguda (n=8). Las barras representan la mediana y rango de la expresión normalizada contra HPRT1 (A) y contra TBP (B)



**Figura 7:** Cuantificación relativa de la DNMT1 normalizada contra el gen HPRT1 de células de LBA de: 3 sujetos control, 8 pacientes con FPI, 8 pacientes con NH etapa crónica y 8 pacientes con NH etapa sub-aguda. Datos mostrados con mediana y rangos.



**Figura 8:** Análisis de correlación de la expresión génica del IFN- $\gamma$  contra la expresión de DNMT1, de los 8 pacientes con NH etapa sub-aguda, 8 pacientes con NH etapa crónica, 8 pacientes con FPI y 3 sujetos control.

## **Evaluación de estado de metilación del DNA**

Para analizar del estado de metilación de IFN- $\gamma$  por MS-PCR es necesario realizar la conversión de citocinas no metiladas en uracilos en el DNA. Se utilizó DNA genómico de células de LBA tratado con bisulfito y cada reacción fue acompañada de controles positivos comerciales para cada par de primers que identifica DNA metilado y DNA sin metilar, además de un control negativo sin templado ( $H_2O$ ). En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos de la MS-PCR, donde se observa que en todas las muestras está presente la banda que corresponde al producto de amplificación que indica metilación (M) y en la mayoría también se observa la banda que indica ausencia de metilación (U). Así mismo, los controles positivos solo amplificaron con su correspondiente par de primers y en ninguno de los casos amplificó el control negativo.

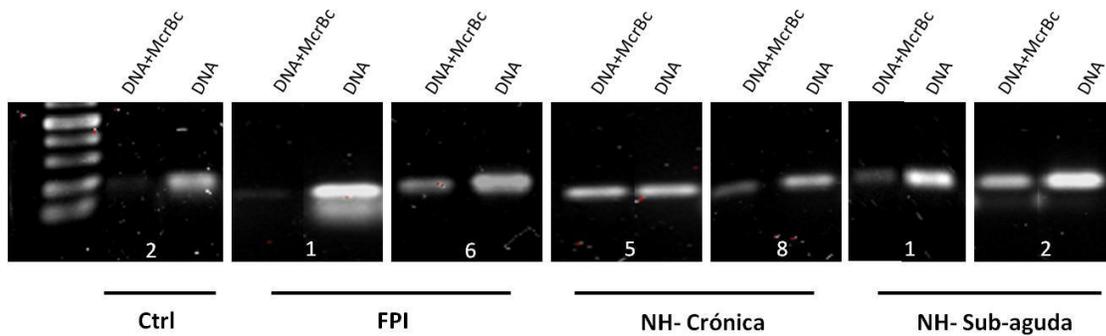
En los sujetos control observamos que en todos los casos la proporción de la banda de amplificación para el producto metilado (M) es mayor que la del no metilado (U) y de hecho, en uno de ellos prácticamente sólo se observa el producto M lo cual indica la existencia de hipermetilación en estas muestras (figura 9A). En el caso de los pacientes con FPI observamos que en 7 de los 8 pacientes la banda para el producto metilado es más intensa (figura 9B, recuadros en azul) y solo en uno de ellos (FPI 5) los productos de amplificación son similares. Estos resultados indican que más del 85% de estas muestras se encuentran hipermetiladas en la región promotora del IFN- $\gamma$ .

Por su parte, en pacientes con neumonitis en etapa crónica 6 de las 8 muestras tuvieron una mayor proporción del producto que indica metilación del promotor de IFN- $\gamma$ , una presentó proporciones similares del producto metilado y no metilado (muestra 2) y en una se encontró que la mayor proporción corresponde a la banda que indica la ausencia de metilación (muestra 5; figura 9C). Por último, en pacientes con NH en etapa sub-aguda observamos que solo en el 50% de las muestras la banda correspondiente al producto metilado es más intensa mientras que en la otra mitad las bandas de amplificación M y U tienen una proporción similar (figura 9D).



