



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DE CÉLULAS DEL  
EPITELIO ALVEOLAR EXPUESTAS A EXTRACTO DE HUMO  
DE CIGARRO :**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**JOSÉ ALFREDO LUIS JUÁREZ**

**ASESOR:**

**DR. MARCO ANTONIO CHECA CARATACHEA**

**COASESOR:**

**DR. MISAEL RUBÉN OLIVER GONZÁLEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

**Caracterización de exosomas de células del epitelio alveolar expuestas a extracto de humo de cigarro.**

Que presenta el pasante: **JOSÉ ALFREDO LUIS JUÁREZ**

Con número de cuenta: **41002143-5** para obtener el Título de: **Licenciado en Tecnología**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Diciembre de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Misael Rubén Oliver González	
<b>VOCAL</b>	Dr. Carlos Gerardo García Tovar	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Oscar Horacio Guillén Ayala	
<b>1er SUPLENTE</b>	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
<b>2do SUPLENTE</b>	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.  
(Art 127 REP)

IHM/yrf

## **Dedicatorias**

El presente trabajo es resultado del apoyo incondicional de mucha gente que ha estado conmigo todo este tiempo, entre aquellas personas están mis padres y mis hermanos Lázaro y Adán quienes me han dado mis estudios de licenciatura, a mis amigos Irán Robles y Ricardo Rodríguez quienes a lo largo de la licenciatura me apoyaron y motivaron a continuar en la misma, asimismo quiero agradecer también a la M.V.Z. Flor Olivia Martínez, la Dra. María Leonor Quintero y al Dr. Misael Rubén Oliver, profesores míos quienes sembraron en mí el gusto por la Biología Molecular, al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, específicamente a los doctores Víctor Ruiz a quien le estoy muy agradecido por abrir las puertas de la investigación para mí y por todo el apoyo que me brindó durante mi servicio social y a mi tutor el Dr. Marco Checa por toda la paciencia y apoyo que me ha brindado durante todo el proyecto y hasta el día de hoy.

Por último quiero agradecer a la UNAM por haberme formado y permitirme ser partícipe de éste nuevo proyecto llamado Tecnología.

A todos ellos les digo gracias.

## Índice

	Página
Índice de figuras .....	iii
Índice de tablas .....	iv
Glosario.....	v
Resumen.....	ix
Introducción	
i)    Fibrosis pulmonar idiopática (IPF) .....	1
ii)   Daño al epitelio alveolar .....	3
iii)  microARNs y fibrosis pulmonar idiopática .....	8
iv)   Exosomas .....	11
v)   Biogénesis de exosomas .....	13
Objetivos.....	15
Hipótesis.....	16
Justificación.....	16
Material y métodos.....	17
Resultados .....	20
Discusión.....	26
Conclusiones.....	28
Perspectivas.....	29
Referencias.....	30

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. Principales miembros de las vesículas extracelulares.....	11
Figura 2. Composición de un exosoma.....	12
Figura 3. Biogénesis de exosomas.....	14
Figura 4. Material utilizado para preparar el CSE .....	17
Figura 5. Western blot exosomas de células A549.....	20
Figura 6. Expresión de miR-21 de exosomas A549 CSE 2 días .....	24
Figura 7. Expresión de miR-21 de exosomas A549 CSE 4 días .....	24
Figura 8. Expresión de miR-21 de exosomas A549 CSE 6 días .....	25

## Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Principales microARNs encontrados en fibrosis .....	10
Tabla 2. Valores en ng/ $\mu$ l de la concentración del ARN total de exosomas derivados del medio de cultivo en 2, 4 y 6 días de estímulo con el CSE .....	21
Tabla 3. Valores de los ciclos de amplificación para la sonda HY3 .....	21
Tabla 4. Valores de los ciclos de amplificación para la sonda de miR-21 .....	22
Tabla 5. Valores de las diferencias de amplificación entre miR-21 y HY3 también conocido como $\Delta_{CT}$ .....	22
Tabla 6. Valores del cálculo a partir de la fórmula $2^{-\Delta_{CT}}$ .....	23
Tabla 7. Valores promedio obtenidos de la Tabla 6 mediante la fórmula $2^{-\Delta_{CT}}$ .....	23
Tabla 8. Desviación estándar obtenida a partir de los valores de la Tabla 6 .....	23

## Glosario

**Actina-F:** Filamentos de Actina. Conjunto de estructuras dinámicas que pueden aparecer y desaparecer en función de las necesidades de la célula. Algunas de sus funciones son: intervenir en la contracción muscular, fagocitosis, refuerzo de la membrana plasmática entre otras.

**ADNm:** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial, molécula circular, cerrada y de doble cadena, de aproximadamente 16.6 Kpb. A diferencia del ADN nuclear, no presenta intrones.

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero, copia del ácido desoxirribonucleico contenido en una sola cadena, es el código que habrá de traducirse a proteína.

**$\alpha$ -SMA:** Actina alfa de músculo liso, es específica para miofibroblastos y tumores derivados de éstas células.

**AT1R:** Receptor del tipo I de la angiotensina II. Es responsable de la mayoría de los efectos biológicos de la angiotensina en la regulación de la presión arterial, incluyendo contracción vascular, aumento de la contracción cardíaca y el aumento en la retención de sodio y agua a nivel renal.

**Bak:** Proteína pro-apoptótica miembro de la sub-familia Bax quien a su vez pertenece a la familia Bcl-2.

**Bax:** Bcl-2 associated X protein. Sub-familia de la proteína Bcl-2, proteína pro-apoptótica que participa en la ruta de apoptosis mitocondrial induciendo la liberación del citocromo C.

**Bcl-x:** Proteína anti-apoptótica

**Bcl-2:** Proteína involucrada en la muerte celular, crucial para el desarrollo, homeostasis celular y protección contra patógenos. Junto con otras moléculas similares promueven la supervivencia celular por inhibición de adaptadores necesarios para la activación de proteasas (caspasas). Bajo condiciones normales Bcl-2 disminuye cuando las células están maduras o tienen que ser eliminadas, mientras que se expresan aquéllas células que deben sobrevivir, como en células hematopoyéticas precursoras y células del sistema nervioso.



Por lo tanto las células que expresan Bcl-2 bloquean la apoptosis, promoviendo la supervivencia celular, facilitando la adquisición de mutaciones y la transformación maligna.

**Bim:** Proteína pro-apoptótica, esencial para la apoptosis inducida por privación de factores de crecimiento.

**CAV-1:** Caveolina 1, proteína implicada en procesos celulares como el tráfico de la membrana, la transducción de señales, el transporte de sustratos, endocitosis, supresión tumoral, señalización celular y la homeostasis lipídica, es requerida para la formación de las caveolas.

**CCL2:** También conocida como proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1), CCL2 es una quimiocina CC proinflamatoria, derivada de macrófagos y células endoteliales así como un potente factor quimiotáctico para monocitos actuando como una proteína precursora. CCL2 recluta monocitos, células T de memoria y las células dendríticas a los sitios de lesión de los tejidos e infección.

**CD95:** Proteína que junto a su ligando-CD95, se unen y actúan como activadores de apoptosis.

**CSE:** Extracto de humo de cigarro (por su abreviación en inglés ‘cigarette smoke extract’).

**CTGF:** Factor de crecimiento de tejido conectivo. Participa en la regulación del ciclo celular, adhesión, migración y angiogénesis. Es activado por el factor de angiotensina II, TGF- $\beta$ , altas concentraciones de glucosa y estrés celular. Es un factor profibrótico y está localizado en áreas de fibrosis.

**DNMT-1:** Enzima de metilación del ADN (ADN metiltransferasa). DNMT-1 está relacionado con la metilación y el mantenimiento que tiene lugar en cada ciclo de replicación para asegurar un patrón de metilación idéntico en ambas células hijas.

**DR4:** Proteína (receptora de muerte 4) expresada en la superficie de ciertas células que se une a otra proteína llamada TRAIL, capaz de destruir algunas células cancerosas, es miembro 10A de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral.

**DR5:** Proteína (receptora de muerte 5), miembro 10B de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral, con funciones similares a DR4.

**ECM:** Matriz extracelular. Constituye el medio que rodea a las células. Es un conjunto de proteínas estructurales tales como el colágeno. Participa en la cohesión y resistencia de los tejidos así como en la fisiología y diferenciación celular.

**EMT:** Transición epitelio-mesénquima. Proceso en el que las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades mesenquimales como pérdida de adhesión celular, aumento en la movilidad en invasividad, resistencia a apoptosis así como cambios morfológicos.

**ERK/MAPK:** Cinasas de regulación de la señalización extracelular/ proteínas cinasas de activación mitogénica. Cascada de señalización que es activada por una amplia variedad de receptores involucrados en el crecimiento y diferenciación, incluyendo cinasas receptoras de tirosinas (RTKs), integrinas y canales iónicos.

**ESCRT:** Complejo de ordenamiento endosomal requerido para el transporte. Maquinaria de ensamblamiento que funciona como una unidad que libera el contenido del cuerpo multivesicular hacia el citoplasma.

**FAS:** Molécula de superficie celular involucrada en funciones efectoras, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral que activa a caspasas para iniciar una vía apoptótica.

**HMG2:** Proteína del grupo de alta movilidad del gancho AT-2. Contiene dominios de unión al ADN estructural y puede actuar como un regulador transcripcional, también está involucrado en la diferenciación a mesénquima, es capaz de alterar la estructura del ADN y estimular el ensamblamiento de complejos proteicos que regulan la transcripción de genes. HMG2 es regulado por el microARN let-7.

**IFN- $\gamma$ :** Citosina que coordina programas celulares a través de la regulación transcripcional de genes inmunológicos involucrados con la respuesta de macrófagos a la infección.

**ILD:** Enfermedades pulmonares intersticiales. Grupo de desórdenes que causan cicatrización del tejido pulmonar, que eventualmente lleva a la pérdida de la capacidad pulmonar.

**ILV:** Vesícula intraluminal. Están contenidas dentro de los cuerpos multivesiculares, que después de ser secretadas son referidas como exosomas.

**IL-4:** Interleucina-4, citosina que induce la diferenciación de células T auxiliares, participa en la inmunidad humoral y adaptativa.

**IPF:** Fibrosis pulmonar idiopática. Enfermedad pulmonar de origen desconocido, que se caracteriza por presentar áreas de cicatrización (fibrosis) progresiva.

**KLF-4:** Factor parecido a Kruppel del tipo 4, involucrado en la proliferación, diferenciación y apoptosis, principalmente en células epiteliales. Contribuye a disminuir la transcripción del gen p53/TP53.

**miR:** microARN, segmento de ácido ribonucleico no codificante de longitud aproximada de 8-25 nucleótidos.

**MMP:** Metaloproteinasa de la matriz, contribuye a la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal durante el origen del tumor o cáncer y promueve a factores de crecimiento.

