



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL TGF-BETA EN LA EXPRESIÓN DE SCLERAXIS EN FIBROBLASTOS Y  
CÉLULAS EPITELIALES DE PULMÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Manuel Alejandro Blancas Oropeza**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Marina Gavilanes Ruiz**

**VOCAL:**                 **Profesor: María Elena Ibarra Rubio**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Criselda Mendoza Milla**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: José Ignacio Paramo Ramírez**

**2° SUPLENTE:**        **Profesor: Aurora Lara Núñez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA**

**SUSTENTANTE: MANUEL ALEJANDRO BLANCAS OROPEZA**

# ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1 FPI.....	1
1.1 GENERALIDADES.....	1
2. PULMÓN.....	4
2.1 ¿QUÉ ES? .....	4
2.2 RESPIRACIÓN ¿CÓMO FUNCIONA? .....	4
2.3 FPI, ¿CÓMO AFECTA AL PULMÓN? .....	6
2.4 MECANISMOS CELULARES QUE PARTICIPAN EN LA FPI.....	8
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
Generales.....	21
Particulares.....	21
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>22</b>
Cultivo Celular .....	22
Estímulo con TGF- $\beta$ .....	23
Análisis por PCR en tiempo real del efecto del factor de crecimiento TGF- $\beta$ en la expresión génica de Scleraxis en células epiteliales y fibroblastos de pulmón.....	23
a) Obtención y cuantificación de ARN.....	23
b) Retro transcripción de ARN para obtener cADN.....	24
c) qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real).....	25

d) Cálculo de la expresión relativa del gen Scleraxis.....	26
Análisis por Western Blot del efecto del factor de crecimiento TGF- $\beta$ sobre la expresión de Scleraxis a nivel de proteína en células epiteliales y fibroblastos de pulmón. ....	28
a) Obtención y cuantificación de proteínas celulares.....	28
b) Electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida y Western Blot.....	29
c) Densitometría .....	30
Análisis estadístico.....	31
<b>RESULTADOS: .....</b>	<b>34</b>
1. Efecto del TGF- $\beta$ en los niveles de proteína scleraxis en células epiteliales de pulmón.....	34
2. Efecto del TGF- $\beta$ en la expresión génica de Scleraxis en células epiteliales de pulmón.....	36
3. Efecto del TGF- $\beta$ en los niveles de proteína scleraxis en fibroblastos de pulmón. ....	37
4. Efecto del TGF- $\beta$ en la expresión génica de Scleraxis en fibroblastos de pulmón. ..	39
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las neumonías intersticiales idiopáticas.....	2
---	---

Tabla 2. Incidencia y prevalencia de FPI por región.....	3
Tabla 3. Curva para determinación de proteínas mediante el reactivo de Bradford. .....	29
Tabla 4. Análisis de significancia en Western Blot para células epiteliales m0.05 .....	32
Tabla 5. Análisis de significancia en Western Blot para células epiteliales m0.05 .....	32
Tabla 6. Análisis de significancia en qPCR para células epiteliales m0.05. ....	33
Tabla 7. Análisis de significancia en qPCR par fibroblastos m0.05.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización y estructura pulmonar.....	5
Figura 2. Mecanismo más aceptado para explicar el origen de la FPI. ....	9
Figura 3. Origen de Fibroblastos en el sitio de lesión.....	11
Figura 4. Mecanismo general de acción de los fibroblastos. ....	13
Figura 5. Señalización por la vía canónica de TGF-beta.....	16
Figura 6. Mecanismo de regulación de colágena por Scleraxis. ....	19
Figura 7. Gráfico de temperaturas utilizadas en la reacción de qPCR. ....	26
Figura 8. Niveles de proteína SCX en células epiteliales alveolares.....	35
Figura 9. Expresión de SCX para células epiteliales.....	36
Figura 10. Expresión de Scleraxis en Fibroblastos de pulmón.....	38
Figura 11. Expresión de SCX para Fibroblastos de pulmón sano. ....	39

## ABREVIATURAS

FPI= Fibrosis Pulmonar Idiopática

SCX= Scleraxis

NII = Neumonías Intersticiales Idiopáticas

EPOC= Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

MEC= Matriz Extracelular

CEA= Células Epiteliales Alveolares

TEM= Transición Epitelio Mesénquima

MMPS= Metaloproteasas de Matriz

TIMS= inhibidores Tisulares de Metaloproteasas de Matriz

$\alpha$ -SMA= Alfa Actina de Músculo Liso

TGF- $\beta$ = Factor de Crecimiento Transformante beta

FGF2= Factor de crecimiento de fibroblastos

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

VEGF= Factor de crecimiento endotelial vascular

bHLH= Hélice-Bucle-Hélice

ADN= Ácido Desoxirribonucleico

ARN= Ácido Ribonucleico

PBS = Solución Amortiguadora de Fosfatos

SFB= Suero Fetal de Bovino

SDS= Dodecil Sulfato de Sodio

# INTRODUCCIÓN

## 1 FPI

### 1.1 GENERALIDADES

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es la enfermedad más común de las llamadas neumonías intersticiales idiopáticas (NII) (Tabla 1). Se caracteriza por ser crónica, progresiva y en la mayoría de los casos, letal [1]. Se trata de un padecimiento de causa desconocida cuyo patrón de progresión es heterogéneo, ya que mientras algunos pacientes permanecen estables durante periodos prolongados de tiempo [2], otros sufren exacerbaciones agudas [1]. Está limitada a los pulmones y la media de supervivencia posterior al diagnóstico es de 3 a 5 años. Se ha sugerido la existencia de una conexión entre el envejecimiento y la aparición de la FPI, dado que esta enfermedad se presenta principalmente en personas mayores de 50 años, siendo una posible causa, el envejecimiento acelerado del tejido pulmonar [2].

Tabla 1. Clasificación de las neumonías intersticiales idiopáticas.

<b>NEUMONÍAS INTERSTICIALES IDIOPÁTICAS MAYORES</b>
Fibrosis pulmonar idiopática
Neumonía intersticial idiopática inespecífica
Enfermedad respiratoria bronquiolar-intersticial
Neumonía intersticial descamativa
Neumonía organizada criptogenética
Neumonía aguda intersticial
<b>NEUMONÍAS INTERSTICIALES IDIOPÁTICAS RARAS</b>
Neumonía linfoide intersticial idiopática
Fibroelastosis pleuroparenquimal idiopática
Neumonías intersticiales idiopáticas no clasificables*

*\*Entre las causas que impiden la clasificación de las neumonías intersticiales idiopáticas se incluyen: 1) datos clínicos, radiológicos, y patológicos inadecuados o 2) desacuerdo entre los hallazgos clínicos, radiológicos, y patológicos por lo siguiente: a) terapia previa que provoca alteraciones mayores en los tejidos; b) nueva variedad no reconocida por la clasificación de las sociedades (American Thoracic Society/European Respiratory Society); y c) los resultados patológicos y radiológicos pueden ser los característicos de un paciente con neumonía idiopática intersticial.*

*Clasificación según las sociedades AMERICAN THORACIC SOCIETY/EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY (ATS/ERS) [1].*

En la actualidad la FPI es virtualmente una enfermedad desconocida, debido a que inicialmente se tiene un periodo asintomático, qué puede extenderse durante varios años, las personas que la padecen únicamente acuden con el médico al percatarse de síntomas como: Falta de aire crónico y progresivo, durante o después de la actividad física, tos seca espasmódica y fatiga. Lamentablemente debido a su poca incidencia y prevalencia (Tabla 2), en muchos casos incluso los especialistas desconocen su existencia, además de que para realizar un diagnóstico adecuado se requiere de un grupo de especialistas que incluye neumólogos, patólogos y radiólogos. Desafortunadamente, existen pocos datos de prevalencia e incidencia mundiales, específicamente en el caso de México se tienen reportados aproximadamente 1344 casos de FPI anuales, según datos obtenidos mediante una encuesta realizada a neumólogos en el país [3]. Sin argo, un estudio en EUA mostró que los índices de mortalidad por FPI han

aumentado en los últimos años. Esto puede ser debido a que existe un aumento en la concientización sobre esta enfermedad o debido a que actualmente hay un mayor número de personas ancianas. Independientemente de cuál sea la causa del aumento en la mortalidad, el principal problema radica en el hecho de que no existen tratamientos efectivos y sólo la pirfenidona ha probado tener beneficios parciales para pacientes con esta enfermedad [4], aunado al hecho de que el trasplante de pulmón no es una opción disponible para la mayoría de los casos.

**Tabla 2. Incidencia y prevalencia de FPI por región.**

<b>REGIÓN</b>	<b>Años de estudio</b>	<b>Prevalencia (por cada 100,000)</b>	<b>Incidencia (por cada 100,000/año)</b>
<b>ESTADOS UNIDOS</b>			
Nuevo México (Condado de Bernalillo)	1988. 1990	13.2. 20.2	7.4. 10.7
20 estados	2000	14.0. 42.7	6.8. 16.3
Minnesota (Condado de Olmsted)	1997. 2005	27.9. 63.0	8.8. 17.4
<b>EUROPA</b>			
República Checa	1981. 1990	6.5. 12.1	0.74. 1.28
Noruega	1984. 1998	23.4	4.3
Finlandia	1997. 1998	16. 18	.
Grecia	2004	3.4	0.9
Reino unido	1991. 2003	.	4.6
Reino Unido	2000. 2009	.	7.4
Turquía	2007. 2009	.	4.9
<b>ASIA</b>			
Taiwán	1997. 2007	0.7. 6.4	0.6. 1.4
Japón	2005	2.9	.

Tabla traducida y modificada de *epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis* [5]