**Figura 9:** Análisis del estado de metilación en geles de poliacrilamida al 6% donde se muestran los productos de amplificación metilados (M) 142pb y no metilados (U) 141pb de la MS-PCR para la región promotora del IFN- $\gamma$  de células de LBA. En los recuadros se muestran los pacientes que tienen una proporción mayor de metilación: a) los resultados de la MS-PCR de los sujetos control; b) productos de amplificación de los 8 pacientes con FPI; c) productos de amplificación de 8 pacientes con NH en etapa crónica; d) productos de amplificación 8 de pacientes con NH en etapa sub-aguda. Con controles positivos para cada par de primers y el control negativo (H2O).

Otra manera de comprobar si el promotor de IFN- $\gamma$  esta metilado es someter el DNA genómico a una digestión con la enzima McrBc, la cual corta el 50% de las regiones que están metiladas, seguido por una PCR para amplificar ésta región. La figura 10 muestra los productos de amplificación de este análisis en algunas de las muestras utilizadas en la MS-PCR: control (muestra 2), FPI (muestras 1 y 6), NH crónica (muestras 5 y 8) y NH subaguda (muestras 1 y 2). Los resultados obtenidos confirman lo observado en el análisis por MS-PCR y como se puede apreciar en la figura 10, las muestras que presentaron un mayor grado de metilación (analizado por MS-PCR) también mostraron una disminución del producto de amplificación cuando se trataron con la enzima McrBc en comparación con el DNA sin la enzima, lo cual indica que en esas muestras existía metilación. Así mismo, se observa que en muestras donde no había una diferencia marcada de metilación (NH crónica 5 y NH subaguda 1), los productos de amplificación en el DNA con y sin la enzima son similares, corroborando los resultados de la MS-PCR.



**Figura 10:** Amplificación del promotor de IFN $\gamma$  en DNA genómico. Geles de agarosa al 1.2% mostrando los productos de amplificación del promotor después de la digestión con la endonucleasa (DNA+McrBc) o DNA sin digerir. Los números corresponden a las mismas muestras utilizadas en el análisis por MC-PCR.

## DISCUSIÓN

La neumonitis por hipersensibilidad y la fibrosis pulmonar idiopática son dos de las enfermedades pulmonares intersticiales más estudiadas. En nuestro país la NH es la EPID más común y en fases crónicas puede progresar a la fibrosis. Por su parte, dentro de las EPID, la FPI es una de las menos frecuentes pero es la más agresiva y mortal, con un promedio de supervivencia de 3 años después del diagnóstico. Sin embargo, la patogenia de ambas enfermedades, así como el papel del IFN- $\gamma$  y la IL-4 en el desarrollo y progresión a fibrosis no es clara. La comprensión de que las citocinas características del perfil Th1 y Th2 pueden ser expresadas y reconocidas por diferentes tipos celulares y que las funciones de éstas son diferentes, sugiere que el desequilibrio en la expresión de estas citocinas puede ser importante en el desarrollo de respuestas que pueden conducir a procesos patológicos como la FPI o la NH<sup>6</sup>.

La diferenciación de los linfocitos hacia un perfil Th1 o Th2 desempeña un papel importante ya que éstos son los responsables de la activación de macrófagos alveolares, que a su vez secretan moléculas que pueden inducir o reprimir la expresión de otras proteínas como la colágena. En particular el IFN- $\gamma$  es un potente inductor de la respuesta tipo Th1 y en pulmón se ha observado que es capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos pulmonares y así como reducir la producción de colágena<sup>41</sup>. Nuestros resultados muestran que hay una expresión diferencial del IFN- $\gamma$  en los grupos de estudio. La NH en etapa aguda y sub-aguda se caracteriza por presentar una respuesta de tipo Th1, con un aumento en la expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, lo cual concuerda con la expresión reportada de IFN- $\gamma$  en este estudio para el grupo de pacientes con NH en etapa sub-aguda. Se cuantificó el IFN- $\gamma$  normalizando los datos contra los genes endógenos TBP y HPRT1 donde podemos observar que en ambos casos se mantiene la tendencia de un incremento en la expresión de la citocina respecto a los demás grupos de estudio.