**MVB:** Cuerpo multivesicular, sistema endosomal que funciona como un organelo, caracterizado por la presencia de vesículas intraluminales.

**Noxa:** Conjunto de factores que provocan un daño.

**NOX4:** NAD(P)H oxidasa 4, agente de estrés oxidativo expresado principalmente en la mitocondria.

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas, regula el crecimiento y división celular así como la angiogénesis, es sintetizado principalmente por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, células gliales, astrocitos, mioblastos, células de músculo liso y plaquetas.

**PTEN/Akt:** Vía de señalización que incluye a P13K, es activada por diversos estímulos y controla aspectos claves como el crecimiento, proliferación, supervivencia, movilidad y metabolismo, donde la proteína homóloga de tensina y fosfatasa (PTEN) actúa como un supresor tumoral y su inactivación lleva a la sobreexpresión de P13K/Akt quienes están involucrados en diversos tipos de cáncer.

**P13K:** Fosfoinositol 3 cinasa, está involucrada en el crecimiento, migración, proliferación y supervivencia celular, así como en el tráfico extracelular, además de activar a Akt.

**RAC:** Pertenece a la familia de proteínas de unión a GTP relacionadas con el citoesqueleto, migración y proliferación celular.

**RAS:** Pertenece a la familia de proteínas de unión a GTP, regula el crecimiento celular mediante la proteína cinasa de serina/treonina (Akt).

**RNS:** Especies reactivas a nitrógeno, contribuyen a la generación y mantenimiento de la inflamación crónica, por medio de radicales libres llevando eventualmente a la fragmentación del ADN.

**ROS:** Especies reactivas a oxígeno, contribuyen a la generación y mantenimiento de la inflamación crónica, por medio de radicales libres llevando eventualmente a la fragmentación del ADN.

**Scr :** Proteín cinasa del tipo tirosina que participa en vías de transducción de señales que regula la división celular, movilidad, adhesión, angiogénesis y supervivencia celular.

**Smad:** Proteínas efectoras intracelulares, son las principales proteínas transductoras de la señalización del TGF- $\beta$ , así como genes blanco en el núcleo, se dividen en Smad activadora, mediadora común e inhibidora.

**Spry1:** Homólogo de Sprouty 1, puede funcionar como un antagonista en la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y negativamente en la organogénesis respiratoria.

**TAK1:** Proteín cinasa de la familia MILK, media la transducción de señales inducida por TGF- $\beta$  y la proteína morfogénica ósea (BMP) y controla funciones celulares como la regulación de la transcripción y apoptosis, entre otras.

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta, es sintetizado por muchos tipos celulares como linfocitos, macrófagos y células dendríticas, su expansión regula de manera autócrina o parácrina la diferenciación, proliferación así como su estado de activación.

**TIMP:** Inhibidor tisular de tejido de metaloproteinasa, participa en la regulación de las metaloproteinasas, además de modular la proteólisis de la matriz extracelular, en especial durante el remodelamiento tisular y en procesos inflamatorios.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa, es una citosina pro-inflamatoria que participa en la regulación de la proliferación celular y apoptosis, es secretado por células como monocitos, macrófagos, neutrófilos, NK y linfocitos T, astrocitos, microglías, miocitos y fibroblastos.

**TSG-101:** Proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101, componente del complejo ESCRT-1, regulador del tráfico vesicular y de la liberación de los cuerpos multivesiculares así como posiblemente en el crecimiento celular y diferenciación, es un regulador negativo de crecimiento y ayuda a la gemación de virus.

**TSPA6:** Vía de activación de supresión tumoral 6, está asociado con el miembro NIX proapoptótico de la familia Bcl-2, funcionando como un regulador negativo del ciclo celular en la fase G2/M, en el aumento de la susceptibilidad de las células a apoptosis.

**TSP1:** Trombospodina 1, es un inhibidor natural de la angiogénesis que limita la densidad de las capas de Vessel en el tejido e interrumpe el crecimiento tumoral, así como la movilización y crecimiento celular además de inhibir a factores de crecimiento como TGF- $\beta$ .

**UIP:** Neumonía intersticial usual, se refiere a un modelo morfológico de enfermedad pulmonar intersticial, con características de fibrosis.

**Wnt/ $\beta$ -catenina:** Vía que regula la pluripotencia de células madre y las decisiones en el destino celular durante el desarrollo. Ésta cascada integra señales a partir de otras vías como la del ácido retinoico, FGF, TGF- $\beta$  y BMP. La alteración en la señalización de Wnt a menudo resulta en desórdenes catastróficos como cáncer.

## Resumen

Hoy en día el número de investigaciones con exosomas está creciendo dado su participación en eventos de patogénesis en una enfermedad, además los exosomas contienen microARNs, ARNm, proteínas y ADNm, se han encontrado exosomas en enfermedades pulmonares como asma, cáncer e hipoxia, pero no en estudios de fibrosis IPF conocida también como UIP, se desconoce la causa de IPF, probablemente es debida a hábitos de tabaquismo ya que parte de los pacientes que la padecen han fumado por un largo tiempo y pocos años al dejar de hacerlo desarrollaron fibrosis. En IPF hay una alteración de los niveles de microARNs siendo miR-21 el principal microARN profibrótico.

El objetivo de éste trabajo fue recuperar exosomas de células epiteliales pulmonares (A549) estimuladas con CSE y obtener ARN exosomal, del cual por RT-PCR y PCR en tiempo real se midió la expresión de miR-21. Los resultados de éste trabajo muestran que el estímulo con CSE desde los dos días de estímulo promueve la producción incrementada de exosomas que contienen a miR-21, asimismo las gráficas obtenidas a partir de la PCR en tiempo real muestran que el estímulo con el CSE en especial al 10% muestra una tendencia vinculada con el tiempo y dosis de extracto. En IPF miR-21 está vinculado con la vía TGF- $\beta$ , participando en una vía de retroalimentación que contribuye con el daño epitelial, aún falta más investigación al respecto pero es probable que exosomas positivos a miR-21 sean una vía involucrada en la progresión de la IPF. Estos resultados pueden dar pie a investigación futura con exosomas orientados al área de fibrosis pulmonar.

## **Introducción**

### **i) Fibrosis pulmonar idiopática (IPF)**

IPF es el subtipo más común de las neumonías intersticiales, es una enfermedad crónica y progresiva de causa desconocida que principalmente ocurre en adultos mayores. Es el punto final de un grupo numeroso y heterogéneo de desórdenes conocidos como ILD, se caracteriza por una acumulación excesiva de ECM y un remodelamiento de la arquitectura pulmonar, consecuencia de disturbios tanto en proliferación como apoptosis mediados por fibroblastos y miofibroblastos, siendo los fibroblastos productores primarios de ECM, con una interacción entre células epiteliales y mesenquimales denominada EMT donde las células mesenquimales pulmonares se acoplan con células de epitelio alveolar lesionadas resultando en una acumulación de ECM y el remodelamiento de la arquitectura pulmonar, que poco a poco lleva a la disfunción progresiva del órgano con un intercambio gaseoso deteriorado y un volumen pulmonar restringido, además de fibrosis en el intersticio alveolar y finalmente un estado terminal que conduce a la muerte.<sup>1-6</sup>

El patrón anatomopatológico de la UIP es heterogéneo con áreas de fibrosis pulmonar que coexisten con focos de proliferación fibroblástica. Los focos de fibroblastos se localizan en el intersticio pulmonar, habitualmente en la frontera entre el tejido sano y el tejido pulmonar fibroso, se distingue por la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos así como la disminución de la apoptosis y un aumento en la respuesta a citosinas fibrogénicas, además de la acumulación anormal de moléculas de la matriz extracelular, especialmente de fibras colágenas. Los focos de fibroblastos, distribuidos ampliamente en el parénquima pulmonar, se comportan como pequeñas áreas de lesiones pulmonares agudas, migrando y proliferando contribuyendo así a la acumulación de moléculas de la matriz extracelular que dañan los alvéolos, como consecuencia en los depósitos intraluminales e intersticiales de tejido conectivo se produce un remodelado irregular o incorrecto de la arquitectura del pulmón. El remodelado observado en la matriz extracelular anormal en IPF en parte es por un desequilibrio entre algunos componentes de la familia de las metaloproteinasas (MMP) de la matriz tales como colagenasa 1 (MMP1) o las gelatinasas A y B (MMP2 y 9) así como inhibidores tisulares de MMP.<sup>7,8</sup>

En el desarrollo de IPF están implicadas muchas citosinas como IL-1, PDGF, TNF- $\alpha$  y particularmente el TGF- $\beta$ , además del estrés oxidativo, los radicales libres y la ruptura del equilibrio oxidantes/antioxidantes así como de la cascada de coagulación y la apoptosis.<sup>5,7, 9,10</sup>

El evento reconocido más temprano es el daño al epitelio pulmonar con la alveolitis subsecuente y la proliferación de fibroblastos que eventualmente lleva a fibrosis intersticial extensiva. Una variedad de factores de riesgo se han sugerido, incluyendo exposición a muchos factores exógenos, especialmente de madera, metálicos, cigarro y algunos fármacos terapéuticos.<sup>4</sup>

Durante la fase inicial del daño, células de epitelio alveolar activadas y células inflamatorias atraídas (macrófagos o neutrófilos) liberan potentes factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF o Wnt) que perpetúan el ciclo de la lesión, falta en la reparación y fibrosis. Particularmente TGF- $\beta$  está involucrado en la lesión y la apoptosis de células del epitelio alveolar así como en la activación, invasión y resistencia a apoptosis de fibroblastos y miofibroblastos. El foco fibroblástico ocurre en regiones subepiteliales de células del epitelio alveolar apoptóticas o hiperplásticas, sugiriendo que una lesión inicial a éstas células promueve un remodelamiento subsecuente de la unidad epitelio alveolar – mesenquimal.<sup>4</sup> Algunas citosinas involucradas con el daño al epitelio son IL-4, IFN- $\gamma$ , CCL-2, entre otras<sup>5</sup>.