## **2. PULMÓN**

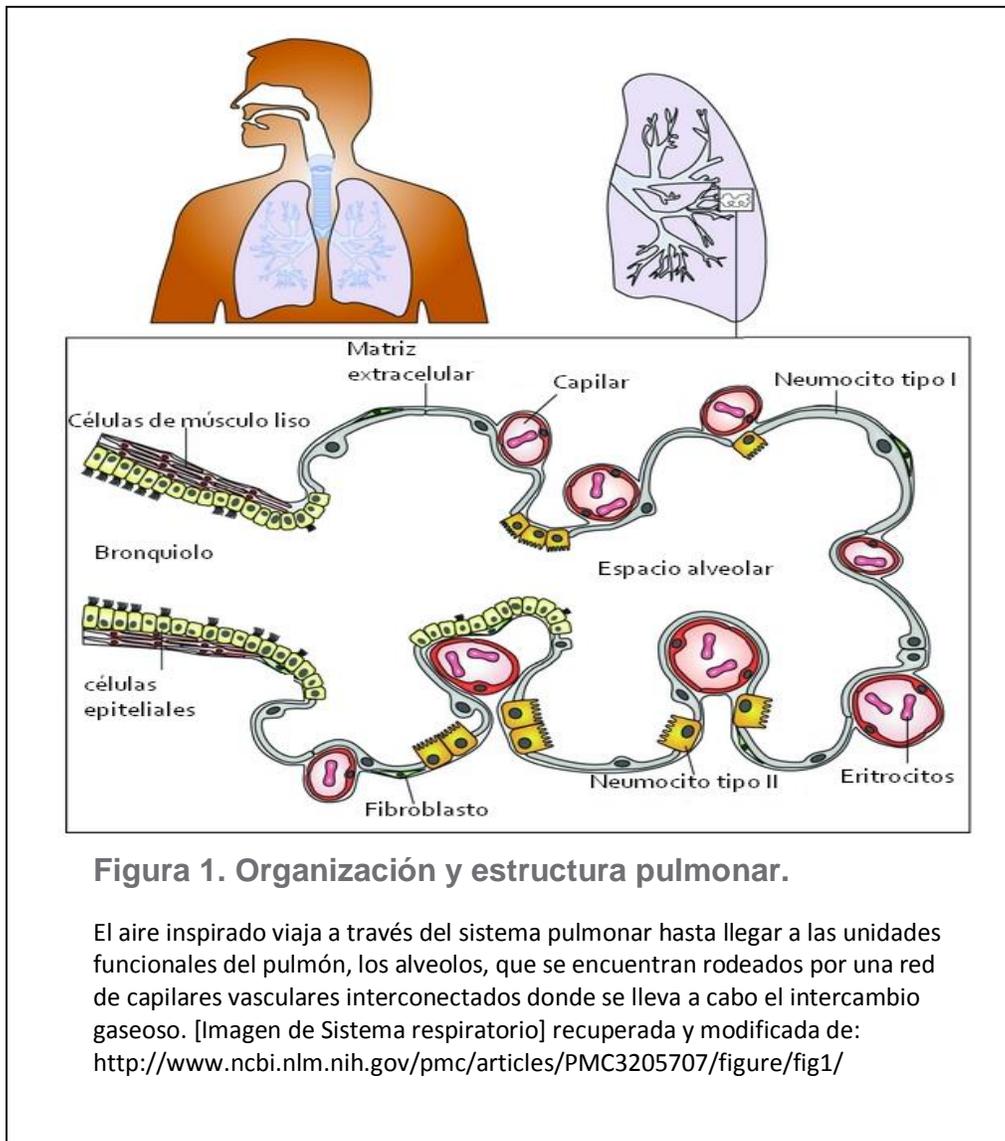
### **2.1 ¿QUÉ ES?**

El pulmón es el órgano encargado de la respiración, la cual se divide en 2 grandes procesos; respiración externa y respiración interna. La primera consiste en la ventilación o ingreso de aire a los pulmones y el intercambio gaseoso entre el aire ambiental y la sangre. La respiración interna consiste en el intercambio de oxígeno entre los tejidos y su utilización. Una característica fundamental de los pulmones, es su distensibilidad, es decir, la capacidad que tiene el pulmón para expandirse [6]. Esta propiedad puede ser afectada si el espacio aéreo pulmonar es invadido por proteínas o tejido conjuntivo que modifiquen la capacidad expansiva del tejido. Tal es el caso de Neumonitis por hipersensibilidad o por radiación [6].

### **2.2 RESPIRACIÓN ¿CÓMO FUNCIONA?**

El intercambio gaseoso se lleva a cabo en los alveolos pulmonares, es aquí donde se provee al organismo de la oxigenación necesaria para poder realizar sus funciones; gracias a la estructura pulmonar y la disposición de los capilares alveolares, el oxígeno atmosférico puede difundir a través de la pared alveolar hacia el torrente sanguíneo (Fig. 1), permitiendo que exista un intercambio por gradientes de concentración entre el CO<sub>2</sub> abundante en la sangre y el O<sub>2</sub> atmosférico. El alveolo consiste en una capa de epitelio y matriz extracelular rodeada de capilares sanguíneos. Dentro del alveolo encontramos colágenas y otras fibras elásticas que ayudan a la expansión del alveolo al momento de la

respiración, y lo ayudan a regresar a su forma original al momento de expulsar aire [6].



Dentro del alveolo existen principalmente 3 tipos de células distintas: Neumocitos Tipo I, Neumocitos Tipo II, y Macrófagos. Los Neumocitos Tipo I son los principales componentes la pared alveolar, es a través de esta estructura donde se da el intercambio gaseoso. En un espacio más interno del alveolo se

encuentran los Neumocitos Tipo II, que son las células encargadas de secretar factor surfactante, la cual disminuye la tensión superficial dentro del alveolo, aumentando así la capacidad de intercambiar gases. Finalmente, la función primordial de los macrófagos es destruir células y partículas que no pertenecen al pulmón.

### **2.3 FPI, ¿CÓMO AFECTA AL PULMÓN?**

El envejecimiento es el deterioro gradual del organismo, caracterizado por una disminución en la capacidad de lidiar con el estrés ambiental ocasionando la pérdida progresiva de la funcionalidad y la integridad tisular, lo cual conduce al aumento en la susceptibilidad a sufrir lesiones y muerte de los tejidos [7].

Las NII como su nombre lo indica, provocan lesiones, en el espacio existente entre el epitelio alveolar y el epitelio vascular (espacio intersticial), provocando la cicatrización del mismo. Esto se asocia con deficiencias en la ventilación alveolar y el intercambio gaseoso, debido al engrosamiento del epitelio, lo cual se traduce en una disminución de la calidad de vida y eventualmente la muerte [8].

Una vez que el epitelio está invadido por colágena, se pierde la estrecha relación entre los capilares y los alveolos provocando que el intercambio no se lleve a cabo, este proceso de cicatrización del epitelio es conocido como fibrosis pulmonar [6]. Es importante destacar que la fibrosis pulmonar puede presentarse en personas jóvenes e incluso en niños, sin embargo, la FPI no se presenta en pacientes jóvenes. Existen diversos estudios que demuestran una relación directa

entre el envejecimiento pulmonar y enfermedades como enfisema y Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [7].

Se ha comprobado en ratones deficientes del gen *klotho*, (ratones que asemejan un envejecimiento acelerado), que el tejido pulmonar senescente es más susceptible a lesiones enfisematosas y no fibróticas. De esta manera, la aparición de FPI sigue aun sin conocerse [7].

Los mecanismos que llevan al desarrollo y la progresión de la FPI no han sido completamente dilucidados. Sin embargo, se ha propuesto que, a diferencia de las otras NII, la FPI no tiene un inicio inflamatorio.

Es bien sabido que después de una lesión existe inflamación como respuesta general del organismo. En las últimas fases de la inflamación existe reclutamiento de fibroblastos, los cuales estarán presentes hasta que la re-epitelización ocurra por completo. En caso de que la lesión inicial no se resuelva de manera correcta, los fibroblastos continuarán migrando y secretando colágenas, ocasionando que la lesión crónica evolucione a fibrosis [9].

Sabemos que la inflamación no es el paso inicial en el desarrollo de la FPI, debido a que los pacientes muestran respuestas muy poco efectivas a los tratamientos antiinflamatorios. Además, pacientes que siguen dichos tratamientos no muestran mejorías en la supervivencia, ni en la calidad de vida. Por esta razón se descarta que la inflamación tenga un papel crítico en la aparición de FPI [8]. Por otro lado, diversos estudios sugieren que, en el caso específico de la FPI, la aparición de fibroblastos en las lesiones no es una consecuencia directa, sino de un proceso de reparación aberrante provocado por la activación de las células

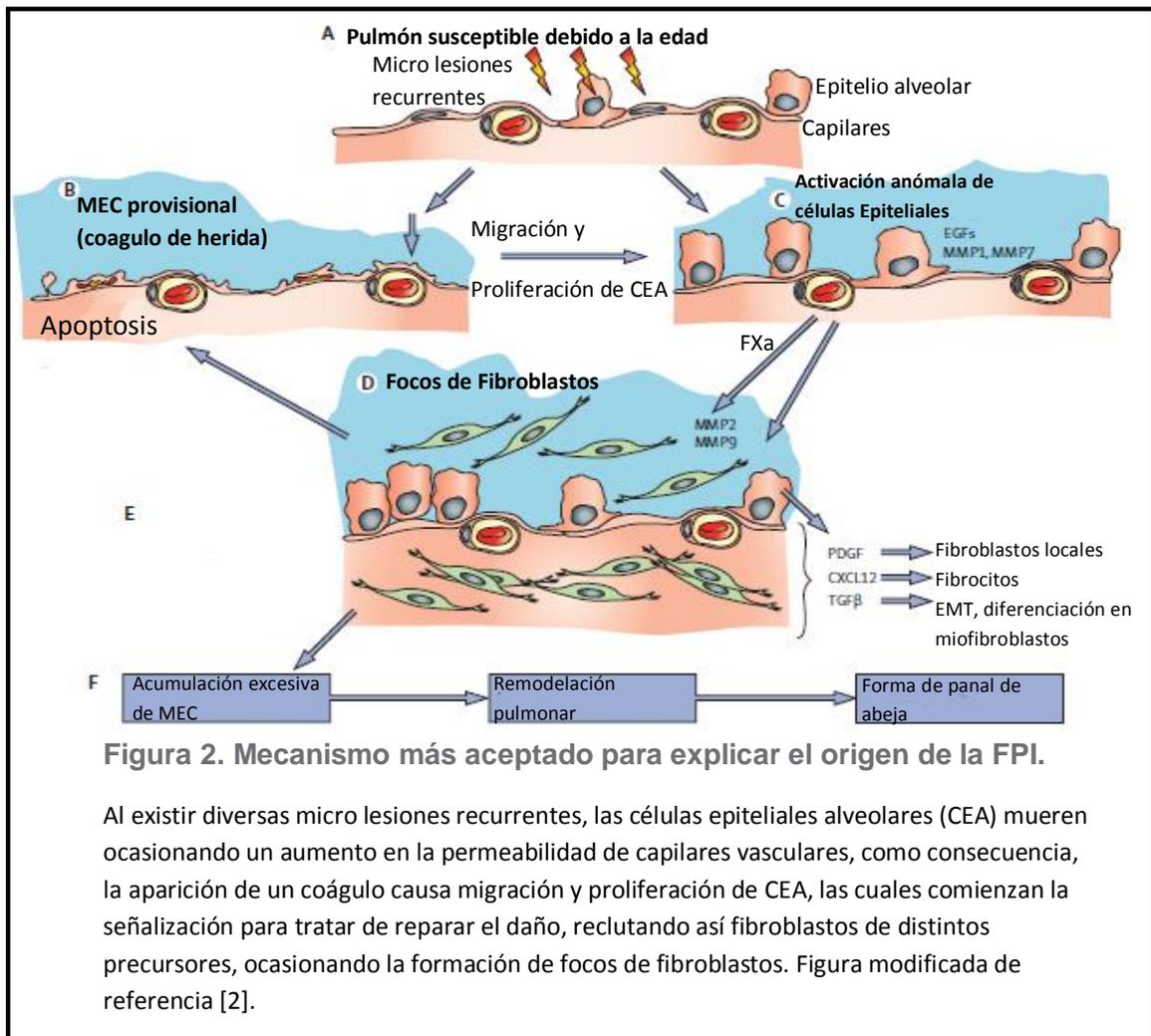
epiteliales, que continúan con la reparación aun en ausencia del primer estímulo. Esto es conocido como fibrosis mediada por el epitelio, de esta manera, se ha concluido que al menos 2 rutas celulares, la inflamatoria y la epitelial, pueden conducir a fibrosis en el pulmón [2].

## **2.4 MECANISMOS CELULARES QUE PARTICIPAN EN LA FPI**

El daño al epitelio alveolar puede ser causado por diversos factores, entre los que se encuentran, el tabaquismo, aspirar humo de leña, aspirar asbestos, e infecciones virales. Se han encontrado distintas alteraciones en algunos casos familiares de FPI donde una alteración en la proteína surfactante C provoca daños en el epitelio. Los agentes surfactantes ayudan a evitar el colapso de los alveolos pulmonares, al introducirse en la interfase agua-aire logran disminuir las interacciones entre los hidrógenos del agua, disminuyendo de esta manera la tensión superficial dentro del alveolo [6].