En este estudio observamos que en los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad la expresión de IFN- $\gamma$  es muy heterogénea, hay pacientes que tienen una expresión de IFN- $\gamma$  similar a la del grupo control, mientras que otros pacientes, en particular en los de NH subaguda presentan una expresión mayor. El amplio rango en la cantidad de IFN- $\gamma$  expresado en el grupo podría deberse a que los pacientes pueden responder de manera

diferente al mismo alérgeno, es decir, las diferencias en la dirección de la diferenciación de células T se debe a la sensibilización que tiene cada persona al antígeno, así como a la predisposición genética. De acuerdo a los datos clínicos, dentro del mismo grupo existen diferencias en el tiempo y cantidad de antígeno al que estuvieron expuestos, al porcentaje linfocitario en el LBA y la progresión de la enfermedad al momento en que se realizó el LBA, lo cual podría explicar en parte la heterogeneidad de expresión de esta citocina.

Independientemente de todos los factores que propician que la respuesta sea mayor en unos pacientes, el incremento del IFN- $\gamma$  en los pacientes con NH en etapa sub aguda se debe a la polarización parcial de la respuesta inmune a un perfil Th1. Como se observa en el análisis diferencial de las células de LBA, los pacientes con NH en etapa sub-aguda tienen un conteo de linfocitos  $\bar{x}$ = 50.25%  $\pm$ 22.30 y macrófagos  $\bar{x}$ = 48.50%  $\pm$  22.14 ( $p$ =0.02 respecto al grupo control). Lo que concuerda con lo reportado en la literatura donde la respuesta inmune de la NH se caracteriza por infiltrados linfocitarios, incremento en la expresión de IFN- $\gamma$  por linfocitos T y la activación de macrófagos alveolares<sup>2</sup>.

Diversos estudios sugieren que las citocinas tipo Th1 desempeñan un papel importante en el desarrollo de la NH, así mismo debido a la regulación de tipo antagónica que tienen el IFN- $\gamma$  y la IL-4, se ha sugerido que en pacientes con NH en etapa crónica la actividad de las células Th1 disminuye mientras que aumenta la actividad Th2, es decir, la hipótesis de un cambio de un perfil Th1 a Th2 en la etapa crónica de la NH<sup>40,42</sup>. En el grupo de pacientes con NH en etapa crónica podemos observar que la expresión de IFN- $\gamma$  disminuye en comparación con el grupo de sub-agudos y se acerca a la expresión basal, observada en el grupo control. Esta reducción en la expresión del IFN- $\gamma$  que se observa en los pacientes con NH crónicos concuerda con la hipótesis de que en la etapa crónica de la enfermedad hay un cambio a un perfil Th2 con una reducción de la expresión de IFN- $\gamma$ , sin embargo no se pudo observar un incremento en la expresión de IL-4.

En los pacientes crónicos también observamos una reducción en el porcentaje linfocitario en el LBA respecto al grupo control ( $p$ <0.01), con lo cual se podría explicar la disminución de la expresión del IFN- $\gamma$ . Sin embargo, a pesar de las diferencias observadas en el porcentaje linfocitario entre pacientes con NH en etapa crónica y sujetos control, no existen diferencias significativas en la expresión de IFN- $\gamma$ , por lo que se podría inferir que

los linfocitos infiltrados en pacientes con NH en etapa crónica no presentan una polarización tipo Th1, pero es necesario aumentar el número de muestras para poder confirmar esta aseveración.