## **ii) Daño al epitelio alveolar**

La superficie alveolar está constituida por células epiteliales alveolares tipo I y II (o neumocitos tipo I y II), el tipo II es más numeroso que el tipo I, ya que las células alveolares tipo I cubren el 90% de la superficie alveolar, dado su estructura larga y aplanada realizan el intercambio gaseoso. En el espacio alveolar están los macrófagos alveolares en forma de células libres, que se desplazan hasta los bronquios terminales a través del lumen de las vías respiratorias. Las células alveolares tipo II sintetizan y secretan el surfasante pulmonar quien activa la superficie alveolar y evita su colapso actuando como defensa inmunológica.<sup>4</sup>

Las células alveolares tipo II son progenitoras de la tipo I, por tanto son responsables de la reparación alveolar tras el daño celular epitelial. En condiciones normales, la reparación del epitelio alveolar se produce por proliferación de las células alveolares tipo II y su diferenciación a células alveolares tipo I, pero cualquier lesión epitelial, dependiendo de su severidad o frecuencia, puede inducir la activación celular, disfunción, necrosis o apoptosis, tales cambios inducen una respuesta inflamatoria local, incluyendo liberación de citosinas profibróticas de células residentes y no residentes (acción parácrina) o cambios hiperplásticos con expresión de marcadores mesenquimales en células del epitelio alveolar (acción autócrina). La dirección de ésta respuesta está mediada por el microentorno de la célula, en particular por la composición de la matriz extracelular quien rodea a las células del epitelio alveolar, del sistema inmunológico o fibroblastos adyacentes, que inducen la activación e hiperplasia en las células del epitelio alveolar. TGF- $\beta$  es el factor de crecimiento típico en la inducción de EMT en células de epitelio alveolar.<sup>3,4</sup>

En IPF las células alveolares tipo I y II son reemplazadas por fibroblastos que constituyen zonas de lesión epitelial y están asociados a la muerte de células alveolares que llevan a la migración de más fibroblastos a éstas zonas dentro del espacio alveolar aéreo y da lugar a la fibrosis intra-alveolar, por tanto en IPF hay una ausencia de la reepitelización adecuada con una conducta anormal en los fibroblastos.<sup>4</sup>

Los fenotipos de las células epiteliales alveolares alteradas, incluyendo a aquéllas producidas debido al aumento del estrés en el retículo endoplásmico, son capaces de promover la lesión en las células epiteliales alveolares así como una reparación anormal,

facilitando el desarrollo de fibrosis pulmonar, ello ha sugerido que las disfunciones o anomalías en el epitelio causa fibrosis subyacente denotándola como una ‘reprogramación’ siendo la lesión inicial el punto de partida que eventualmente lleva a la muerte celular y que también puede provocar respuestas profibróticas.<sup>2,9,10</sup>

Por consecuencia el daño crónico al epitelio alveolar es seguido por una reparación anormal del tejido y un deterioro de la estructura alveolar, con eventos patogénicos muy similares al cáncer, incluyendo cambios genéticos y epigenéticos, presentando una respuesta alterada a señales reguladoras, expresión anormal de microARNs y activación de vías de señalización específicas, así como una baja respuesta a tratamientos médicos y comunicación celular reducida.<sup>11</sup>

La apoptosis en IPF está caracterizada principalmente por:

- A. Mayor apoptosis en células epiteliales impidiendo la correcta reepitelización.
- B. Resistencia de fibroblastos a apoptosis y miofibroblastos que incrementan las lesiones fibróticas.
- C. Eliminación inadecuada de las células apoptóticas manteniendo el ambiente inflamatorio.<sup>10</sup>

La apoptosis puede ser desencadenada por las vías extrínseca o intrínseca.

La vía extrínseca es directa y promueve la activación de la cascada de las caspasas mediante receptores de muerte presentes en la membrana celular, siendo los miembros de la superfamilia de los receptores de TNF que incluyen a FAS, CD95, DR 4 y 5, donde la unión de los ligandos a sus receptores de muerte activará a la procaspasa 8 o 10 induciendo apoptosis celular con la activación final de las caspasas 3 a 7, la vía intrínseca inicia en la mitocondria y se activa por estrés celular, las señales intracelulares reducirán la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x e incrementa a otras pro-apoptóticas como Bak, Bax y Bim, liberando al citocromo C que activará la procaspasa 8 y 9 que lleva a la muerte celular convergiendo con la vía extrínseca.<sup>12</sup>

Posteriormente en el proceso de EMT las células epiteliales sufren una transición fenotípica a células móviles mesenquimales totalmente diferenciadas tales como fibroblastos y miofibroblastos. Durante el proceso de EMT las células mesenquimales generan ECM en

el pulmón además la pérdida de la polaridad celular e inducción de MMPs de la matriz que promueven la degradación de la membrana basal y la separación de la célula así como cambios en su citoesqueleto.<sup>11</sup>

Alrededor del 20% de los fibroblastos se derivan del epitelio por medio de EMT. Las células que sufren EMT expresan marcadores típicos de miofibroblastos como la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y adquieren capacidad de migración. La transición de células epiteliales a mesenquimales es debido a que tanto TGF- $\beta$  como especies reactivas a oxígeno (ROS) pueden inducir la expresión de marcadores mesenquimales en las células alveolares, que da lugar a la transición de la célula alveolar a un fenotipo miofibroblástico.<sup>10,12</sup>

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre la generación de ROS y la capacidad para detoxificar a éstos intermediarios, cuando la generación de ROS es excesiva las defensas antioxidantes son reducidas. ROS puede actuar activando diferentes vías moleculares. En cultivos celulares expuestos a ROS se observa activación de apoptosis por vía intrínseca. Exposición a ROS puede activar la vía de las cinasas por activación de apoptosis por la vía extrínseca. La fuente de ROS en pulmón se asocia a células inflamatorias, tanto células parenquimatosas como miofibroblastos son fuente de radicales que aumentará la apoptosis en células alveolares.<sup>12</sup>

ROS son conocidos como agentes de lesión en células de epitelio pulmonar y fibroblastos, la generación de ROS en fibroblastos vía NOX4, puede inducir y mediar la fibrosis. La expresión de NOX4 está incrementada en regiones fibróticas de secciones pulmonares en IPF, asimismo TGF- $\beta$  induce la expresión de NOX4 mediante la señalización canónica de Smad. TGF- $\beta$  también necesita la producción de ROS para inducir la activación de miofibroblastos, producción de matriz extracelular y la contractibilidad, promoviendo así EMT.<sup>3</sup>

El humo de cigarro contiene y genera ROS, así como RNS, tales como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos y peroxinitrilos. El humo de cigarro es capaz de activar las células alveolares y bronquiales para provocar respuestas inflamatorias, además provoca un daño oxidativo en células del epitelio alveolar. En experimentos *in vitro* con células alveolares tipo I y II de la línea A549 se ha notado que el humo de cigarro promueve niveles intracelulares de ROS causando la detención del crecimiento celular, la separación celular, lisis e incremento de la permeabilidad epitelial. Se sospecha que los efectos tóxicos o estimulantes en células del epitelio pulmonar, es probablemente en función de la magnitud de la exposición al humo de cigarro, el estatus celular y los niveles de antioxidantes de las células. De éste modo el cigarro promueve EMT en células alveolares de pulmón que contribuye a mutaciones en genes de control de división, proliferación y crecimiento celular además de alteraciones en los niveles de microARNs.<sup>13,14,15,16,17</sup>

EMT debido a humo de cigarro en células epiteliales pulmonares humanas (H358), lleva a un descenso en proteínas epiteliales tales como E-cadherina e incrementa marcadores mesenquimales tales como N-cadherina y vimentina.<sup>18</sup>

Investigaciones sugieren que el tabaquismo puede ocasionar EMT por medio de una vía oxidativa donde la Src cinasa juega un importante papel ya que está involucrada en la reorganización del citoesqueleto, la capacidad migratoria de la célula, la expresión de proteínas mesenquimales y otros eventos de EMT, ya que la activación de Src es dependiente de estímulos óxido-reducción, en éste caso por la vía oxidativa debida al humo de cigarro.<sup>18</sup>

Por lo tanto el humo de cigarro por medio de un estrés oxidativo mediado principalmente por los ROS inicia la apoptosis en células del epitelio aéreo A549 como resultado hay un daño mitocondrial, la detención del ciclo celular en la fase G1/S y esto resulta en un decaimiento celular y la apoptosis. Éste efecto parece resultar de factores en el humo de cigarro como la nicotina así como radicales libres, pero también debido a un efecto dependiente de la dosis-tiempo, ya que una exposición al 5% induce apoptosis y al 10% lleva a necrosis.<sup>18-20</sup>

Se ha visto que en células A549 el CSE induce la expresión tanto del ARNm como la proteína de p21<sup>WAF1</sup>, sugiriendo que éste puede ser un posible mecanismo por el cual el CSE induce la detención de la proliferación celular.<sup>21</sup>

Además en estudios con células tumorales gástricas la nicotina presente en los CSE es capaz de inducir EMT por medio de una vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, asimismo aumenta a miR-21 mediante una vía dependiente del TGF- $\beta$ , suponiendo que miR-21 podría estar empaquetado en vesículas extracelulares, de este modo se traslada a otras células y promueve el daño celular.<sup>22, 23</sup>

TGF-  $\beta$  controla la diferenciación celular, apoptosis y producción de ECM. Sus efectos en la ECM incluyen supresión de proteasas degradadoras de la matriz (MMP) e induce la expresión de inhibidores de proteasas (TIMP) y la regulación de expresión de integrinas.<sup>23</sup>

La síntesis del TGF-  $\beta$  latente se puede incrementar por mediadores proinflamatorios tales como TNF- $\alpha$  pero además puede ser tomado como una molécula inactiva, la cual es almacenada en la matriz extracelular y que necesita ser activada antes de ejecutar un efecto biológico.<sup>23</sup>

Se ha evidenciado la participación de las proteínas Smad en la vía de transducción inducida por TGF- $\beta$ . Éstas proteínas tienen funciones inhibitoras y activadoras que median los efectos biológicos del TGF-  $\beta$ 1. Las Smad2, 3 y 4 son activadas después de la inducción de los receptores T $\beta$ RI y II. Una vez fosforiladas las Smads 2 y 3 forman un complejo estable con la Smad4, que funciona como un punto de convergencia para las vías de señalización inducidas por los diferentes miembros de la superfamilia del TGF-  $\beta$ . El complejo activo formado por las Smads 2,3 y 4 se traslada al núcleo donde funciona como activador transcripcional regulando a genes que responden a TGF-  $\beta$ 1.<sup>24</sup>

TGF- $\beta$  es capaz de activar otras vías de transducción, paralelamente a Smad, como la vía clásica de las MAPKs y P13K, entre otras. TGF- $\beta$  activa a TAK-1, una cinasa de residuos de serina y treonina, que pertenece a la familia de las MAP cinasas. Además RAC y RAS miembros de la familia de GTPasas monoméricas también implicadas en la señalización del TGF- $\beta$ .<sup>25</sup>

En modelos de ratón se ha observado que TGF- $\beta$  induce fibrosis intersticial pronunciada mediada por un exceso de ECM generada y con presencia de miofibroblastos.<sup>10,26,27,28.</sup>

TGF- $\beta$  activa a microARNs mediante un ciclo de retroalimentación positiva especialmente para miR-21, ya que miR-21 es aumentado por TGF- $\beta$ , el cual vuelve a inhibir a Smad7 (un Smad inhibidor), y lleva a la amplificación de la señalización de TGF- $\beta$ , resultando en una respuesta fibrótica, promoviendo EMT vía dependiente de PTEN/Akt. miR-21 actúa sobre PTEN quien en condiciones normales lleva a la degradación de ECM así como Smad7 quien se encarga de inhibir la síntesis de ECM.<sup>29</sup>