Cuando existe daño tisular se activan diversos procesos encaminados a la reparación de dicho daño. El primer paso requiere la formación de un coágulo, seguido de la inflamación y posteriormente se procede al reclutamiento celular, migración, proliferación y generación de matriz extracelular (MEC) [10]. Las células epiteliales dañadas en el alveolo pulmonar secretan diversos factores con el propósito de iniciar la reparación (Fig. 2). Una parte importante de este proceso es la activación en la cascada de coagulación, que ha demostrado tener un efecto no deseado, ya que el Factor X estimula a los fibroblastos cercanos. La formación de un coágulo en la herida requiere la presencia de fibrina y fibronectina, estos

factores a su vez estimulan la transición epitelio mesénquima (TEM), provocando la aparición de un mayor número de fibroblastos. De esta manera, se concluye que la activación de factores procoagulantes, sumado a la falta de fibrinólisis por parte de las células epiteliales, tiene una acción determinante en la aparición de focos de fibroblastos [2].



**Figura 2. Mecanismo más aceptado para explicar el origen de la FPI.**

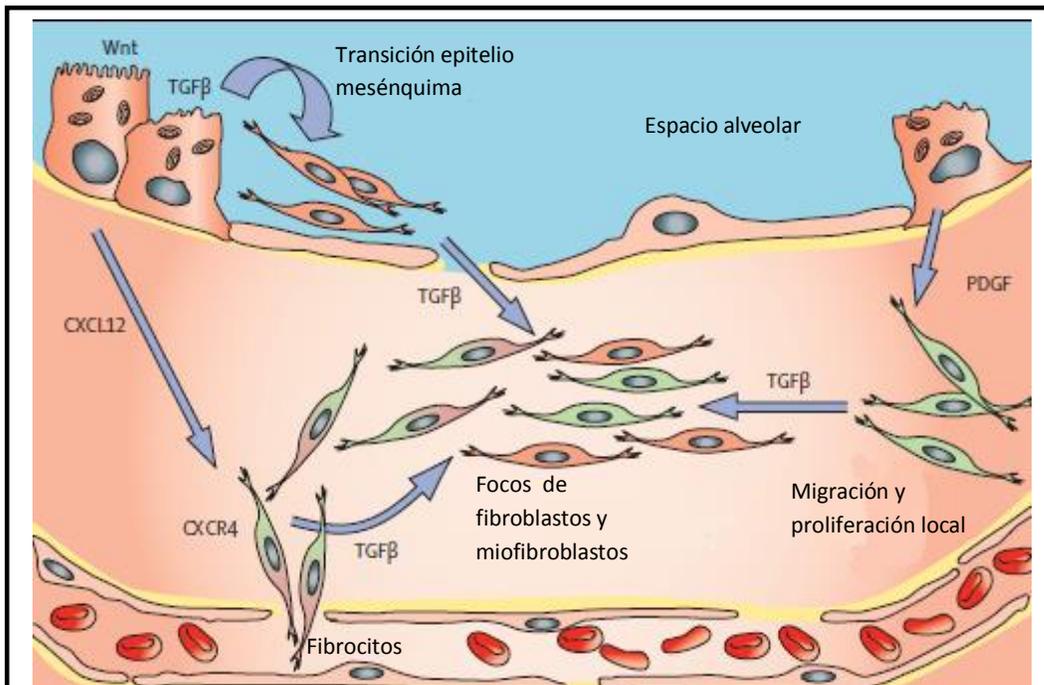
Al existir diversas micro lesiones recurrentes, las células epiteliales alveolares (CEA) mueren ocasionando un aumento en la permeabilidad de capilares vasculares, como consecuencia, la aparición de un coágulo causa migración y proliferación de CEA, las cuales comienzan la señalización para tratar de reparar el daño, reclutando así fibroblastos de distintos precursores, ocasionando la formación de focos de fibroblastos. Figura modificada de referencia [2].

## a) Fibroblastos

Los fibroblastos son células presentes en la mayoría de los tejidos. Se ha demostrado que tienen una participación importante en el desarrollo de la fibrosis.

En los tejidos sanos regulan el contenido de MEC, mediante la expresión de metaloproteasas de matriz (MMPs, degradan la matriz) y los inhibidores tisulares de MMP (TIMPS). Los fibroblastos tienen una participación activa en la reparación de heridas, ya que durante el reclutamiento celular son llamados al sitio de herida en donde proliferan y bajo diversos estímulos se diferencian a miofibroblastos [10]. Los miofibroblastos son nombrados de esta manera por su particularidad de combinar, la capacidad de síntesis de los fibroblastos, con la capacidad contráctil de las células de músculo liso.

La mayoría de los miofibroblastos tienen como precursor fibroblastos locales que sufren diferenciación bajo los estímulos de factor de crecimiento transformante beta (TGF- por sus siglas en inglés). Otro posible origen de miofibroblastos son fibrocitos cercanos que pueden ser reclutados; también células epiteliales pueden dar origen a nuevos miofibroblastos mediante el proceso de TEM (Fig.3) [10, 11].



**Figura 3. Origen de Fibroblastos en el sitio de lesión.**

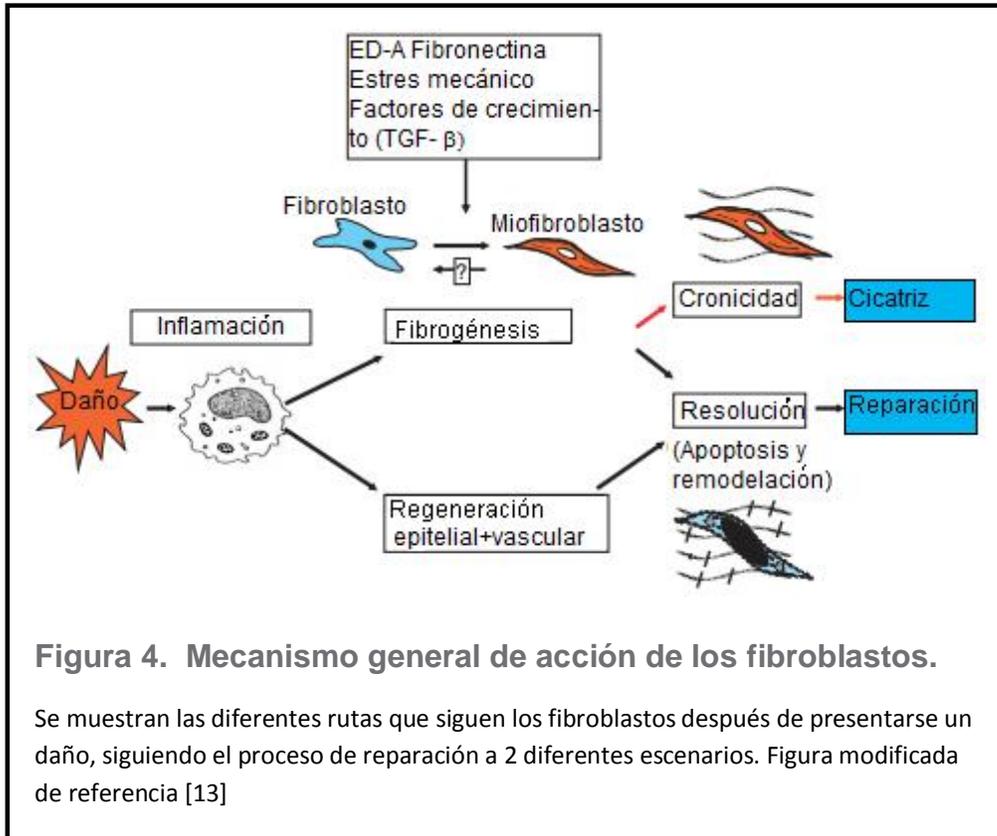
La aparición de fibroblastos en el lugar de la herida tiene diversos orígenes posibles, las células epiteliales pueden sufrir transición epitelio mesénquima, los fibrocitos circulantes también pueden ser reclutados al sitio, así como los fibroblastos locales siguiendo el estímulo de TGF- $\beta$ . Figura modificada de referencia [2].

Aunque el origen de los miofibroblastos puede ser heterogéneo, su aparición es provocada por la señal específica del estrés mecánico consecuencia de la lesión. Para responder al estrés mecánico, los fibroblastos adquieren fibras contráctiles, convirtiéndose así en un protomiofibroblasto, el cual posteriormente completará su diferenciación, la característica principal una vez que ha finalizado dicha diferenciación es la expresión de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) [12].

En un proceso de reparación normal, los miofibroblastos son eliminados vía apoptosis después de la resolución satisfactoria de la herida (Fig. 4). Durante el proceso de reparación celular existen dos posibles escenarios: 1. Sanar, si es

llevada a cabo de la manera ideal. Su resultado es un tejido exactamente igual al que existía previo a la lesión. 2. Cicatrizar, si el proceso de reparación no es el óptimo o el tamaño de la herida es muy extenso. La reparación no es llevada a cabo de manera simultánea en toda el área, lo que ocasiona la existencia de áreas con MEC acumulada excesivamente produciendo una cicatriz, lo cual quiere decir que las células encontradas en mayor medida en el tejido son fibroblastos y no las células previas a la lesión [10, 13].

El objetivo principal de la reparación celular es la restauración del tejido y por lo tanto de su funcionalidad, no obstante, este proceso no siempre llega a término de la mejor manera, ocasionando entonces el origen de una cicatriz. Aunque biológicamente sanar y cicatrizar son similares, existen diferencias en cuanto a la funcionalidad del tejido celular generado ya que una cicatriz es caracterizada por contener exceso de MEC [13]. Durante el proceso de reparación es fundamental que el área dañada cuente con los nutrimentos necesarios para lograr una reparación óptima, con este objetivo en el sitio afectado se liberan una serie de factores angiogénicos que incluyen TGF- $\beta$ , FGF2, PDGF y VEGF [9, 13, 14].



La aparición excesiva de matriz extracelular en la FPI se debe a la aparición de focos de fibroblastos/miofibroblastos, que consisten en acumulaciones de fibroblastos produciendo [15] cantidades excesivas de MEC, además de TGF- $\beta$  en el sitio de lesión. Dentro de los focos, los fibroblastos adquieren resistencia a la apoptosis, debido a la presencia de TGF- $\beta$  [16], y a la disminución en la expresión de factores apoptóticos dentro de los focos de fibroblastos, comparada con un proceso de reparación típico [12].

Además se ha visto que cuando existe un aumento en la rigidez de la MEC, los miofibroblastos perciben esto como una retroalimentación positiva de que su trabajo de reparación se está llevando a cabo de una manera óptima, se provoca

un mayor reclutamiento de fibroblastos, además de inhibir la muerte de los que ya están previamente en el sitio [9]. Los miofibroblastos comparten con las células de músculo liso la expresión de  $\alpha$ -SMA cuyo objetivo es proporcionar la fuerza necesaria para poder efectuar el cierre de la herida.

A diferencia de las contracciones momentáneas y reversibles que existen en los miocitos, las contracciones de los miofibroblastos son más lentas y son irreversibles, una consecuencia de estas contracciones es el aumento en la rigidez de la MEC. Se ha visto que una matriz rígida sumada a la presencia de TGF- $\beta$  en el sitio de reclutamiento son factores suficientes para provocar la transición de fibroblastos en miofibroblastos [9].