Por otro lado pudimos constatar que la expresión de IFN- $\gamma$  en los pacientes con FPI se encuentra considerablemente apagada, siendo prácticamente nula su expresión. En el conteo diferencial no existen diferencias en la proporción de células entre el grupo de pacientes con FPI y el grupo control, por lo que la diferencia en la expresión de IFN- $\gamma$  no se debe a un aumento o disminución de linfocitos. La evidencia de estudios en animales y humanos sugiere que el IFN- $\gamma$  puede tener efectos anti-fibróticos, inhibe la síntesis de colágena por los fibroblastos y atenúa la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en modelos murinos<sup>51</sup>, de manera que la reducción de IFN- $\gamma$  en pacientes con FPI es un indicativo de la enfermedad.

En el análisis de expresión de la IL-4 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, hay una tendencia de incremento en los pacientes con NH crónica que aunque no fue significativa podría ser un indicador importante debido a que estos pacientes pueden progresar hacia la fibrosis. En este sentido, se ha reportado un incremento en la producción de IL-4 y de su receptor IL-4R-alpha en el LBA de pacientes con neumonitis crónica y se ha sugerido que IL-4 podría servir como un marcador potencial de fibrogénesis en estos pacientes<sup>52</sup>. De manera que nuestros resultados, a pesar de no fueron significativos, apoyan esta idea. Sin embargo, sería importante evaluar otras citocinas pro-fibróticas como la IL-13, IL-5 e IL-10 que actúan de manera sinérgica a la IL-4, favoreciendo la activación de linfocitos y macrófagos a un perfil Th2/M2, en los pacientes con NH en etapa crónica y en pacientes con FPI.

El papel de la IL-4 en la FPI no está del todo claro. Por un lado existen evidencias de que IL-4 podría desempeñar un papel importante en la enfermedad ya que in vitro IL-4 puede contribuir al depósito de matriz extracelular<sup>48</sup>. Sin embargo, un estudio realizado por Sumida A, et al. muestra que los fibroblastos de pacientes con FPI tienen una respuesta predominantemente TH1 y no se encontraron niveles elevados de IL-4 en LBA, pero sí de otras moléculas implicadas en la patogénesis de la enfermedad como IP-10<sup>53</sup>. En nuestro trabajo no evaluamos los niveles de la proteína IL-4 pero encontramos que en pacientes con FPI no hay un aumento en su expresión en las células de LBA lo cual podría ser

indicativo de que en estas células tampoco hay una polarización hacia una respuesta tipo Th2 y este resultado checa con lo reportado por estos autores. Sin embargo, en el caso particular de la FPI el desbalance de citocinas podría deberse a la reducción de la expresión génica del IFN- $\gamma$  y no necesariamente a un aumento en la expresión de la IL-4, permitiendo que la expresión basal de IL-4 guíe la polarización hacia un perfil tipo Th2/M2 pero se necesita hacer un estudio más profundo para corroborar esto.

Las diferencias en la expresión génica del IFN- $\gamma$  se pueden explicar no sólo por un incremento o decremento de las poblaciones celulares reportadas en el LBA, también se ven influidas por variaciones epigenéticas, como la metilación del DNA, las modificaciones de histonas y los RNAs no codificantes, las cuales afectan la expresión de los genes y participan en la polarización de la respuesta inmune. Uno de los mecanismos involucrados en la polarización de linfocitos T es la metilación y demetilación del DNA, la desmetilación de regiones específicas del gen es un evento necesario que permite la unión de factores de transcripción en linfocitos T activados, mientras que la metilación de dichas regiones impide la transcripción génica. Nuestro trabajo es una primera aproximación al estudio del estado de metilación de la región promotora del gen del IFN- $\gamma$  en células de LBA de pacientes con NH en etapa sub-aguda y crónica y en pacientes con FPI, con el fin de evaluar si la expresión del gen está regulada por mecanismos de metilación del DNA. Los trabajos enfocados al estudio de procesos epigenéticos en células de LBA son escasos pero sin duda constituyen una ruta que podría ampliar el conocimiento para entender la patogénesis de las enfermedades. Un ejemplo de este tipo de trabajos es el realizado por Andresen quien trabajando en células de LBA de pacientes con EPOC, mostró que el incremento de la defensina-1, una molécula esencial en la respuesta inmunológica innata, no se asocia a un cambio de metilación en su región promotora pero sí a un cambio epigenético que propicia un ambiente de apertura de la cromatina asociada al incremento de la histona H3K4me3 que se asocia con la activación transcripcional<sup>54</sup>.