En fibrosis renal, miR-21 aumenta la expresión de proteínas profibróticas como colágena 1A1, 1A2, fibronectina,  $\alpha$ -SMA y PAI-1, Smad7 podría proteger los riñones de fibrosis regulando la expresión del TGF- $\beta$ /Smad de miR-21,<sup>192, 29b.</sup><sup>29, 30</sup>

### **iii) microARNs y fibrosis pulmonar idiopática**

Los microARN se pueden localizar en intrones o exones de genes no codificantes de proteínas, o en sectores no codificantes del genoma. Tras la exposición a una noxa diversos procesos celulares y mediadores intervienen antes de que la enfermedad se manifieste. En éste sentido los microARN participan en el desarrollo y la progresión de las patologías pulmonares.<sup>31,32</sup>

Los microARN son fundamentalmente represores de la expresión génica a nivel postranscripcional, mediante la degradación del ARN mensajero (ARNm) o la inhibición de su traducción proteica. El grado de complementariedad entre ellos parece ser uno de los determinantes del mecanismo de represión: degradación del ARNm si la misma es casi perfecta, o inhibición de la traducción cuando la complementariedad es menor.<sup>32</sup>

Aproximadamente 10% de los microARNs están significativamente diferenciados en IPF, de los cuales se han notado 46 microARNs de pacientes con IPF comparados con sujetos control. Entre ellos están miembros de let-7d, miR-29, miR-30 y la familia de los miR-17~92, mientras que algunos microARNs sobre-expresados son miR-21 y miR-155.<sup>32</sup>

Se destaca la disminución de let-7d (cuyos niveles en el epitelio alveolar se correlacionan con la capacidad vital forzada) reprimida por TGF- $\beta$  con un incremento de HMGA2, que junto con TGF- $\beta$  están implicados en el desarrollo de EMT, pero además la represión de let-7d podría generar la sobre-expresión del factor de crecimiento similar a la insulina-1 y su receptor.<sup>32</sup>

En fibroblastos y miofibroblastos miR-21 está sobre-expresado, es inducido por TGF- $\beta$  y reprime a Smad7, promoviendo la activación de fibroblastos mediada por TGF- $\beta$ , participando en un circuito de retroalimentación positiva para TGF- $\beta$ .<sup>32</sup>

Se ha reportado que la expresión de miR-200 (a y c) está disminuida, mientras que en un modelo animal lo están miR200a, b y c. miR-200 es capaz de inhibir EMT inducida por TGF- $\beta$  en células de epitelio alveolar. TGF- $\beta$  regula negativamente la expresión de miR-200. Se ha demostrado que el tratamiento con miR-200 y el silenciamiento de miR-21 reduce la fibrosis en ratones.<sup>32</sup>

En modelos de ratón para fibrosis y en IPF miR-29 está reducido, modificando la expresión de diversos genes asociados a la matriz extracelular, la inhibición de miR-29 parece estar mediada por TGF- $\beta$ .<sup>32</sup>

En IPF miR-155 está elevado, actúa reprimiendo al factor de crecimiento de queratinocitos en fibroblastos e incrementa la migración de los mismos, pero también sobre la vía del TGF- $\beta$ .<sup>33</sup>

Tres familias de microARNs, miR-21, miR-200 y miR-29 son regulados por TGF- $\beta$  y han mostrado modular no sólo fibrosis renal sino que muy probablemente IPF, promoviendo la proliferación de fibroblastos, inhibiendo la EMT y previniendo el depósito y remodelamiento de ECM respectivamente.<sup>33</sup>

En condiciones normales miR-21 se limita a la reparación del tejido, pero la sobre-expresión perturba la reparación del tejido y contribuye a la fibrosis del mismo. miR-200 bajo condiciones normales funciona en el mantenimiento de la diferenciación epitelial. miR-29 funciona como un supresor tumoral y promueve senescencia celular y diferenciación, pero su mayor participación está en la prevención de fibrosis en el tejido.<sup>34</sup>

A continuación en la tabla 1 se describen los principales microARN encontrados en IPF.

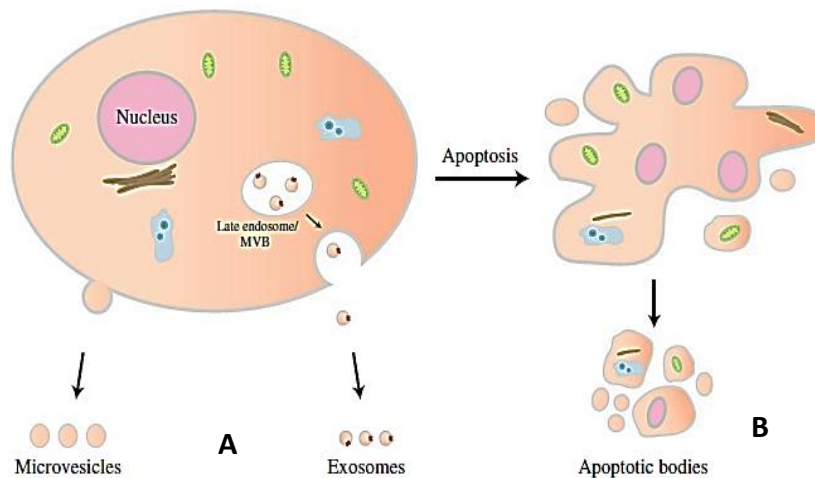
Tabla 1. Principales microARNs encontrados en Fibrosis.<sup>34-38</sup>

MicroARN	Efecto	Función
Let-7d	Antifibrótico	Blanco para disminuir cadherina-2, disminuye a vimentina, $\alpha$ -SMA, HMGA2 en células epiteliales. Relacionado con la capacidad vital forzada. Disminuye EMT.
miR-17~92	Antifibrótico	Negativamente regula a DNMT-1 y la metilación del ADN/ disminuye a CTGF y TSP-1
miR-21	Profibrótico	Blanco para la vía inhibidora de Smad7, aumenta a TGF- $\beta$ por la vía canónica (Smad7, se une a Smad 2 y 3) y no canónica (Spry1 se une a ERK/MAPK), activa a fibroblastos.
miR-29a/b/c	Antifibrótico	Regula negativamente a TGF- $\beta$ , CTGF y Smad3/controla la síntesis de ECM.
miR-155	Profibrótico	Activa a AT1R, aumenta la síntesis de colágena, migración de fibroblastos, contribuye a EMT.
miR-145	Profibrótico	Incrementa a $\alpha$ -SMA blanco para KLF-4
miR-199a-5p	Profibrótico	Regula a CAV-1
miR-15b, miR-16	Antifibrótico	Incrementa la apoptosis
miR-23a(agrupado con miR-27a)	Profibrótico	Incrementa EMT
miR-26a/b	Antifibrótico	Mecanismo de acción desconocido.
miR-30c	Antifibrótico	Disminuye la señalización de CTGF
miR-338	Profibrótico	Proliferación de fibroblastos



#### iv) Exosomas

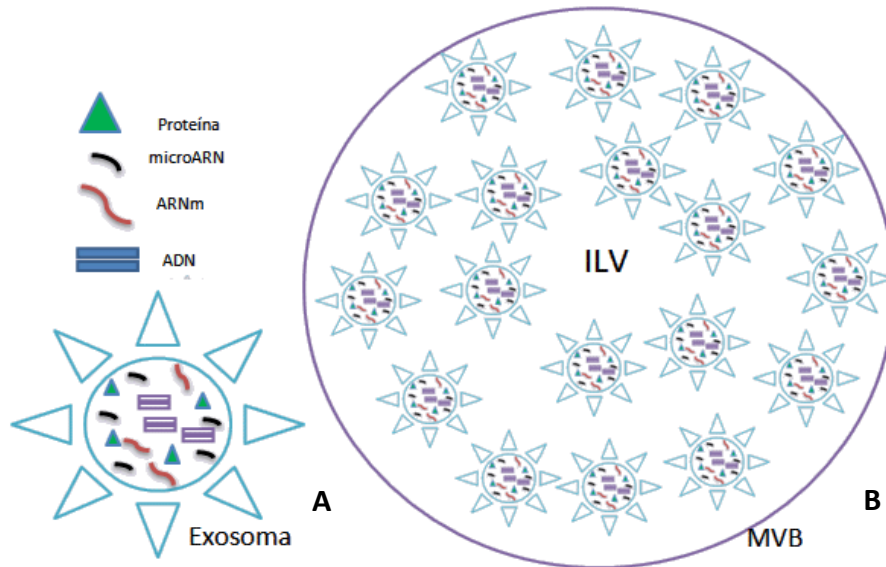
Los exosomas son un tipo de nanovesículas que participan en la comunicación celular. Los exosomas tienen un tamaño de aproximadamente 30-100 nm de diámetro. Los exosomas actúan como vehículos de transporte para la comunicación y señalización celular, uno de los principales agentes contenidos son los microARNs que pueden potenciar o apagar la traducción del ARNm. Los organismos eucariontes poseen diversas variantes exosomales debido a que provee una vía en que la célula controla la concentración de ARN en un compartimiento subcelular dado, mientras que al mismo tiempo lleva a cabo funciones catalíticas requeridas.<sup>39,40</sup>



**Figura 1. Principales miembros de las vesículas extracelulares.**

(A) microvesículas y exosomas. (B) cuerpos apoptóticos.<sup>43</sup>

Los exosomas están presentes en la mayor parte de los fluidos corporales, y su composición difiere dependiendo de su origen celular, pudiendo transferir material genético a las células vecinas, afectando su función. Un simple microARN puede regular un gran número ARNm con efectos aditivos o sinérgicos. Se ha sugerido que un exosoma podría contener al menos 500 microARN, además una célula es capaz de producir de 10,000 a 30,000 exosomas/día.<sup>41</sup>



**Figura 2. Composición de un exosoma.**

(A) se esquematizan los principales componentes: microARN, proteína, ARNm y ADN mitocondrial. (B) se muestran exosomas contenidos como vesículas intraluminales (ILV) dentro de cuerpos multivesiculares (MVBs).