## **b) TGF- $\beta$**

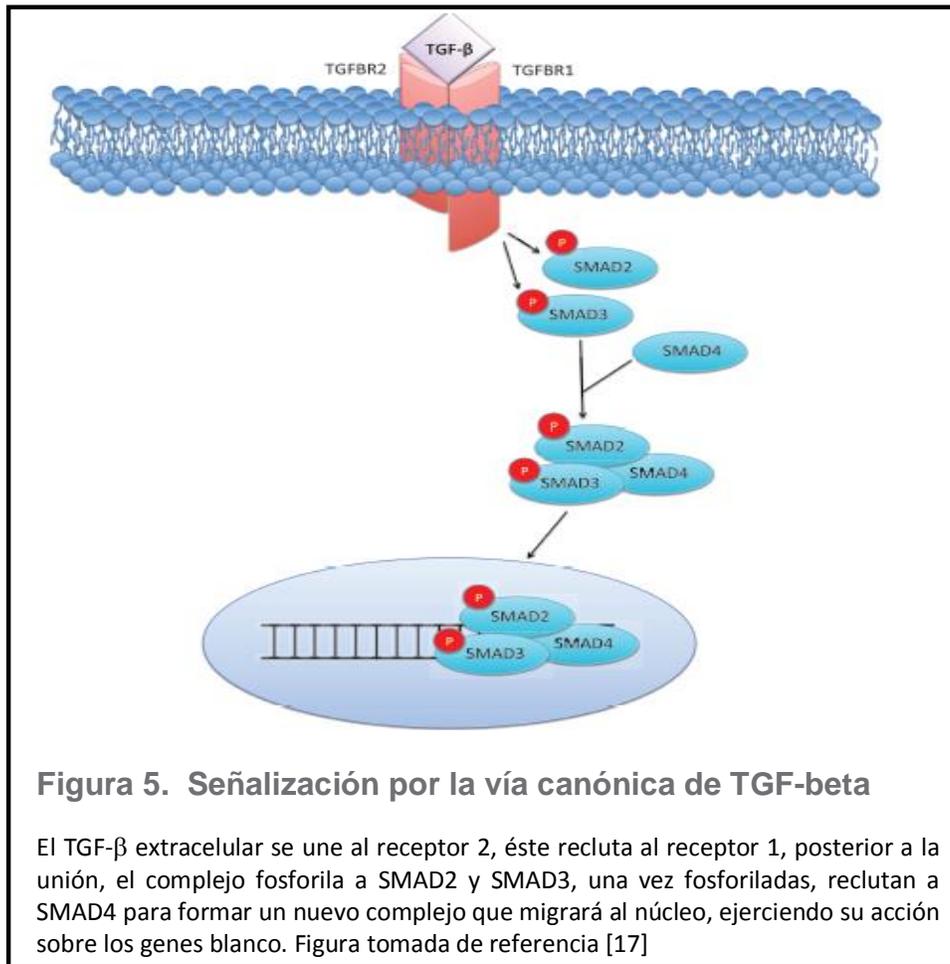
En el caso de los alveolos, se ha demostrado que las células responsables de la mayor liberación de TGF- $\beta$  son los macrófagos alveolares [19].

TGF- $\beta$  es una citocina que regula el desarrollo y la homeostasis de la mayoría de las células de mamíferos. Tiene 3 isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) que han demostrado ser esenciales. Los ratones deficientes de TGF- $\beta$  mueren en periodos muy cortos después de su nacimiento, entre 24 horas y un máximo de 5 semanas [17]. Se ha especulado que el TGF- $\beta$  puede ser activado por diversos factores, todos ellos con la característica de ser indicativos de alguna perturbación en la MEC.

Estas perturbaciones son transmitidas mediante integrinas. La percepción de dichas perturbaciones por parte de la célula, estimula la secreción de TGF- $\beta$  que a su vez estimula la producción de más integrinas [18] produciendo una retroalimentación cuyo objetivo es producir una liberación auto-regulada de TGF- $\beta$ .

La señalización inducida por la unión de TGF- $\beta$  a su(s) receptor(es), conduce a la activación de factores de transcripción conocidos como SMADS (Fig. 5). Aunque existen otras rutas de señalización, se ha comprobado que la mayoría de los escenarios pro-fibróticos son mediados por las SMADS. Una de las vías en las cuales se ha identificado la participación de TGF- $\beta$  y SMADS es durante la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, ya que SMAD3 se une al promotor de  $\alpha$ -SMA después de ser activada por TGF- $\beta$  [16]. Como se había mencionado, la expresión de  $\alpha$ -SMA es la principal característica de los miofibroblastos[12].

La transición epitelio mesénquima, TEM, ha sido identificada como uno de los procesos en los cuales TGF- $\beta$  tiene una acción directa. En este proceso, las células epiteliales pierden los marcadores clásicos que las definen como tales (E-caderina), además de sufrir una remodelación en el citoesqueleto, que se acompaña de un cambio en el fenotipo, expresión de Fibronectina y N-caderina. Dicha diferenciación también se caracteriza morfológicamente por la pérdida de adhesión e incremento en la proliferación y migración [20]. Se han identificado 3 tipos de TEM, la 1era en desarrollo embrionario, la 2da en la reparación de heridas, y la 3ra en la aparición de tumores [21]. La transición tipo 2 es responsable de ocasionar fibrosis en los distintos tejidos.



La elevación en la expresión de TGF- $\beta$  precede a la expresión y deposición de colágena. También ha probado ser el mayor mediador en la aparición de fibrosis pulmonar en modelos de animales, dado que una sobreexpresión de dicha citocina conduce a fibrosis severa. Otro modelo demostró que la deficiencia de SMAD 3 atenúa la aparición de fibrosis en respuesta a la bleomicina (la bleomicina es un fármaco utilizado en terapias antitumorales cuyo uso se asocia a la aparición de fibrosis en diversos tejidos). La producción de TGF- $\beta$  normalmente se realiza

por macrófagos y células epiteliales, sin embargo en la fibrosis pulmonar se ha encontrado que eosinófilos y miofibroblastos también expresan esta proteína [16].

### **c) Scleraxis**

La proteína Scleraxis (SCX) es un factor de transcripción perteneciente a la familia bHLH (Basic Helix-Loop-Helix por sus siglas en inglés). Los factores de transcripción se acoplan a regiones específicas en el ADN y su función es regular la transcripción a ARN mensajero (expresión o inhibición). Estas proteínas tienen tanto dominios de unión a ADN como dominios reguladores y se clasifican de acuerdo al de unión a ADN[22].

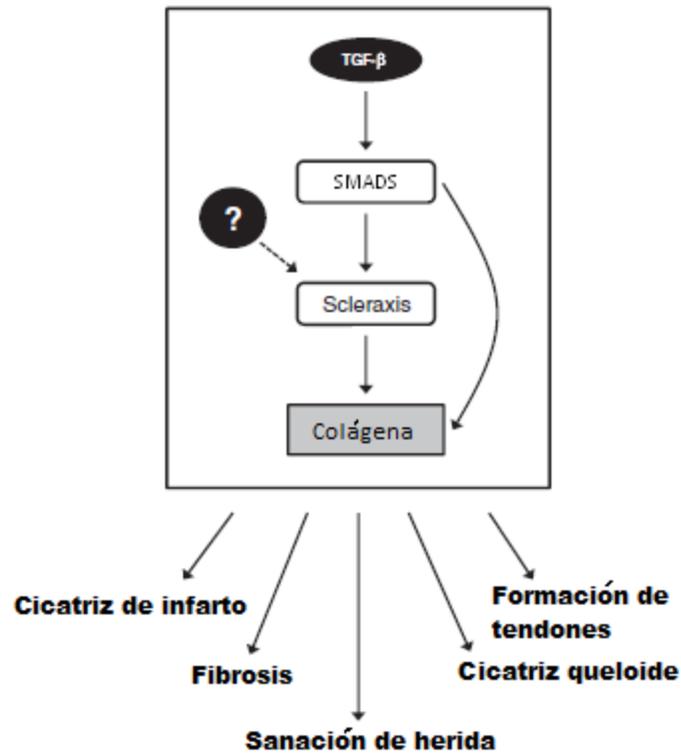
Los miembros la familia bHLH son importantes para la diferenciación celular, proliferación, así como también en la oncogénesis.

Scleraxis fue encontrado por primera vez en huesos, cartílago, tendones y ligamentos [23]. Debido a diversos experimentos realizados se sugirió inicialmente que este factor actuaba regulando la expresión de genes en cartílagos y huesos durante la embriogénesis debido a que, en las células precursoras de hueso, su expresión es constante hasta antes de que se inicie la osificación. Al iniciar la osificación, la expresión de SCX disminuye considerablemente. La mayoría de su actividad se ha estudiado realizando un seguimiento del proceso de formación de hueso, sin embargo posteriormente se encontró también en fibroblastos cardiacos de adultos, lo cual le da un panorama más amplio de acción [10].

Los genes regulados por Scleraxis aún son en su mayoría desconocidos, sin embargo, se sabe que regula la expresión de colágenas fibrilares, colágena tipo I y III principalmente. Un estudio encontró que Scleraxis tiene participación en la fibrosis cardiaca, por lo tanto se especula que su expresión en distintos tejidos puede ser indicador de fibrosis [24].

Su actividad en corazón también ha sido investigada usando ratones deficientes del gen de SCX, se encontró que estos ratones presentan válvulas cardiacas más gruesas, mismas que se caracterizan por presentar grandes cantidades de fibroblastos, lo que les otorga más flexibilidad y elasticidad que el resto del tejido cardiaco. Las válvulas cardiacas también sufren un desgaste mayor que el resto del tejido debido a su función, SCX participa en la formación y remodelación de dichas válvulas. El mismo estudio encontró que los ratones deficientes de SCX no presentan una buena remodelación, lo que hace suponer que la homeostasis de fibroblastos es afectada por la ausencia del factor de transcripción [25].

Estudios realizados en fibrosis cardiaca subsecuente a un infarto al miocardio, revelan que la expresión de Scleraxis se ve aumentada en presencia de TGF- $\beta$  y como consecuencia los niveles de colágena también aumentan (Fig. 6). También se encontró que en las zonas de cicatrización de dichos tejidos, había una mayor expresión de SCX [10], sugiriendo la participación de este factor en el desarrollo de la fibrosis.



**Figura 6. Mecanismo de regulación de colágena por Scleraxis.**

La expresión de Scleraxis aumenta en respuesta al TGF- $\beta$  por medio de la vía canónica de señalización de SMADS. La síntesis de colágena es incrementada por la combinación de Scleraxis con SMAD3, ya sea por acción independiente o por sinergia. La línea punteada muestra la posibilidad de que Scleraxis sea inducido por estímulos distintos al TGF- $\beta$ . Figura traducida de referencia [10].

## JUSTIFICACIÓN

En los pacientes con FPI existe un aumento en la rigidez del tejido pulmonar y hay aparición de focos de fibroblastos que producen una cantidad excesiva de MEC. Dado lo anterior y los reportes relacionados con el papel de Scleraxis en fibrosis cardíaca, nosotros postulamos que este factor podría contribuir al desarrollo de la FPI interactuando, de manera similar a lo observado en corazón, con las proteínas SMAD activadas por TGF- $\beta$  y promoviendo así la producción de colágena y otras proteínas de matriz extracelular.

## **HIPÓTESIS**

El microambiente fibrótico inducido por la presencia de TGF- $\beta$ , produce la sobre-expresión de Scleraxis en fibroblastos y células epiteliales de pulmón.