El IFN- $\gamma$  tiene un papel importante en la activación y diferenciación de los linfocitos Th1, así como en el desarrollo y progresión de enfermedades pro-inflamatorias. En este contexto, en los linfocitos T se ha identificado una región localizada entre la caja TATA y CAAAT del promotor del IFN- $\gamma$  y se ha visto que la expresión del gen correlaciona con el estado de metilación de dicha región (TACGTA). Ésta región es reconocida por la

endonucleasa SnaBI, la cual no corta el DNA cuando la citosina está metilada en el carbono 5 y esta región se encuentra hipometilada cuando se sobreexpresa el IFN- $\gamma$ <sup>55</sup>.

Nosotros evaluamos el estado de metilación del IFN- $\gamma$  para ver si la expresión de esta molécula se podía asociar a este proceso epigenético. Basados en los resultados obtenidos por el análisis mediante la técnica de MS-PCR, encontramos que la metilación del promotor de IFN- $\gamma$  ocurre tanto en pacientes fibróticos como en pacientes con neumonitis. Sin embargo, sólo en el grupo de pacientes con FPI, de las 8 muestras que se analizaron 7 tuvieron una mayor proporción de la banda de amplificación que indica que esas muestras están metiladas mientras que en neumonitis sub aguda, sólo fue en 4 de las 8 estudiadas y como ya se mencionó con anterioridad, las muestras de FPI tuvieron los niveles más bajos de expresión del IFN- $\gamma$ . En algunas de las muestras, el tratamiento de DNA con la endonucleasa McrBc corroboró los hallazgos de metilación.

Estos resultados sugieren que la baja expresión de IFN- $\gamma$  podría estar asociada a un evento de metilación del promotor en estas células. Sin embargo, el análisis de metilación de la región promotora del IFN- $\gamma$  es parcial, la información obtenida en este trabajo no es suficiente para confirmar o rechazar la hipótesis de que la expresión del IFN- $\gamma$  es controlada por metilación en el promotor. No obstante, es necesario realizar estudios in vitro, por ejemplo, con el inhibidor 5-aza-deoxicitidina (5-aza) para poder verificar esta aseveración ya que este inhibidor tiene la capacidad de revertir la metilación. Trabajos que utilizan a este inhibidor para corroborar el estado de metilación ya han sido reportados; por ejemplo, se vio que el tratamiento de fibroblastos de pacientes con FPI con el inhibidor 5-aza revierte la metilación del promotor del gen p14ARF, cuya ausencia está asociada a un fenotipo que confiere resistencia a la muerte celular<sup>56</sup>.

Por otro lado, un estudio realizado en pacientes con asma bronquial mostró la metilación de los CpG en las posiciones -295, -186, y 122 del gen de IFN- $\gamma$  está relacionada con la expresión del gen así como la concentración de la citocina. Estos datos sugieren que la desmetilación en estas posiciones tiene un fuerte efecto sobre la expresión génica.<sup>57</sup>