La producción en masa de exosomas está regulada por la activación de la proteína p53 ligada a la expresión del gen de la proteína de la vía activada por supresión tumoral 6 (TSAP6), donde p53 actúa como un factor de transcripción que potencia o reprime la transcripción de genes, con cambios en el programa celular y con ello la detención del ciclo celular, senescencia, apoptosis, promueve factores de crecimiento, inhibe proteasas y modifica la matriz extracelular, bloquea la angiogénesis y la migración celular, además de factores supresivos tumorales a partir de células dañadas que pueden influenciar el comportamiento de células vecinas, vía exosomas.<sup>42</sup>

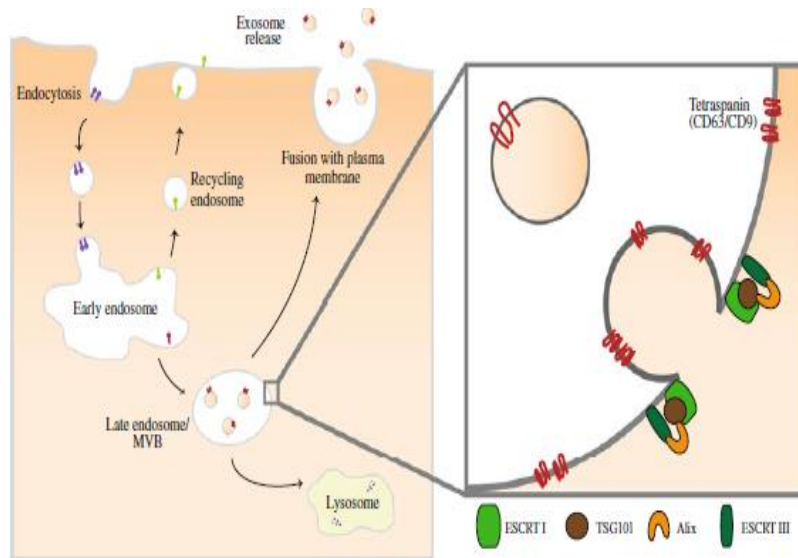
En exosomas se ha revelado la presencia de numerosas proteínas incluyendo CD9, CD63, CD81, CD82, proteína de golpe de calor 70 y 90 (HSP70 y 90) y GAPDH asociadas principalmente a exosomas.<sup>42,43</sup>

## v) **Biogénesis de exosomas**

Los endosomas tardíos participan en la formación de cuerpos multivesiculares resultando en un continuo enriquecimiento de vesículas internas lumbales.

Durante la maduración de los endosomas tardíos, las membranas limitantes de los endosomas comienzan a gemar hacia dentro resultando en la formación de vesículas intraluminales (ILV) de aproximadamente 100 nm, estos endosomas son conocidos como cuerpos multivesiculares (MVB), los cuales se fusionan con la superficie de la célula de manera exocítica: parte de los endosomas tardíos de su membrana limitante dentro del lumen forman ILVs originando un tipo particular de endosoma que acumula cientos de ILV y termina como MVB, cuya generación es a través de un complejo de ordenamiento endosomal requerido para el transporte (ESCRT), que consiste de 4 complejos multiproteicos solubles, llamados ESCRT-0, I, II y III.

El ESCRT reconoce a las cargas ubiquitinadas vía Vps-27, que se une a otro complejo ESCRT y TSG-101, el cual activa AIP/alix, todo esto lleva a las cargas dentro de las vesículas para gemación. El proceso de liberación de exosomas requiere de la maquinaria endocítica incluyendo a las RabGTPasas 11, 27a y b, proteínas reguladoras del citoesqueleto, motores moleculares tales como miosinas y SNAREs [receptor SNAP (unión soluble de proteína NSF)] para una fusión dirigida. Por lo tanto, tras su liberación los exosomas empiezan a actuar alterando las funciones celulares como por ejemplo, exosomas de células madre mesenquimales contribuyen a la reparación del tejido pero en pulmón las modifican para promover la diferenciación de células del epitelio pulmonar.<sup>40,41,42,44,45</sup>



**Figura 3. Biogénesis de exosomas.**

Los exosomas son formados dentro de la red endosomal (recuadro de la izquierda). Los endosomas tempranos se fusionan con vesículas endocíticas e incorporan su contenido dentro de aquéllas destinadas al reciclaje, degradación o exocitosis. Los endosomas tardíos o MVBs se desarrollan en los endosomas tempranos y son caracterizados mediante la presencia de múltiples pequeñas ILV. Los exosomas son liberados de los compartimientos endosomales por medio de la fusión de los MVBs con la membrana plasmática (recuadro de la derecha). Un paso clave en la formación de las ILV es la reorganización de las proteínas de la membrana endosomal tales como CD9 y CD63 dentro de los microdominios enriquecidos con tetraspaninas. Una serie de complejos de liberación endosomal (ESCRT) son llevados al sitio de gemación, con ayuda de la proteína alix.<sup>44</sup>

En pulmón, los exosomas participan promoviendo la proliferación, expresión de  $\alpha$ -SMA, expresión de actina-F y producción de colágeno tipo I, además de activación de fibroblastos dependientes de exosomas con ARNm del TGF- $\beta$ <sup>45</sup>, que constituye una rápida respuesta de reparación y activación de fibroblastos.<sup>42</sup>

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

- Analizar la respuesta de células del epitelio alveolar expuestas a estímulos agudos con extracto de humo de cigarro (CSE), en base a la caracterización de exosomas y la presencia de miR-21 contenido en ellos.

### **Objetivos particulares**

- A. Identificar la presencia de exosomas mediante la técnica de Western blot.
- B. Analizar la expresión de miR-21 (microARN profibrótico sobre-expresado en células epiteliales expuestas a nicotina) empleando la técnica de PCR en tiempo real.

## **Hipótesis**

El daño provocado por el humo de cigarro en células del epitelio alveolar desencadena la producción incrementada de exosomas que contienen principalmente microARNs siendo uno de ellos miR-21 quien es un microARN profibrótico, tales exosomas son secretados por células del epitelio alveolar como una señal de un daño temprano, trasladándose y asociándose con otras células vecinas alterando su funcionamiento normal y de este modo las células contribuyen a un ciclo incrementado de exosomas, quienes amplifican más el daño provocado por el humo de cigarro debido a una transferencia de microARNs como lo es miR-21.

## **Justificación**

El tabaquismo es uno de los factores de riesgo para IPF, ya que el humo del cigarro es capaz de provocar un daño al epitelio alveolar dado que altera los niveles de microARNs y por otro lado la asociación de exosomas en la comunicación celular, debido a que su contenido puede alterar el funcionamiento de las células. Tomando lo anterior, nuestro trabajo está orientado hacia el vínculo de exosomas que contienen miR-21 para la presentación de IPF. No existen reportes al respecto enfocados a fibrosis pulmonar con la participación de exosomas y microARNs, sólo hay trabajos relacionados con este tópico en enfermedades pulmonares como asma y cáncer, otros con fibrosis renal y cardiaca, sin embargo estos trabajos por un lado han estudiado la presencia de exosomas y por otro la expresión de miR-21. Para poder analizar la presencia de exosomas con miR-21 en la patogenia de IPF, es necesario contar con un modelo *in vitro* para estudiar el efecto que tiene el humo de tabaco sobre la expresión de los exosomas, en particular aquellos que contengan miR-21, por su papel profibrótico. De ahí que los resultados del presente trabajo serán relevantes, ya que podrán constituir uno de los primeros antecedentes de un microARN profibrótico contenido en exosomas para un modelo de fibrosis pulmonar con antecedentes de tabaquismo y que podría marcar el principio de un posible biomarcador, o en su defecto una pauta para continuar investigando sobre otras líneas celulares *in vitro* o modelos animales.

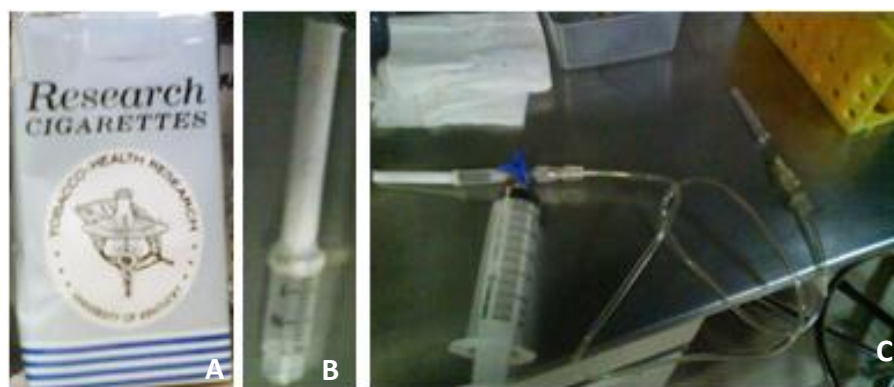
## Materiales y métodos

### Cultivo celular

Para realizar éste trabajo se utilizaron células de epitelio pulmonar A549 (células de carcinoma de pulmón, ATCC® CCL-185™). Las células fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) con 10% de suero fetal bovino, en una incubadora a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>; cuando las células llegaron a una confluencia del 90% se dividieron a 3 cajas y posteriormente cuando alcanzaron el 90% esas tres cajas se dividieron a otras 3, formando 3 grupos: el grupo 1 fue el grupo control sin tratamiento con CSE, el grupo 2 se trató con CSE al 5% y el grupo 3 con CSE al 10%.

### Extracto de humo de cigarro (CSE)

Para preparar el CSE, se utilizó una llave de 4 vías conectada en un costado a una jeringa de 60 ml para aspirar el humo de cigarro, en un extremo se colocó el cigarro habiendo quitado el filtro previamente (cigarro de referencia 3R4F Univ. de Kentucky) unido con una jeringa de 3ml (previamente cortada a la mitad) y en el otro extremo la llave iba conectada a una aguja que estuvo dentro de un tubo falcon de 25 ml con medio de cultivo DMEM sin suero fetal bovino, sellado con parafilm para evitar que se escapara el humo de cigarro (Figura 4).



**Figura 4. Material utilizado para preparar el CSE.** (A) cigarro de referencia (3R4F, Univ. de Kentucky), (B) cigarro conectado a una jeringa de 3ml y (C) conexión de la llave de 4 vías a cada uno de los elementos.

Después de consumirse el cigarro se tomó el tubo falcon y se vació el medio a un vaso de precipitados y se ajustó el pH a 7.2, posteriormente se filtró el CSE con un acrodisco de 0.2  $\mu\text{m}$  y se alicuotó en tubos eppendorf de 2.0 ml, guardándolo en ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  por un plazo no mayor a 1 mes.

### **Estímulo**

Las células fueron estimuladas con el CSE a concentraciones del 5% y del 10% cada 2 días (y hasta llegar al día 6), con respecto a un volumen final de 7.5 ml, en éste punto las células fueron condicionadas sin suero fetal bovino y la línea control no llevó estímulo con CSE.

### **Recuperación de exosomas**

Después de haber recuperado el medio de cultivo se centrifugó a 3,220 xg por 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$  sin freno para deshacerse de las células y los detritos celulares, posteriormente el sobrenadante se filtró con acrodisco de 0.2  $\mu\text{m}$ , enseguida se agregaron 0.5 volúmenes de Total Exosome Isolation (Cat. No.: 4478359) al medio recuperado y filtrado, se resuspendió y guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 40,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 2 horas sin freno, se descartó el sobrenadante, en éste paso para la extracción de proteínas se agregó buffer de lisis RIPA a la pastilla de exosomas, mientras que para precipitar del ARN se usó el kit miRCURY™ RNA Isolation Kit– Cell & Plant (Cat. No. #300110).