## **OBJETIVOS**

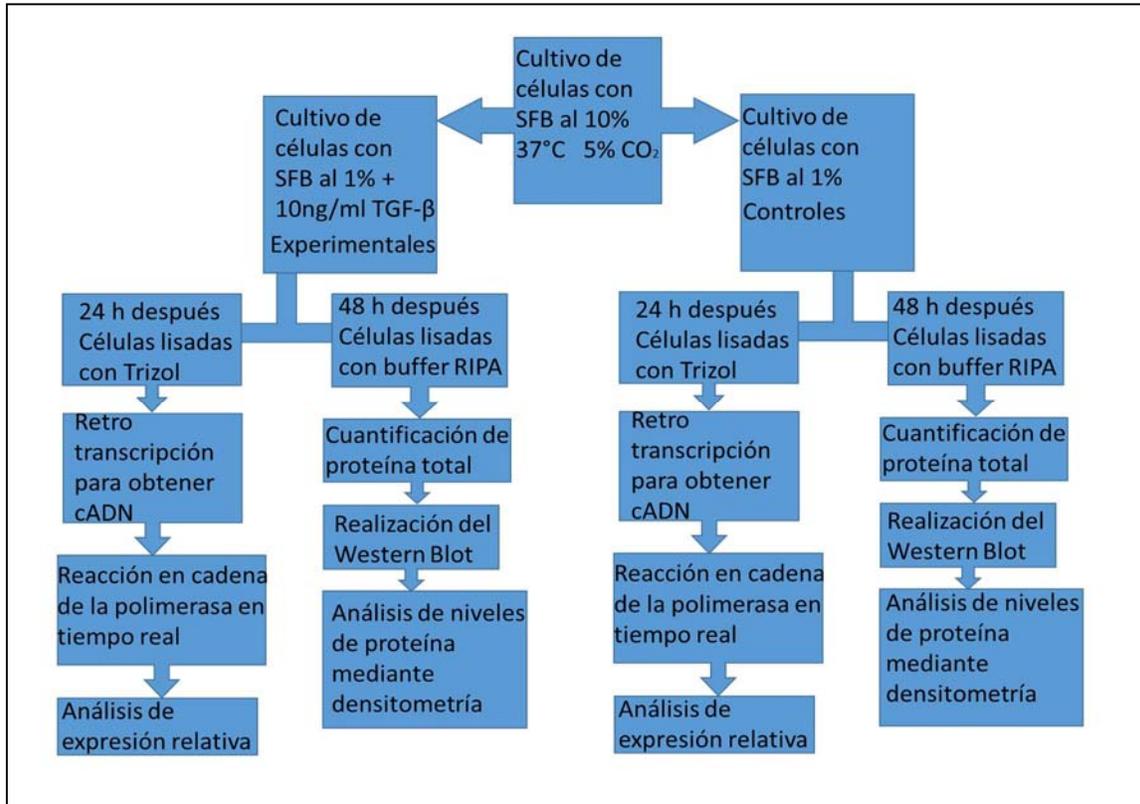
### **Generales**

Determinar el efecto de TGF- en los niveles de scleraxis en fibroblastos y células epiteliales de pulmón.

### **Particulares**

- Realizar los cultivos celulares de distintas líneas celulares epiteliales y de fibroblastos pulmonares.
- Determinar el efecto del TGF- en los niveles de proteína de scleraxis en células epiteliales alveolares y en fibroblastos de pulmón.
- Determinar el efecto del TGF- en la expresión génica de scleraxis en células epiteliales alveolares y en fibroblastos de pulmón.

## METODOLOGÍA



### Cultivo Celular

Las células epiteliales de pulmón de las líneas A549 (*Homo sapiens*), MLE12 (*Mus musculus*), y RLE6-Tn (*Rattus norvegicus*), así como cultivos de líneas celulares de fibroblastos CCD25, NOVA y provenientes de pacientes con FPI, se crecieron a confluencia del 70-80%, en cajas de cultivo Petri 60mm\_x 15mm (Corning) utilizando los medios de cultivo necesarios para su crecimiento, Medio F-12 para células A549, Medio HITES para células MLE12, y Medio F-12 suplementado para células RLE6-Tn, ( Suplementado con L-glutamina 2mM, Extracto de pituitaria bovina 0.01mg/ml, Insulina 0.005mg/ml, IGF 2.5ng/ml, transferrina 0.00125mg/ml y EGF 2.5ng/ml) todos ellos suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), penicilina 10,000U/ml, estreptomycin

10mg/ml y anfotericina B 25mg/ml. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>

### **Estímulo con TGF- $\beta$**

Una vez que las células alcanzaban 70-80% de confluencia, las cajas se lavaron con Buffer PBS, (cloruro de sodio 138mM, fosfato de sodio 8.1mM, cloruro de potasio 3mM y fosfato de potasio 1.5mM) para eliminar cualquier remanente de suero que pudiera afectar los resultados futuros. Posteriormente las células se incubaron con su medio respectivo suplementado con 1% de SFB, más 10ng/ml del factor de crecimiento TGF- $\beta$  durante 24 h (utilizadas para extracción de ARN) y 48 h (utilizadas para cuantificación de proteína). Como controles se utilizaron cultivos paralelos de las mismas líneas celulares incubadas con los medios respectivos y SFB al 1% durante 24 y 48 h sin recibir estímulo alguno.

### **Análisis por PCR en tiempo real del efecto del factor de crecimiento TGF- $\beta$ en la expresión génica de Scleraxis en células epiteliales y fibroblastos de pulmón.**

#### **a) Obtención y cuantificación de ARN.**

Al término de las 24 h el medio de cultivo fue aspirado de las cajas de cultivo y las células fueron lisadas con 1ml de Trizol Reagent (Invitrogen), las muestras fueron transferidas a microtubos (Eppendorf) de 1.5ml y se les agregó 0.2ml de cloroformo, se mezcló vigorosamente durante 15 s y se incubó de 2-3 min a temperatura ambiente. Una vez concluido este tiempo se centrifugó la

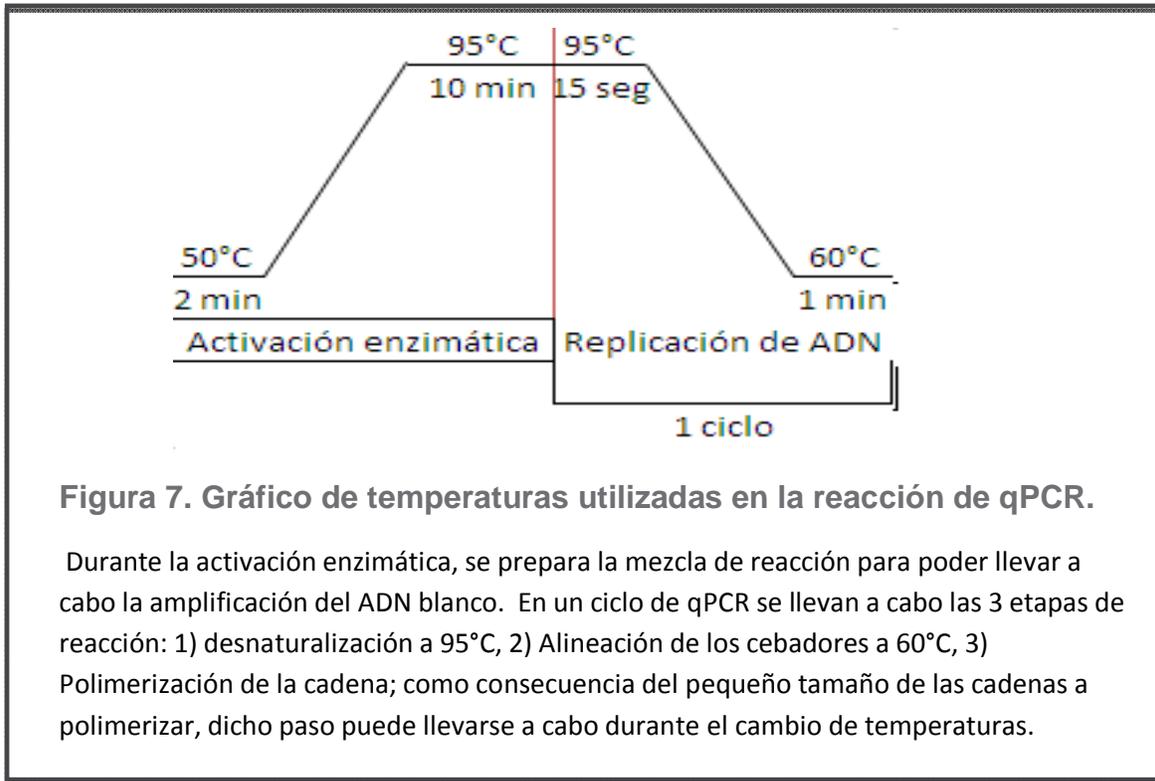
mezcla a 12,000g por 15 min a 4°C, posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo y el resto se desechó. A la fase acuosa se le agregaron 0.5ml de isopropanol al 100% y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente para después centrifugar nuevamente a 12,000g durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado que contiene el ARN utilizando etanol al 75%. Al terminar, se resuspendió el precipitado utilizando agua libre de ARN-asas. El ARN resuspendido se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop 2000.

### **b) Retro transcripción de ARN para obtener cADN.**

Una vez cuantificado el ARN se realizaron los cálculos correspondientes para colocar 1000ng en la mezcla de reacción proveniente del estuche comercial (Thermo Scientific, Revert Aid H minus), además se adicionó la transcriptasa reversa, una mezcla de dNTPs y los hexámeros al azar que se indican en las instrucciones del estuche. Esta mezcla final fue colocada en el termociclador y se programó de la siguiente manera: 5 min a 25°C, seguidos de 60 min a 42°C, y finalizando con 5 min a 70°C. Una vez que la reacción de retrotranscripción finalizó, el cADN fue cuantificado una vez más (NanoDrop 2000) para ajustar la cantidad de cADN y procurar que todas las muestras contuvieran una concentración aproximada de 10ng/μl.

### c) qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real)

Se preparó la reacción de qPCR utilizando placas de 96 pozos y utilizando el master mix Maxima probe, que contiene: Buffer de reacción, Taq polimerasa y dNTPs listos para usarse (Thermo Scientific #K026). Las muestras provenientes de células epiteliales fueron agrupadas en 2 distintas categorías: las células de origen humano y las células de origen murino. Las muestras provenientes de fibroblastos se agruparon considerando si provenían de muestras patológicas o de líneas celulares. Cada una de las muestras fue colocada por triplicado para poder realizar la comparación entre la expresión del gen Scleraxis utilizando sondas Taqman acopladas a VIC (Fluorocromo utilizado para detectar la replicación del ADN blanco). Como gen constitutivo se usó POL2A (Sondas Taqman) para el caso de los humanos y GAPDH para el grupo murino. En todos los casos se utilizaron 4µl de cADN equivalentes a aproximadamente 40ng de cADN. Las placas fueron colocadas en el equipo Step One Plus y se corrieron durante 40 ciclos utilizando el software del equipo para cuantificación relativa de expresión génica (Figura 7).



**Figura 7. Gráfico de temperaturas utilizadas en la reacción de qPCR.**

Durante la activación enzimática, se prepara la mezcla de reacción para poder llevar a cabo la amplificación del ADN blanco. En un ciclo de qPCR se llevan a cabo las 3 etapas de reacción: 1) desnaturalización a 95°C, 2) Alineación de los cebadores a 60°C, 3) Polimerización de la cadena; como consecuencia del pequeño tamaño de las cadenas a polimerizar, dicho paso puede llevarse a cabo durante el cambio de temperaturas.