Un estudio realizado por Jones y Chen demostró que en linfocitos T CD4 cultivados bajo condiciones que estimulan la polarización Th1, la región promotora de IFN- $\gamma$  se encuentra hipometilada, mientras que cuando las células son cultivadas bajo condiciones Th2, la región promotora del IFN- $\gamma$  se hipermetila<sup>58</sup>. Farrar y colaboradores, demuestran en células T citotóxicas que la expresión de IFN- $\gamma$  aumenta después de tratar a las células

con 5-azacitidina, la cual genera una hipometilación en las citosinas de los dinucleótidos CpG.<sup>59</sup> La diferenciación de células T CD4 vírgenes a un perfil Th1 se da por la desmetilación en la región CNS -54, en el intrón 1 y en CNS 18-20 del IFN- $\gamma$ , mientras que la diferenciación en condiciones Th2 lleva a una metilación de CpG en el promotor del IFN- $\gamma$ <sup>10</sup>.

En estudios como el de Young y colaboradores demuestran que la metilación en la región promotora del gen del IFN- $\gamma$  influye en la polarización/diferenciación de los linfocitos T. La región promotora se encuentra hipometilada en linfocitos T que expresan la citocina, mientras que en linfocitos Th2 la región promotora se encuentra hipermetilada y el grado de metilación es inversamente proporcional a la concentración de la citocina<sup>55</sup>.

Por último, la metilación es un proceso asociado al incremento en la expresión y actividad de la DNMT1 por lo que nosotros analizamos la expresión de esta enzima por qPCR. Contrario a lo que esperábamos, los resultados de este trabajo indican que no hay diferencias en los niveles de expresión de esta enzima entre las muestras de FPI y NH y tampoco se observó correlación alguna con los niveles de expresión de IFN- $\gamma$ . Existen estudios como el realizado por Lee y colaboradores en donde se observó una correlación entre la pérdida de la DNMT1 y la reducción de la metilación en células T CD4 con el concomitante incremento en la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-2, e IL-3<sup>60</sup>. En este contexto se realizó un análisis de correlación entre la expresión del IFN- $\gamma$  y de la DNMT1 en el cual se esperaba un incremento en la expresión de la DNMT1 cuando la expresión de IFN- $\gamma$  se encuentra disminuida, en el estudio no se encontró correlación o algún patrón que pudiera indicar si la DNMT1 está afectando la expresión del gen. En nuestro caso, no hay correlación entre la expresión del IFN- $\gamma$  y de la DNMT1, pero no podemos afirmar que se esto sea cierto ya que el nuestro es un estudio con un número de muestras muy pequeño y los estudios de correlación requieren de una "n" muy grande.

El presente trabajo es un estudio piloto, por lo que hay muchos factores y limitantes que influyen en los resultados obtenidos, los cuales sería importante modificar para evaluar de manera más precisa el papel de la metilación de la región promotora en los linfocitos T de pacientes con NH y FPI. Para poder determinar el efecto que tiene la metilación del DNA en la región promotora del gen de IFN- $\gamma$  es necesario realizar un estudio más amplio, ya sea mediante un análisis con tratamiento de bisulfito seguido de secuenciación del promotor de IFN- $\gamma$  para determinar si hay otros sitios metilados en el promotor, en

regiones aledañas a éste o que puedan estar regulando la transcripción del gen del IFN- $\gamma$  en los pacientes con NH y FPI. Adicionalmente, se sabe que la edad es un factor que tiene una gran influencia sobre diferentes procesos, incluyendo los epigenéticos y en nuestro caso las muestras no están pareadas por edad ni por sexo y no debemos descartar que estas variables deban ser consideradas para otro estudio.