### **Cuantificación de proteínas:**

Para la cuantificación de proteína se usó el protocolo Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Cat. No. 23225/23227) y la lectura fue realizada en un lector de placas de ELISA a una absorbancia de 462 nm.

### **Western Blot**

Se corrió una electroforesis en un gel PAGE SDS 8%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y para detectar la proteína se usó el anticuerpo primario HPRT anti-CD9 de conejo [SBI Cat. EXOAB, EXORAY, EXOEL series] a una dilución 1:1000 en TBS-T con leche al 5% y el anticuerpo secundario anti-conejo HPRT [SBI Cat. EXOAB, EXORAY,



EXOEL series] a una dilución 1:20,000 en TBS-T con leche al 5%, para el revelado se usó 1 ml de solución SuperSignal West Fempto Chemi-luminescent Substrate (THERMO Cat.No. 34095) y se observó en un fotodocumentador (BioRad ChemiDoc MP).

### RT-PCR-microARN

Se realizó la extracción del ARN total, se analizó su concentración, pureza e integridad. Posteriormente se tomó una pequeña muestra (1 µl) y se llevó a una concentración de 10 ng/µl. Se corrió la RT-PCR con un endógeno constitutivo (HY3) y otro para detectar miR-21. La RT-PCR se corrió bajo las siguientes condiciones:

30'	30'	5'	∞
16°C	42°C	85°C	4°C

### PCR en tiempo real

Después de haber obtenido el ADNc con la RT-PCR, se realizó la PCR en tiempo real en un termociclador (Thermal cycler STEPONE™ Applied Biosystems), usando los fluoróforos (sondas) HY3 y miR-21 por separado y las muestras por triplicado. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

50°C	95°C	95°C 60°C
2'	10''	15'' 1'
		50X
Alineamiento	Desnaturalización	Amplificación

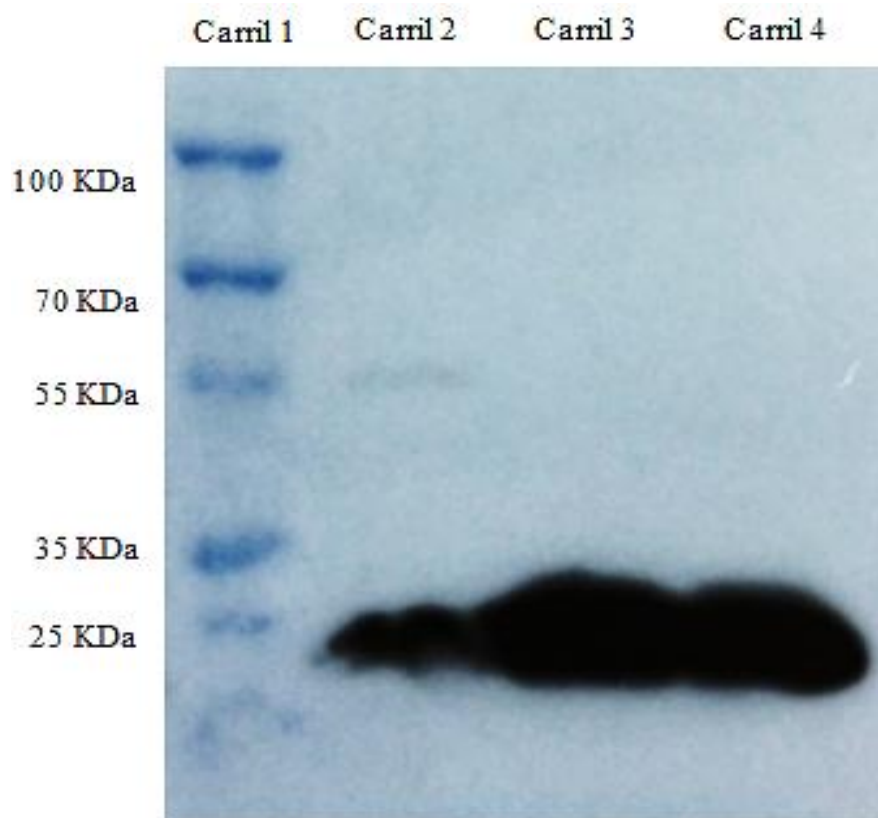
El tiempo de amplificación fue de alrededor de 1 hora 40 minutos, el archivo de salida fue exportado a Excel para el análisis posterior usando la fórmula  $2^{-\Delta CT}$ .

## Resultados

### Cuantificación de proteínas y Western blot

Se realizó la cuantificación de las proteínas y se ajustó a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para cada muestra a analizar.

En la figura 5 se presentan los resultados del Western blot realizado a partir de las proteínas obtenidas de exosomas provenientes de células control y estimuladas con CSE, cabe destacar que este ensayo se repitió al menos unas 6 veces obteniéndose el mismo resultado en cada una de ellas, se utilizó CD9 (28 KDa ) como marcador de exosomas. Como puede observarse, el estímulo con humo de cigarro aumenta la producción de exosomas (muestras tratadas con CSE al 5 y al 10%).



**Figura 5 Western blot exosomas de células A549.**

Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. Exosomas de células sin tratar con CSE. Carril 3. Exosomas de células tratadas con CSE 5%. Carril 4. Exosomas de células tratadas con CSE 10%.

**Concentración de ARN de exosomas:** Después de haber precipitado el ARN total de exosomas provenientes de las células A549 con el kit antes mencionado, se obtuvieron las concentraciones (Tabla 2).

Muestra 2 días estímulo	Concentración (ng/μl)	Muestra 4 días estímulo	Concentración (ng/μl)	Muestra 6 días estímulo	Concentración (ng/μl)
Ctrl	56.3	Ctrl	139.3	Ctrl	156
CSE 5%	90.3	CSE 5%	113	CSE 5%	50.2
CSE 10%	104.5	CSE 10%	77.7	CSE 10%	36.7

Tabla 2. Valores en ng/μl de la concentración del ARN total de exosomas derivados del medio de cultivo en 2, 4 y 6 días de estímulo con el CSE.

### **Análisis de expresión de miR-21**

El método usado fue  $2^{-\Delta CT}$ , el cual permite analizar los cambios relativos en la expresión de determinados genes en experimentos por PCR en tiempo real, para ello necesitamos el archivo exportado a Excel ya que contiene los ciclos de amplificación para ambas sondas (HY3 y miR-21).

En la Tabla 3 se muestran los valores de los ciclos de amplificación para la sonda HY3 usada como constitutivo en la PCR a tiempo real.

HY3 2 días			HY3 4 días			HY3 6 días		
Ctrl	CSE 5%	CSE 10%	Ctrl	CSE 5%	CSE 10%	Ctrl	CSE 5%	CSE 10%
34.7510529	38.4290352	39.2532463	35.0920029	38.9249687	38.4913902	28.342823	37.0793076	38.0617027
34.9617844	39.316452	40.3022575	35.7733803	39.310894	38.7063293	28.5802612	37.1111069	38.6394119
35.6082687	40.1349754	41.7697487	35.7970123	39.6667404	39.7505836	28.9697552	38.5361099	36.8541946

Tabla 3. Valores de los ciclos de amplificación para la sonda HY3.

En la Tabla 4 se muestran los valores de los ciclos de amplificación para la sonda miR-21 en la PCR a tiempo real.

miR-21 2 días			miR-21 4 días			miR-21 6 días		
Ctrl	CSE 5%	CSE 10%	Ctrl	CSE 5%	CSE 10%	Ctrl	CSE 5%	CSE 10%
28.5961666	30.963398	26.2163372	24.1606464	25.2498093	24.3742962	23.6075668	25.3425522	23.3649101
28.8000336	31.1181355	26.2798214	24.259594	25.7104816	24.6881714	23.7769756	25.4272213	23.4666939
28.8061085	31.1535091	26.3426113	24.9192886	25.7628822	24.7201614	23.9556637	25.4848137	23.5532646

Tabla 4. Valores de los ciclos de amplificación para la sonda de miR-21, cabe destacar que cada ciclo también es conocido como CT.

Una vez que se tuvieron los valores de los ciclos de amplificación tanto para el gen constitutivo como para el microARN, se procedió a hacer la resta del ciclo de amplificación de cada columna de miR-21 contra cada columna de HY3, el resultado fue un valor negativo. A este paso se le conoce como  $\Delta$ ct (Tabla 5).

$\Delta$ ct miR-21 2 días			$\Delta$ ct miR-21 4 días			$\Delta$ ct miR-21 6 días		
Ctrl	CSE 5%	CSE 10%	Ctrl	CSE 5%	CSE 10%	Ctrl	CSE 5%	CSE 10%
-6.15488625	-7.46563721	-13.0369091	-10.9313564	-13.6751595	-14.117094	-4.7352562	-11.7367554	-14.6967926
-6.16175079	-8.19831657	-14.0224361	-11.5137863	-13.6004124	-14.018158	-4.8032856	-11.6838856	-15.172718
-6.80216026	-8.98146629	-15.4271374	-10.8777237	-13.9038582	-15.030422	-5.0140914	-13.0512962	-13.30093

Tabla 5. Valores de las diferencias de amplificación entre miR-21 y HY3 también conocido como  $\Delta$ ct.

Los resultados obtenidos mostrados en la Tabla 5, se les aplicó la fórmula  $2^{-\Delta ct}$  (es decir cada uno de los valores negativos constituye la parte  $\Delta ct$ ), los valores se muestran a continuación en la Tabla 6:

miR-21 2 días			miR-21 4 días			miR-21 6 días		
Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%	Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%	Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%
71.2533651	176.758674	8404.28344	1952.83783	13080.7664	17769.2361	26.635089	3412.83599	26556.7799
71.5932066	293.723844	16640.7881	1881.57319	12420.2997	16591.5144	27.9211334	3290.03126	36935.4376

Tabla 6. Valores del cálculo a partir de la fórmula de  $2^{-\Delta ct}$  (usando los valores referidos en la Tabla 5).

Posteriormente se obtuvo el promedio de los valores indicados en la Tabla 6 y se presentan en la Tabla 7.

miR-21 2 días			miR-21 4 días			miR-21 6 días		
Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%	Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%	Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%
71.4232859	235.241259	12522.5358	1917.20551	12750.5331	17180.3753	27.2781112	3351.43362	31746.1087

Tabla 7. Valores promedio obtenidos de la Tabla 6 mediante la fórmula  $2^{-\Delta ct}$ .