#### **d) Cálculo de la expresión relativa del gen Scleraxis**

Los datos crudos obtenidos con el software del equipo StepOne Plus para qPCR, fueron exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel en donde se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para realizar la cuantificación relativa de la expresión de Scleraxis obtenida en cada muestra. Dicho método consiste en una serie de ecuaciones, descritas a continuación, las cuales tienen como objetivo realizar una relación entre una muestra control y una experimental. Una vez aplicadas las ecuaciones, la expresión génica de las células control resulta ser igual a 1. De esta manera, al obtener la expresión en las células experimentales se puede determinar fácilmente las veces que aumento o disminuyó la expresión [26].

$$1 \ 1_{111} \ 1 \ 1 \ 1_{11111111111111111111} \ 1 \ \Delta 1 \ 1$$

$$\frac{1 \Delta 1 \ 1_{11} \ 1 \ \Delta 1 \ 1_{11} \ 1 \ \Delta 1 \ 1_{11} \ 1 \ \dots \ \Delta 1 \ 1_{11} \ 1}{1} \ 1 \ \overline{\Delta 1 \ 1}$$

$$\Delta 1 \ 1_{11} \ 1 \ \overline{\Delta 1 \ 1 \ 1} \ \Delta \Delta 1 \ 1_{11}$$

$$1 \ 1 \ \Delta \Delta 1 \ 1 \ 1 \ 1$$

Donde:

$1 \ 1_{111}$  Representa el ciclo en el cual se detecta la amplificación del gen de Scleraxis en la muestra

$1 \ 1_{11111111111111111111}$  Representa el ciclo en el cual se detecta la amplificación del gen constitutivo (Pol2A para el caso de los cultivos de células de origen humano y GAPDH para las de origen murino)

## **Análisis por Western Blot del efecto del factor de crecimiento TGF- $\beta$ sobre la expresión de Scleraxis a nivel de proteína en células epiteliales y fibroblastos de pulmón.**

### **a) Obtención y cuantificación de proteínas celulares.**

Al término de las 48 h de estímulo con TGF- $\beta$ , las cajas de cultivo fueron colocadas sobre hielo, se lavaron 2 veces con PBS frío, y se trataron con 150 $\mu$ l de buffer RIPA (PBS 1X, 1% de Nonidet P-40, 0.1% de SDS, 0.5% de desoxicolato de sodio) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (1nM de PMSF, 1mg/ml de pepstatina y 1mg/ml de leupeptina) durante 5 min aproximadamente. Posteriormente las células fueron lisadas mediante raspados con ayuda de gendarmes estériles. El extracto celular fue transferido a microtubos Eppendorf de 1.5ml, los cuales fueron procesados en el sonicador. Subsecuentemente se centrifugaron a 14,000rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante, y se conservó a -80°C. Se cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford, realizando una curva estándar con albúmina sérica bovina de acuerdo a como se indica en la Tabla 3. Posteriormente se adicionaron 200 $\mu$ l de reactivo de Bradford. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 595nm y mediante regresión lineal se calculó la concentración de proteína total en las muestras.

Tabla 3. Curva para determinación de proteínas mediante el reactivo de Bradford.

$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{l}$ stock albúmina (100 $\mu\text{g/ml}$ )	$\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$
0	0	800
5	40	760
10	80	720
15	120	680
20	160	640

## b) Electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida y

### Western Blot

Se prepararon geles de acrilamida al 10% de 1.5mm en los cuales se cargaron las proteínas mezcladas (V/V) con buffer de carga Laemmli 5x (Lane Marker Reducing Sample Buffer, Thermo Scientific), estas fueron separadas mediante electroforesis en condiciones reductoras. Se cargaron 40 $\mu\text{g}$  de proteína de cada lisado experimental, y se corrieron a un voltaje de 120V en frío. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando una cámara semi-húmeda para transferencia de geles (Bio-Rad) a 15V durante 35 min. Los sitios inespecíficos de unión en las proteínas se bloquearon por incubación con leche en polvo al 5% en buffer TBS-T 0.1% (amortiguador salino Tris con Tween 0.1%) durante 18 h a 4°C. Después las membranas fueron incubadas 1 h a 20°C con el anticuerpo primario (Scleraxis IgG goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology o SCXA Antibody IgG rabbit polyclonal, Thermo Scientific) dilución 1:600 en solución diluyente de anticuerpo (Antibody Diluent Reagent Solution, Invitrogen). A continuación, se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con TBS-T 0.1% y se incubó 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Peroxidase-

conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG, H+L ó Goat Anti-Rabbit IgG H+L; Jackson ImmunoResearch) según correspondiera. Posteriormente la membrana se sometió a 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T 0.1% y la marca se reveló con el sistema de detección de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Como control de carga se utilizó la proteína constitutiva  $\beta$ -actina, utilizando el anticuerpo primario anti-  $\beta$ -actin (IgG mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) y secundario (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG H+L; Jackson ImmunoResearch) indicados para identificar dicha proteína y revelando de manera similar a como se hizo para la proteína Scleraxis. La señal quimioluminiscente se detectó en el equipo Molecular Imager Chemidoc XRS+ y el análisis de las imágenes se realizó con el software ImageLab 5.0.

### **c) Densitometría**

El análisis de las imágenes obtenidas del proceso de revelado de los Westen Blot se realizó utilizando el software Imagelab, mediante densitometrías con las cuales se obtuvo el número de pixeles presente en cada banda observada en la membrana al momento de ser revelada. Posteriormente estos valores fueron exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel donde se compararon los valores obtenidos en las células estimuladas vs los controles y se hizo una relación entre estos.

## Análisis estadístico

Para calcular las desviaciones estándar de las densitometrías analizadas se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

Se utilizó una prueba T de Student para verificar si las diferencias observadas en las gráficas obtenidas tenían significancia estadística, en todos los casos se observó dicha significancia (Tablas 4 y 5).

Los experimentos de Western Blot provienen de 3 réplicas biológicas para cada línea celular.

Para calcular las desviaciones estándar de los Ct obtenidos en las reacciones qPCR, se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel, utilizando el mismo software se aplicaron las ecuaciones del método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para cada uno de los experimentos realizados. En las gráficas correspondientes se muestra promedio  $\pm$  Desviación Estándar (DS). Los experimentos se realizaron por triplicado en cada una de las 2 réplicas biológicas generadas.

Se utilizó una prueba T de Student para analizar si los resultados de la qPCR tenían significancia estadística entre ellos, en todos los casos se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (Tablas 6 y 7).

Tabla 4. Análisis de significancia en Western Blot para células epiteliales m0.05

	<b>URD</b>	<b>DS</b>	<b>p</b>
<b>A549 Ctrl</b>	1	0	0.000332
<b>A549 TGF-β</b>	0.7455	0.0506	
<b>MLE12 Ctrl</b>	1	0	0.028752
<b>MLE12 TGF-β</b>	0.9246	0.0429	
<b>RLE6-Tn Ctrl</b>	1	0	0.000134
<b>RLE6-Tn TGF-β</b>	2.1695	0.1924	

Tabla 5. Análisis de significancia en Western Blot para células epiteliales m0.05

	<b>URD</b>	<b>DS</b>	<b>p</b>
<b>HIPF231 Ctrl</b>	1	0	0.000402
<b>HIPF231 TGF-β</b>	1.6871	0.1424	
<b>HIPF286 Ctrl</b>	1	0	0.000003
<b>HIPF286 TGF-β</b>	3.2234	0.1711	

Tabla 6. Análisis de significancia en qPCR para células epiteliales  $\alpha=0.05$ .

	$2^{-\Delta Ct}$	DS	p
<b>A549 Ctrl</b>	1.0025	0.0874	0.000008
<b>A549 TGF-<math>\beta</math></b>	2.2877	0.0789	
<b>MLE12 Ctrl</b>	1.2151	0.9761	0.007814
<b>MLE12 TGF-<math>\beta</math></b>	3.6567	0.1433	
<b>RLE6-Tn Ctrl</b>	1.1043	0.0703	0.000033
<b>RLE6-Tn TGF-<math>\beta</math></b>	0.5178	0.0162	

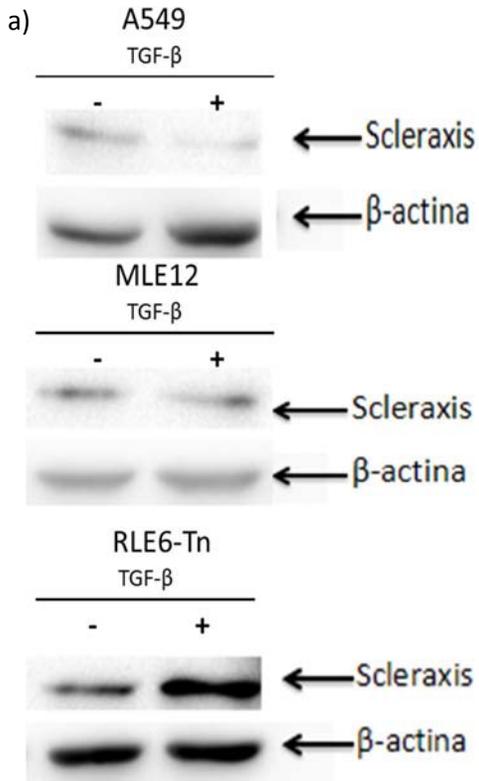
Tabla 7. Análisis de significancia en qPCR par fibroblastos  $\alpha=0.05$ .

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	DS	p
<b>NOVA Ctrl</b>	1.0004	0.03466	0.003933
<b>NOVA TGF-<math>\beta</math></b>	1.7962	0.27075	
<b>CCD25 Ctrl</b>	1.0016	0.07031	0.000096
<b>CCD25 TGF-<math>\beta</math></b>	1.6481	0.07024	
<b>HIPF231 Ctrl</b>	1.0000	0.01386	0.000002
<b>HIPF231 TGF-<math>\beta</math></b>	8.1586	0.47992	
<b>HIPF286 Ctrl</b>	1.0004	0.03841	0.000001
<b>HIPF286 TGF-<math>\beta</math></b>	22.7575	1.30036	

## RESULTADOS:

### 1. Efecto del TGF- $\beta$ en los niveles de proteína scleraxis en células epiteliales de pulmón.

Se observan distintas respuestas dependiendo de la línea celular. El primer escenario lo observamos en la línea epitelial alveolar RLE6-Tn, provenientes de rata, en las cuales la expresión de la proteína Scleraxis aumenta, después del estímulo de 48 h con TGF- $\beta$  mientras que en las líneas epiteliales A549 y MLE12, la cantidad de proteína posterior al estímulo se ve disminuida respecto a la expresión de las células control. Lo anterior se comprueba mediante la densitometría correspondiente, en donde gracias a las relaciones entre la proteína SCX vs  $\beta$ -actina podemos observar con mayor claridad como las células A549 disminuyen significativamente sus niveles de proteína. La disminución en el caso de la línea MLE12 es menor, sin embargo, no deja de ser significativa. Finalmente, la línea celular proveniente de rata (*Rattus norvegicus*) fue la única línea epitelial en la cual existió un aumento de más del 200% respecto a las células control (Fig. 8 y 9).