## CONCLUSIONES

- La expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes con NH en etapa sub-aguda está incrementada, mientras que en pacientes con NH en etapa crónica disminuyen. Por su parte, en pacientes con FPI, la expresión de IFN- $\gamma$  está significativamente disminuida.
- No se encontraron diferencias en la expresión de IL-4 entre los grupos estudiados. Sin embargo, se observó una tendencia de incremento en pacientes con NH en etapa crónica.
- A pesar de las limitaciones del estudio, los resultados indican que la expresión de IFN- $\gamma$  es inversamente proporcional al estado de metilación de la región promotora pero consideramos que no hay suficiente evidencia para confirmar o rechazar la hipótesis de que la expresión del IFN- $\gamma$  es controlada por un proceso de metilación

## REFERENCIAS

1. Selman, M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin. Chest Med.* **25**, 531–547, vi (2004).
2. Girard, M., Lacasse, Y. & Cormier, Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* **64**, 322–34 (2009).
3. Meltzer, E. B. & Noble, P. W. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 8 (2008).
4. Selman, M., Mejía, M. & Pardo, A. Fibrosis pulmonar idiopática. **61**, 233–242 (2009).
5. Thannickal, V. J., Toews, G. B., White, E. S., Lynch, J. P. & Martinez, F. J. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu. Rev. Med.* **55**, 395–417 (2004).
6. Keane, M. P. & Strieter, R. M. The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir. Res.* **3**, 5 (2002).
7. Wynn, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 583–594 (2004).
8. Adcock, I. M., Ford, P., Ito, K. & Barnes, P. J. Epigenetics and airways disease. *Respir. Res.* **7**, 21 (2006).
9. Ansel, K. M., Lee, D. U. & Rao, A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **4**, 616–623 (2003).
10. Schoenborn, J. R. *et al.* Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nat. Immunol.* **8**, 732–742 (2007).
11. Bois, R. M. EDUCATION & DEBATE Fortnightly Review Diffuse lung disease : an approach to management. **309**, 175–179 (1994).
12. Akashi, T. *et al.* Histopathologic analysis of sixteen autopsy cases of chronic hypersensitivity pneumonitis and comparison with idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 405–15 (2009).
13. Costabel, U., Bonella, F. & Guzman, J. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clin. Chest Med.* **33**, 151–63 (2012).
14. Lacasse, Y. & Cormier, Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Orphanet J. Rare Dis.* **1**, 25 (2006).
15. Lacasse, Y. *et al.* Classification of hypersensitivity pneumonitis: a hypothesis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **149**, 161–6 (2009).
16. Mejía, M. E., Suárez, T. D. J., Arreola, A., Alonso, D. & Estrada, A. Neumonitis por hipersensibilidad. *Neumol. Cir. Torax* **66**, 115–123 (2007).

17. Selman, M. *et al.* Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* **2**, e482 (2007).
18. Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S. W. & Phan, S. H. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **113**, 243–252 (2004).
19. Sureshbabu, a, Tonner, E., Allan, G. J. & Flint, D. J. Relative Roles of TGF- $\beta$  and IGFBP-5 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pulm. Med.* **2011**, 517687 (2011).
20. London, C. a, Abbas, a K. & Kelso, a. Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **63**, 37–44 (1998).
21. Larosa, D. F. & Orange, J. S. 1. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, S364–9; quiz S412 (2008).
22. Biedermann, T., Röcken, M. & Carballido, J. M. TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *J. Investig. dermatology Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatology Inc Eur. Soc. Dermatological Res.* **9**, 5–14 (2004).
23. Locati, M., Mantovani, A. & Sica, A. *Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity.* *Adv. Immunol.* **120**, 163–84 (Elsevier Inc., 2013).
24. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–96 (2010).
25. Kahnert, A. *et al.* Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 631–47 (2006).
26. Rottoli, P. *et al.* Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* **5**, 1423–30 (2005).
27. Herceg, Z. Epigenetic information in chromatin and cancer. *Eur. J. Cancer* **45 Suppl 1**, 442–4 (2009).
28. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 245–54 (2003).
29. Kim, G. H., Ryan, J. J., Marsboom, G. & Archer, S. L. Epigenetic mechanisms of pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* **1**, 347–56 (2014).
30. Zentner, G. E. & Henikoff, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 259–66 (2013).
31. Talasz, H., Lindner, H. H., Sarg, B. & Helliger, W. Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 38814–22 (2005).
32. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* **15 Spec No**, R17–29 (2006).
33. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21 (2002).