Asimismo se obtuvo la desviación estándar partiendo de los resultados de la Tabla 6, mismos que se anotan en la Tabla 8:

miR-21 2 días			miR-21 4 días			miR-21 6 días		
Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%	Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%	Exo Ctrl	Exo CSE 5%	Exo CSE 10%
0.24030422	82.7068643	5824.08831	50.3917073	467.02049	832.774958	0.90937071	86.8360633	7338.81924

Tabla 8. Desviación estándar obtenida a partir de los valores reportados en la Tabla 6.

Se graficaron los resultados del análisis  $2^{-\Delta ct}$  usando el programa de análisis estadístico Minitab v16 con un nivel de confianza del 95%, siendo las figuras 6-8.

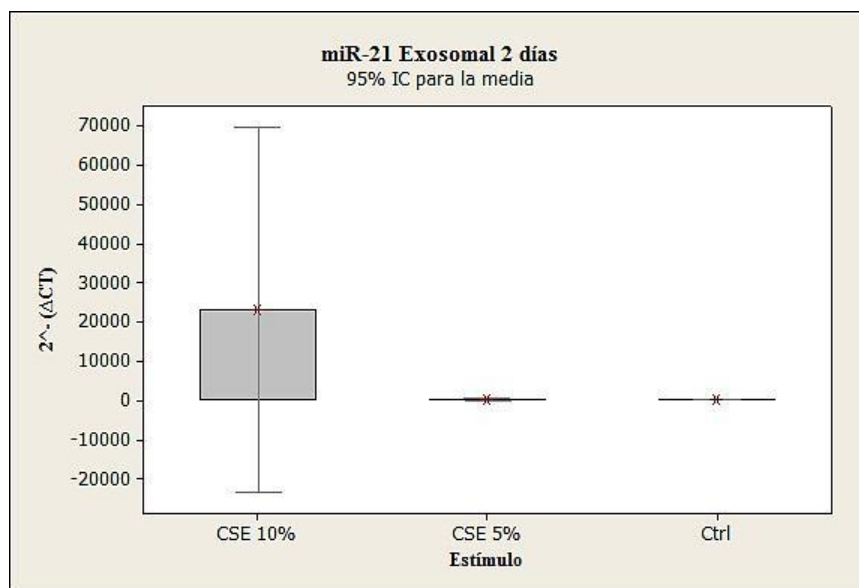


Figura 6. Expresión de miR-21 de exosomas A549 CSE 2 días: El estímulo con CSE aumenta la expresión de miR-21 a partir del día 2 especialmente cuando se utiliza al 10%.

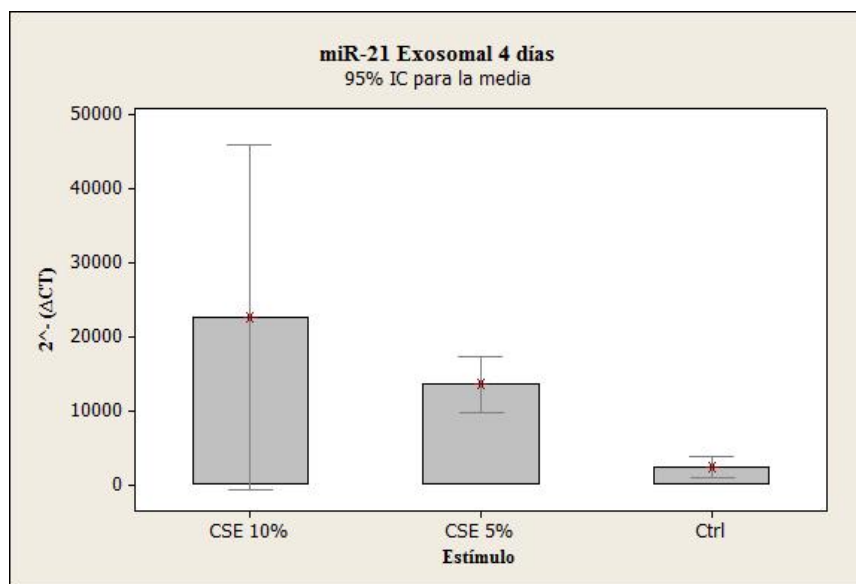


Figura 7. Expresión de miR-21 de exosomas A549 CSE 4 días: miR-21 continúa incrementándose en los 4 días

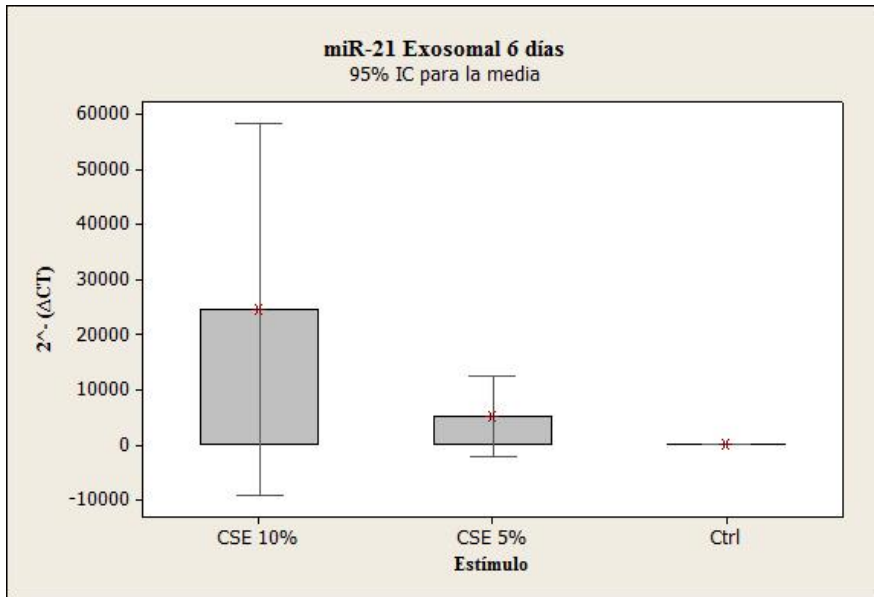


Figura 8. Expresión de miR-21 de exosomas A549 CSE 6 días: a los 6 días miR-21 sigue sobre-expresándose aún más con el estímulo al 10%, pero disminuye al 5%.

En las figuras 6-8, se observa la sobre-expresión de miR-21 con respecto al estímulo con extracto de humo de cigarro, cabe destacar que miR-21 proveniente de exosomas de células control se mantuvo bajo.

## Discusión

En este trabajo de investigación encontramos que miR-21, un microARN profibrótico, está sobre-expresado en exosomas provenientes de la línea celular A549 (utilizada como modelo para el epitelio alveolar pulmonar) expuestas a CSE, miR-21 aparece más elevado con un estímulo al 10% de CSE desde los dos días.

El nivel de expresión para miR-21 visto gráficamente a partir de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, concuerda con otros trabajos hechos con CSE donde se enfatiza que por un lado, el daño celular (apoptosis, no mostrada en este trabajo) así como la sobre-expresión misma de miR-21 está directamente vinculada con respecto a la dosis-tiempo de estímulo con CSE.<sup>18, 19, 21, 22</sup> Datos que también fueron validados por Western Blot en donde se apreció que la concentración de exosomas en los carriles CSE 5% y 10% fue que en el carril control.

Asimismo estos resultados también concordaron con los obtenidos en un estudio hecho con células de cáncer de esófago de la línea EC9706 expuestas a nicotina<sup>22</sup> en donde se observó que miR-21 es incrementado debido al efecto del CSE, pero al mismo tiempo, estos resultados estuvieron acorde con otro reporte donde se sugiere que miR-21 está contenido en microvesículas (un subgrupo de la familia de vesículas extracelulares junto con los exosomas y cuerpos apoptóticos)<sup>23</sup>, que para el presente estudio se encontraron en exosomas.

En un estudio realizado con células de cáncer de esófago<sup>22</sup> se sugirió que miR-21 se asocia con la vía de señalización del TGF- $\beta$  en el daño a las células del epitelio alveolar y por consecuencia contribuye a EMT, por lo que esta vía se refuerza aún más con la participación de exosomas que siendo positivos a miR-21 actuarán principalmente reprimiendo a Smad7 (un Smad represor del TGF- $\beta$ ), además de que ésta vía podría silenciar a miR-29 y a miR-200, dos microARNs represores de la vía del TGF- $\beta$ <sup>33</sup> los cuales tienen como función evitar por un lado la síntesis de proteínas de matriz extracelular, así como la degradación de las mismas, y por otro revertir la EMT, pero al



mismo tiempo éstos exosomas podrían contener a otros microARNs profibróticos con funciones distintas.

miR-21 junto con otros microARNs profibróticos, son mediadores que aumentan la señalización del TGF- $\beta$ , incrementando así la síntesis de proteínas de la ECM que provocarán apoptosis en las células del epitelio alveolar, pero que por otro lado llevará a una EMT dentro de un proceso de fibrosis debido a la participación de células que liberan mayor cantidad de exosomas cuando son expuestas a humo de cigarro, por lo que estos exosomas llegan a otras células para propagar el daño provocado por el estímulo, pero, también podrían no sólo limitarse a las células del epitelio alveolar sino que también serían capaces de atravesar la capa que las limita y llegar hasta la zona de residencia de fibroblastos, donde se internalizan en ellos y por consecuencia refuerzan el daño que también aumentará la síntesis de proteínas de matriz extracelular y seguir contribuyendo a la apoptosis.

Vale la pena hacer mención que el mecanismo por el cual los microARN son internalizados a exosomas no está del todo aclarado y se desconoce en gran medida cómo es este proceso, por lo que faltan estudios que estén dirigidos a entenderlo.

Por otro lado, extrañamente se encontró que el nivel de expresión de miR-21 para el CSE al 5% mostró que el pico máximo fue a los cuatro días y a los seis días decayó, este resultado fue obtenido en repetidas ocasiones, para nosotros es posible que el 5% de estímulo no es suficientemente agresivo y puede llevar a una reversión parcial del daño, por lo que es necesario hacer un análisis más detallado del por qué está sucediendo esto.

## Conclusiones

Se encontró que miR-21 fue sobre-expresado cuando existió un estímulo con el humo de cigarro, pero al mismo tiempo, este estímulo activó la maquinaria de ensamblaje de exosomas, lo cual permitió la existencia o disponibilidad de mucho más exosomas en el medio, generando de este modo un interesante vínculo entre exosoma-microARN que en cierto modo es desconocido hasta ahora debido a la escasez de estudios hechos con respecto a esta temática.

miR-21 dejó de ser susceptible a la degradación y se empaquetó dentro de exosomas donde pudo viajar libremente hacia otras células sanas, de este modo miR-21 contribuyó con el ciclo de retroalimentación positiva para TGF- $\beta$ , que amplificó el daño epitelial mediado por el humo de cigarro, pudiendo desencadenar el incremento de ECM y EMT mediados por TGF- $\beta$  debido a miR-21.