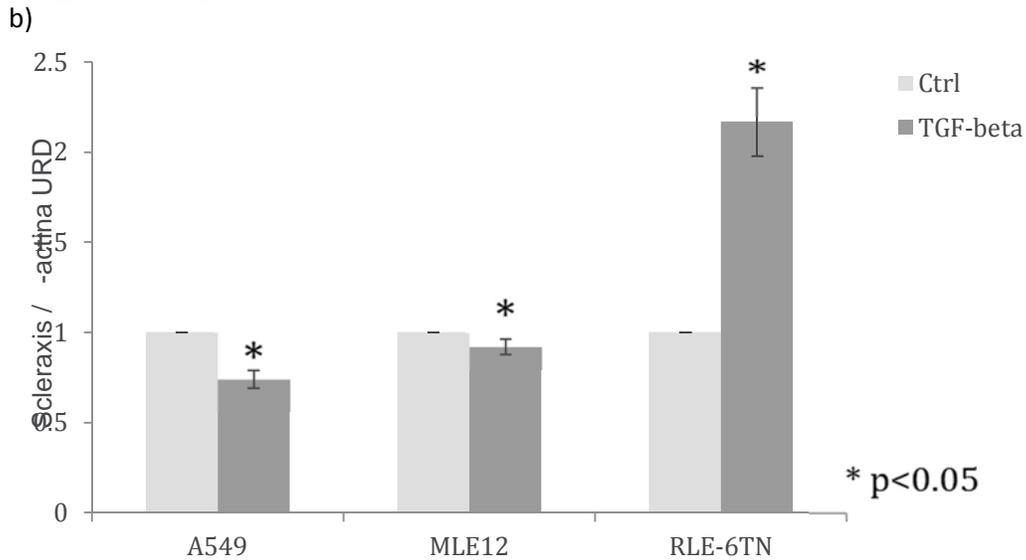


**Figura 8. Niveles de proteína SCX en células epiteliales alveolares.**

**a)** Imagen obtenida al revelar el Western Blot para células epiteliales. Células cultivadas durante 48 h en ausencia o presencia de 10ng/ml de TGF-β en medio suplementado con 1% de SFB. Para realizar la electroforesis se cargaron 40μg de proteína por carril.

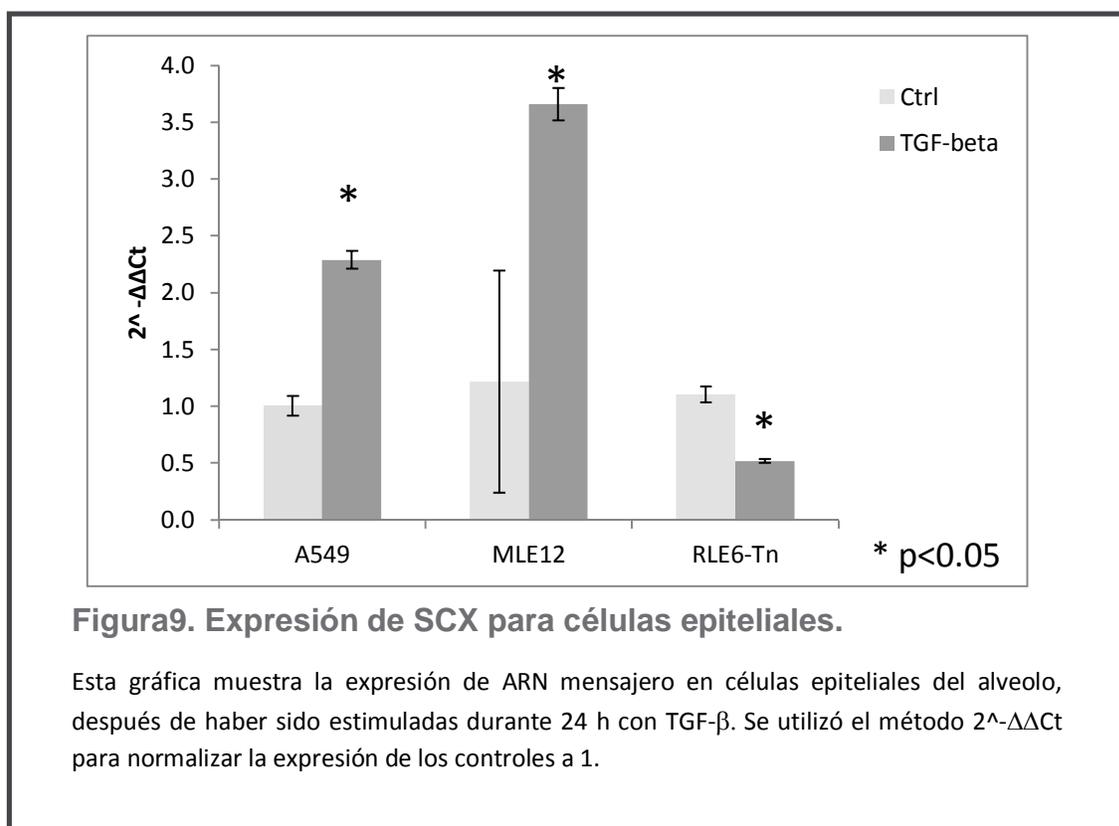
**b)** En esta gráfica se presentan los niveles relativos de proteína SCX en células estimuladas (TGF-beta) normalizada vs β-actina, donde la expresión de las células control (Ctrl) es igual a 1.

Se muestra la imagen representativa de al menos 3 réplicas biológicas



## 2. Efecto del TGF- $\beta$ en la expresión génica de Scleraxis en células epiteliales de pulmón.

Posterior a la aplicación de las ecuaciones del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito en la página 18 de la sección de metodología, se pudo ajustar a 1 la expresión de SCX en las células control para facilitar la comparación. Una vez analizados los datos, se puede ver que la expresión génica de SCX en las líneas A549 y MLE 12 tuvo un aumento significativo y en ambos casos fue superior al doble respecto al control. Por otro lado, la respuesta al TGF- $\beta$  de las células RLE6-Tn fue la disminución en aproximadamente un 50% respecto al valor del control (Fig. 9).

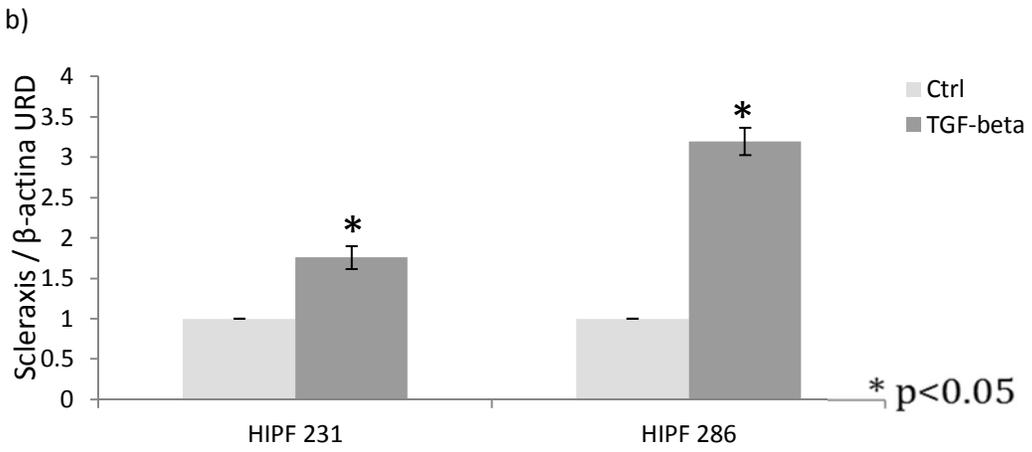
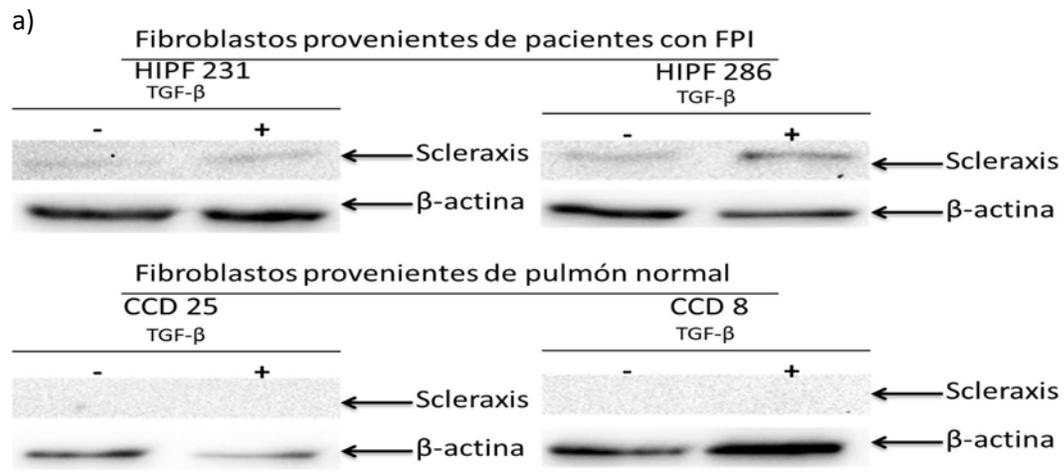


### **3. Efecto del TGF- $\beta$ en los niveles de proteína scleraxis en fibroblastos de pulmón.**

El estímulo con TGF- $\beta$  tuvo un efecto bastante similar sobre los niveles de proteína SCX en fibroblastos según el origen de estos.

En la imagen obtenida se aprecia con facilidad que las líneas provenientes de pacientes con FPI, HIPF 231 y HIPF 286, tienen un claro aumento en los niveles de proteína posterior al estímulo. La densitometría realizada para analizar estos resultados, nos permite ver con mayor facilidad que la expresión de proteína llegó a triplicarse con respecto al control en el caso de la línea HIPF 286. En la misma gráfica podemos ver que la expresión fue 1.5 veces la expresión del control en el caso de la línea HIPF 231.

Por otro lado, en ambas líneas de fibroblastos sanos, CCD25 y NOVA, no fue posible detectar SCX, por lo cual no se pudo realizar la densitometría correspondiente (Fig. 10).



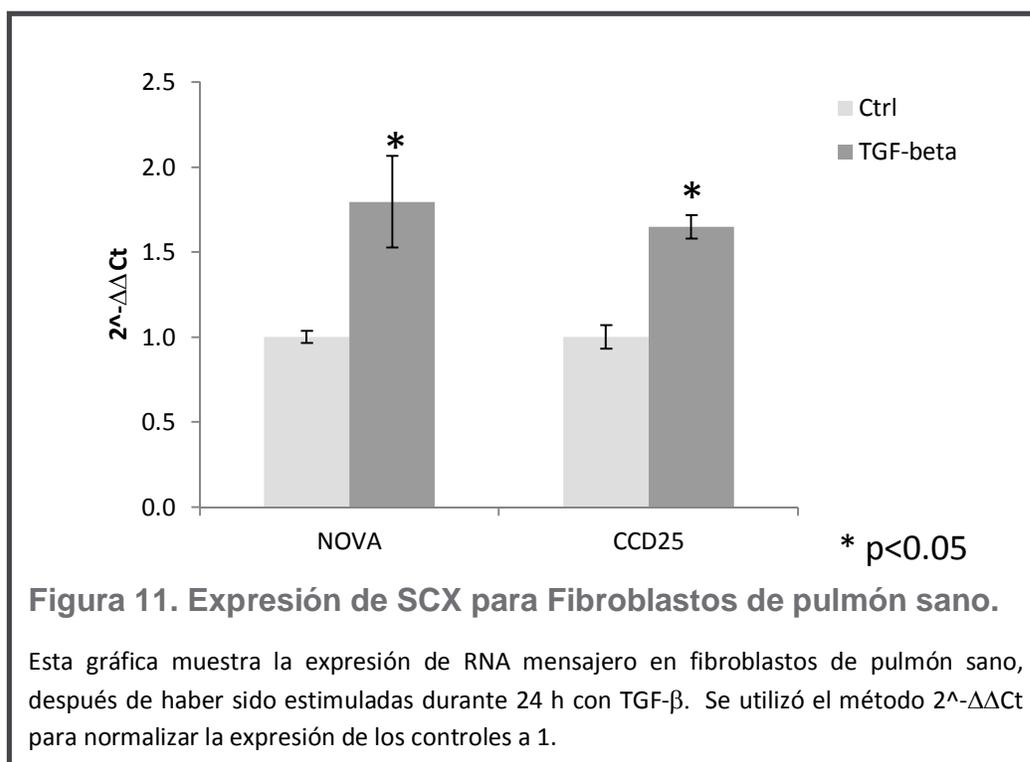
**Figura 8. Niveles de proteína SCX en Fibroblastos de pulmón.**