34. Ehrlich, M. *et al.* A.Gama-Sosa\*,. **10**, 11–14 (1982).
35. Klose, R. J. & Bird, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 89–97 (2006).
36. Reik, W. & Walter, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 21–32 (2001).
37. Sampath, A. Effect of  $\gamma$ -Interferon Synthesis by Normal Lung Fibroblasts on Collagen and Fibrotic. *Chest* **101**, 1323–1331 (1992).
38. Caillaud, D. M. *et al.* Bronchoalveolar lavage in hypersensitivity pneumonitis: a series of 139 patients. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **11**, 15–9 (2012).
39. Domagała-Kulawik, J., Skirecki, T., Maskey-Warzechowska, M., Grubek-Jaworska, H. & Chazan, R. Bronchoalveolar lavage total cell count in interstitial lung diseases--does it matter? *Inflammation* **35**, 803–9 (2012).
40. Yamasaki, H., Ando, M., Brazer, W., Center, D. M. & Cruikshank, W. W. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J. Immunol.* **163**, 3516–23 (1999).
41. Gudmundsson, G. & Hunninghake, G. W. Interferon-gamma is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Invest.* **99**, 2386–90 (1997).
42. Barrera, L. *et al.* Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 44–55 (2008).
43. Mitaka, K. *et al.* Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **154**, 264–274 (2011).
44. Selman, M., King, T. E. & Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. in *Ann. Intern. Med.* **134**, 136–151 (2001).
45. Agostini, C. & Gurrieri, C. Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**, 357–63 (2006).
46. Vasakova, M. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand. J. Immunol.* **69**, 268–74 (2009).
47. Majumdar, S. *et al.* Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. *Eur. Respir. J.* **14**, 251–7 (1999).
48. Jakubzick, C. Augmented pulmonary IL-4 and IL-13 receptor subunit expression in idiopathic interstitial pneumonia. *J. Clin. Pathol.* **57**, 477–486 (2004).
49. Selman, M. *et al.* Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 188–98 (2006).

50. Anzueto, A., Levine, S. M. & Jenkinson, S. G. The technique of bronchoalveolar lavage. A guide to sampling the terminal airways and alveolar space. *J. Crit. Illn.* **7**, 1817–1824 (1992).
51. Arai, T. *et al.* Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **278**, L914–22 (2000).
52. Sterclova, M., Matej, R., Mandakova, P., Skibova, J. & Vasakova, M. Role of interleukin 4 and its receptor in clinical presentation of chronic extrinsic allergic alveolitis: a pilot study. *Multidiscip. Respir. Med.* **8**, 35 (2013).
53. Sumida, A. *et al.* TH1/TH2 immune response in lung fibroblasts in interstitial lung disease. *Arch. Med. Res.* **39**, 503–10 (2008).
54. Andresen, E., Günther, G., Bullwinkel, J., Lange, C. & Heine, H. Increased expression of beta-defensin 1 (DEFB1) in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* **6**, e21898 (2011).
55. Young, H. A. *et al.* Differentiation of the t Helper Phenotypes by Analysis of the Methylation State of the IFN-g Gene. *J. Immunol.* 3603–3610 (1994).
56. 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).
57. Kwon, N.-H., Kim, J.-S., Lee, J.-Y., Oh, M.-J. & Choi, D.-C. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J. Clin. Immunol.* **28**, 139–46 (2008).
58. Jones, B. & Chen, J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J.* **25**, 2443–52 (2006).
59. Farrar, W. L., Ruscetti, F. W. & Howard, A. 5-azacytidine treatment of a murine cytotoxic t cell line alters interferon- $\gamma$  gene induction. **135**, 1551–1554 (1985).
60. Lee, P. P. *et al.* A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* **15**, 763–74 (2001).