Vale la pena enfatizar que el silenciamiento de miR-21 y exosomas enriquecidos con microARNs antifibróticos como miR-29 y miR-200, podrían hacer que las células sanas restantes sobre-expresen microARNs antifibróticos que puedan atacar la vía de retroalimentación para TGF- $\beta$  dependiente de miR-21, y a su vez serían capaz de ayudar a revertir parte del daño provocado por el humo de cigarro así como degradar a proteínas de ECM y deshacer la EMT pudiendo en cierto modo recuperar la estructura original de las células.

El campo de estudio de los exosomas lejos de ser un campo relativamente nuevo, empieza a tener cada vez más presencia con un interés más enfocado hacia el tratamiento dirigido a enfermedades, además se han convertido en candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas contra enfermedades alérgicas, pero también en vacunas que sustituirán a las actuales que contienen elementos virales y que en ocasiones generan una respuesta inmune inesperada; es por ello que las vacunas basadas en exosomas solucionarían este problema (ya que contienen elementos del complejo mayor de histocompatibilidad) y ayudarían en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

## Perspectivas

En fibrosis pulmonar miR-21 es un activador del TGF- $\beta$ , bajo un ciclo de retroalimentación positiva que lleva a la acumulación de proteínas de la matriz extracelular, por lo que los exosomas podrían contribuir a éste mecanismo de señalización de miR-21, pero no sólo eso, sino que también los exosomas podrían llegar hasta fibroblastos de pulmón y contribuir con el proceso fibrótico.

Por lo cual se podría sugerir lo siguiente teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo y que a continuación se enlistan:

1. Comportamiento de fibroblastos estimulados con exosomas derivados de células del epitelio pulmonar expuestas a extracto de humo de cigarro.
2. Silenciar a miR-21 y estudiar el comportamiento de células epiteliales de pulmón cuando son estimuladas con el extracto de humo de cigarro.
3. Silenciar a miR-21 y tratar células epiteliales pulmonares con exosomas enriquecidos con microARNs antifibróticos como miR-29 o miR-200.
4. Caracterizar la presencia de ARNm del TGF- $\beta$  en exosomas derivados de células del epitelio alveolar tratadas con extracto de humo de cigarro.
5. Escanear mediante microarreglos a todos aquéllos microARNs que pudieran estar contenidos en exosomas derivados de células epiteliales pulmonares cuando son expuestas a extracto de humo de cigarro.
6. Pasar a un modelo *in vivo* es decir usar modelos de ratón expuestos a bleomicina tras un período de tiempo para que desarrollen fibrosis y a partir del BALF (fluido de lavado broncoalveolar) o mediante la extracción directa de pulmones recuperar las células del epitelio alveolar así como fibroblastos y extraer ARN exosomal para un análisis de microarreglos y buscar a aquéllos microARNs sobre-expresados y comparar los resultados con los modelos de fibrosis ya reportados.

Falta mucho por descubrir en el campo de exosomas vinculados a fibrosis pulmonar, debido a la inexistencia de reportes vinculados a la misma pero, avances crecientes en otras enfermedades como asma, hipoxia, cáncer o fibrosis renal nos proporcionan una idea para direccionar la investigación en fibrosis pulmonar.

## Referencias

1. Carbone R, Balleari E, Grosso M, Montanaro F, Bottino G, Ghio R. 2008. Predictors of mortality of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 12: 97-104.
2. Blackwell T, Tager A, Borok Z, Moore B, Schwartz D, Anstrom K, Bar Z, Bitterman P, Blackburn M, Bradford W, Brown K, Chapman H, Collard H, Cosgrove G, Deterding R, Doyle R, Flaherty K, Garcia C, Hagoood J, Henke C, Herzog E, Hogaboam C, Horowitz J, King T, Loyd J, Lawson W, Marsh C, Noble P, Noth I, Sheppard D, Olsson J, Ortiz L, O'Riordan T, Oury T, Raghu G, Roman J, Sime P, Sisson T, Tschumperlin D, Violette S, Weaver T, Wells R, White E, Kaminski N, Martinez F, Wynn T, Thannickal V y Eu J. 2013. Future Directions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Research: An NHLBI Workshop Report. *AJRCCM*: 1-31.
3. Fernandez I, Eickelberg O. 2012. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Interstitial Lung Disease* 1 (18):680-688.
4. Blink B, Jansen H y Peppelenbosch M. 2000. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Molecular Mechanisms and Possible Therapeutic Strategies. *Archivum Immunologiae et Therapie Experimentalis* 48:539-545.
5. Todd N, Luzina I y Atamas S. 2012. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 5(11):1-24.
6. Antochea J, Antón E y Casanova A. 2012. Nuevas estrategias terapéuticas en la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol* 40(6):16-22.
7. Margaritopoulos G, Romagnoli M, Poletti M, Siafakas N, Wells A y Antoniou K. 2012. Recent advances in the pathogenesis and clinical evaluation of pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 21(123): 48–56.

8. Pardo A y Selman M. 2000. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in Bioscience*. 7: 1-16.
9. Kim K, Kugler M, Wolters P, Robillard L, Galvez M, Brumwell A, Sheppard D y Chapman H. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *PNAS* 103(35):13180–13185.
10. Murray L. y Hogaboam C. 2012. Mechanisms Promoting Chronic Lung Diseases: Will Targeting Stromal Cells Cure COPD and IPF? *Lung Diseases - Selected State of the Art Reviews*: 105-217.
11. Vancheri C. 2013. Common pathways in idiopathic pulmonary fibrosis and cancer. *Rare diseases and orphan drugs*. 22:265-272.
12. Serrano A. 2012. La célula epitelial como factor etiopatogénico de la fibrosis pulmonar. *Arch Bronconeumol* 48( 2):2-6.
13. Aoshiva K. y Nagai A. 2003. Oxidative Stress, Cell Death, and Other Damage to Alveolar Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke. *TOBACCO INDUCED DISEASES PTID Society* 1(3):219-226.
14. Yáñez J. González S. y Saldías F. 2008. Enfermedad pulmonar difusa asociada al consumo de tabaco. *Rev Chil Enf Respir* 24: 46-51.
15. Ballén M, Gualdrón A, Álvarez D y Rincón A. 2006. El cigarrillo: implicaciones para la salud. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 54( 3). 191-205.
16. Pivarsci A. y Sonkoli E. 2011. MicroRNAs in inflammation and response to injuries induced by environmental pollution. *ELSEVIER* 717: 46-53.
17. Zhang H, Liu H, Borok Z, Davies K, Ursini F y Forman H. 2012. Cigarette smoke extract-stimulated epithelial-mesenchymal transition through Src activation. *NIH. Radic Biol Med*. 52(8): 1437–1442.

18. Ramage L, Jones A y Whelan C. 2006. Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells in vitro. *Journal of Inflammation* 3(3):1-11.
19. JIAO Z, Qilin A, GE X y Xiong M. 2006. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. *Acta Physiologica Sinica* 58(3):244-254.
20. Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I y Izumi T. 2001. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(2):L509-L516 .
21. JIAO Z, Qilin A, y Xiong M. 2008. Cigarette Smoke Extract Inhibits the Proliferation of Alveolar Epithelial Cells and Augments the Expression of P21WAF1. *J Huazhong Univ Sci Technol* 28(1):6-10.
22. Zhang Y, Pan T, Zhong X y Cheng C. 2014. Nicotine upregulates microRNA-21 and promotes TGF- $\beta$ -dependent epithelial mesenchymal transition of esophageal cancer cells. *Tumor Biol* 35(7):7063-72.
23. Zhou Y, Xiong M, Fang L, Jiang L, Wen P, Dai C, Zhang C y Yang J. 2013. miR-21 containing Microvesicles from injured tubular epithelial cells promote tubular phenotype transition by targeting PTEN protein. *The American Journal of pathology* 183(4) : 1183-1197.
24. Peralta O, Lagunas A y Madrid V. 2001. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de México* 43(4):340-351.
25. Sosa M y Macías M. 2004. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ): Funciones y vías de transducción. *REB* 23(1):3-11.
26. Jenkins G. y Tatler A. 2012. TGF- $\beta$  Activation and Lung Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 9(3): 130–136.

27. Bauersachs J. 2012. miR-21:a central regulator of fibrosis not only in the broken heart. *Cardiovascular Research* 96:227-229.
28. Li J, Huang C y He Y. 2014. miR-21 is a Critical Therapeutic Target for Renal Fibrosis. *Cell Biochem Biophys*. 68:635-636.
29. Vettori S, Gay S y Distler O. 2012. Role of MicroRNAs in Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal* 6(1):130-139.
30. Pandit K, Milosevic J y Kaminski N. 2011. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research* 157:191–199.
31. Angulo M, Leucona E y Snajder J. 2012. Rol de los microARN en las enfermedades pulmonares. *Archivos de Bronconeumología* 48(9):325-330.
32. Patel V y Nouredine L. 2012. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21(4):410-416.
33. Booton R y Lindsay M. 2014. Emerging Role of MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Respiratory Disease. *Chest* 146(1): 193 – 204.
34. Pandit K, Milosevic J y Kaminski N. 2011. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research* 157:191–199.
35. Vettori S, Gay S y Distler O. 2012. Role of MicroRNAs in Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal* 6(1):130-139.
36. Bauersachs J. 2012. miR-21:a central regulator of fibrosis not only in the broken heart. *Cardiovascular Research* 96:227-229.
37. Li J, Huang C y He Y. 2014. miR-21 is a Critical Therapeutic Target for Renal Fibrosis. *Cell Biochem Biophys*. 68: 635-636.
38. Burczynski M, Pant S y Hilton H. 2012. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology* 83: 1484-1494.

39. Suntres Z, Smith M, Momen-Heravi F, Hu J, Zhang X, Wu Y, Zhu H, Wang J, Zhou J y Kuo W. 2013. Therapeutic Uses of Exosomes. *Exosomes and Microvesicles*. 1(5): 1-8.
40. Keller S, Sanderson M, Stoeck A y Altevogt P. 2006. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters* 107: 102-108.
41. Yu X, Harris S y Arnold J y Levine A. 2006. The Regulation of Exosome Secretion: a Novel Function of the p53 Protein. *Cancer Res* 66: 4795-4801.
42. Koppers-Lalic D, Hogenboom M, Middeldorp J, y Petgel D. 2013. Virus-modified exosomes for targeted RNA delivery; a new approach in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 348-356.
43. Akers J, Gonda D, Kim R, Carter B y Chen C. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113: 1–11.
44. Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S y Raposo G. 2006. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *J. Biochem.* 140: 13-21.
45. Borges F, Melo S, Özdemir B, Kato N, Revuelta I, Miller C, Gattone V, LeBleu V y Kalluri R. 2013. TGF- $\beta$ 1-Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblast to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24: 385-392.