- a) Imagen obtenida al revelar el Western Blot para Fibroblastos pulmonares. Células cultivadas durante 48 h en ausencia (Ctrl) o presencia de 10ng/ml de TGF- $\beta$  en medio suplementado con 1% de SFB. Para realizar la electroforesis se cargaron 40 $\mu$ g de proteína por carril.
- b) En la gráfica se presentan los niveles relativos de proteína SCX en células estimuladas (TGF-beta) comparados vs los niveles de células control (Ctrl)

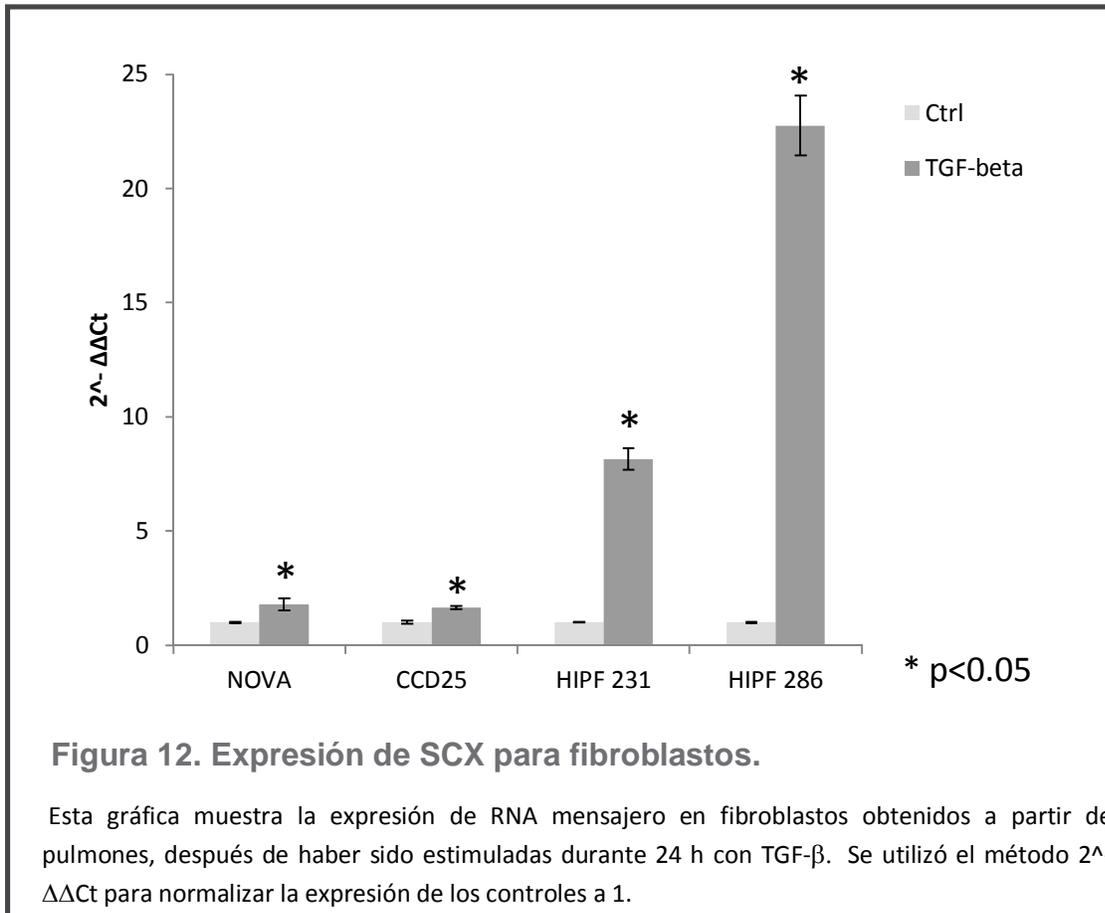
Se muestra la imagen representativa de al menos 3 réplicas biológicas

#### 4. Efecto del TGF- $\beta$ en la expresión génica de Scleraxis en fibroblastos de pulmón.

En lo que respecta a la expresión génica de Scleraxis en fibroblastos pulmonares se analizaron 4 líneas celulares provenientes de pulmón normal (CCD25 y NOVA) y dos líneas celulares provenientes de pulmones de pacientes con FPI (HIPF 231, y HIPF 286). Tras el análisis de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , se observó un aumento de SCX en todas las líneas de fibroblastos estimuladas con TGF- $\beta$  durante 24 h. Las líneas celulares de fibroblastos normales CCD25 y NOVA, mostraron un incremento de aproximadamente 1.5 veces después de ser sujetas al estímulo con TGF- $\beta$  respecto a su control (Fig. 11).



Por otro lado, los fibroblastos que provenían de pacientes con FPI, HIPF 231 y HIPF 286, mostraron un aumento mucho mayor en presencia de TGF- $\beta$  de 8 y 23 veces, respectivamente (Fig. 12).



## DISCUSIÓN

Después de analizar los resultados obtenidos en lo que respecta a los niveles de proteína Scleraxis, posterior al estímulo de 48 h con TGF- $\beta$ , observamos que en el caso de las células epiteliales de pulmón A549 y MLE12 hay una disminución en los niveles de proteína. Mientras que en el caso de las células provenientes de rata RLE6-Tn se observa un aumento al compararlas con sus respectivos controles (Fig. 8).

El fenómeno observado en las líneas A549 y las MLE-12, podría explicarse por el hecho de que el estímulo pro-fibrosante prolongado del TGF- $\beta$ , provoca una respuesta compensatoria disminuyendo los niveles de proteína SCX, lo cual se traduciría en una disminución de la síntesis de colágena mediada por Scleraxis a nivel de tejido.

Otra posible explicación a esta disminución de proteína y probablemente una más sencilla es el hecho de que TGF- ha demostrado ser un inductor de apoptosis en células epiteliales [16]. "Por esta razón es probable que la disminución de proteína se observe debido a una disminución en el número de células que fueron lisadas.

Esto puede complementarse cuando se observan los resultados obtenidos para las mismas líneas en la qPCR (Fig. 9), ya que, en este caso, el estímulo es solamente durante 24 h, tiempo que se ha indicado como el máximo de respuesta inflamatoria, por lo cual podría explicarse el aumento en un 100 % en la transcripción del gen Scleraxis, que promovería la síntesis de matriz extracelular provisional durante las etapas posteriores de reparación.

La disminución en la expresión génica de SCX en el caso de las células RLE6-Tn (Fig. 9) puede deberse a que estas células son procedentes de células alveolares tipo II. Se ha visto que estas células no tienen una participación tan íntima en la fibrosis debido a que no están tan estrechamente ligadas al espacio intersticial y su función es la de secretar factor surfactante.

Por lo tanto, la reacción de las células RLE6-Tn ante un estímulo pro-fibrosante de 24 h es expresar scleraxis en menor medida ya que esto podría significar a nivel tisular, una disminución en la síntesis de colágena mediada por scleraxis, lo cual ayudaría a mantener la distensibilidad pulmonar y colaborar para que el proceso de reparación pueda ser llevado a cabo de la mejor manera.

Por el contrario, cuando la señalización de TGF-  $\beta$  está presente durante un periodo extendido de 48 h, puede significar que en el tejido existe un daño grave que no ha sido reparado en un tiempo ideal, por lo tanto, los neumocitos tipo II deben aumentar la expresión de Scleraxis (Fig. 8) para ayudar a reparar este daño mediante la síntesis de colágena.

Otra posible explicación de la respuesta observada en el caso de las células epiteliales de rata, es que fueron estimuladas con TGF- $\beta$  recombinante de origen murino, mientras que las A549, cuyo origen es humano, fueron estimuladas con TGF- $\beta$  recombinante humano. Esta deficiencia en la respuesta en el caso de las RL6-Tn, podría deberse a una inespecificidad del estímulo utilizado. En cualquier caso, será necesario evaluar los niveles y expresión de SCX en respuesta a TGF- $\beta$ , a tiempos distintos, ya que cabe la posibilidad de que el tiempo de estímulo al

cual se exploró, SCX haya sido degradada, razón por la cual no nos es posible detectar una correlación entre su expresión y los niveles de proteína.

En lo que respecta a los niveles de proteína en fibroblastos, es notoria la diferencia que existe entre los fibroblastos normales (NOVA y CCD25) y aquellos que provienen de un ambiente fibrótico (HIPF 231 y HIPF 286), como fue mencionado antes los fibroblastos necesitan diferenciarse a miofibroblastos para poder aumentar su síntesis de colágena y otras proteínas de matriz extracelular [16]. Los fibroblastos normales, aun cuando son estimulados durante 48 h no logran expresar en cantidad suficiente la proteína SCX para poder ser detectada (Fig. 10). Sin embargo, observando la PCR se puede ver que los niveles de expresión de Scleraxis aumentan al doble o más, tanto en fibroblastos normales como provenientes de pacientes con FPI. Esto concuerda perfectamente con estudios que han reportado una mayor síntesis de colágena y expresión de SCX en fibroblastos aislados de cicatrices [10].

Esto quiere decir que si bien estas células están reaccionando ante el estímulo fibrótico, únicamente la presencia de TGF- $\beta$  no es suficiente para lograr una diferenciación y con ello una mayor síntesis de colágena. En el caso de los fibroblastos de FPI, la expresión de Scleraxis una vez que han sido estimulados aumenta a más del doble, tanto en la síntesis de proteína como en la transcripción a ARNm. Nuestros datos concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que se ha indicado que los fibroblastos presentes en los focos de fibroblastos no tienen un comportamiento clásico de este tipo celular, ya que muestran entre otras peculiaridades la de tener una síntesis descontrolada de colágena [4].

Aun en la ausencia de un estímulo estas células al ser de origen fibrótico poseen una expresión basal (Ctrl) de Scleraxis mucho mayor a la de los fibroblastos normales, en los que por Western Blot no es posible detectarla. Es probable que debido a la mayor síntesis de Scleraxis, también exista una mayor síntesis de colágena. Sin embargo, es necesario ampliar este estudio con el propósito de corroborar y determinar el mecanismo a través del cual el TGF- $\beta$  promueve un aumento en la expresión de SCX y con ello un fenotipo fibrótico.

## CONCLUSIONES

1. El TGF- $\beta$  induce el aumento en la expresión del factor de transcripción Scleraxis en fibroblastos de pulmón normal y de pacientes con FPI.
2. La expresión basal de Scleraxis en fibroblastos de pulmones de pacientes con FPI es considerablemente mayor que en fibroblastos provenientes de pulmón normal.
3. El TGF- $\beta$  induce el aumento en la expresión del factor de transcripción Scleraxis a nivel génico en células epiteliales A549 y MLE-12

## Perspectivas

1. Es necesario medir la expresión y niveles de colágena posterior a los estímulos para corroborar nuestras inferencias acerca del papel de scleraxis.
2. Es necesario medir la expresión de SCX después de 48 h para tener un conocimiento claro de cuál es el efecto de TGF- en tiempos más prolongados.
3. Es necesario evaluar estos resultados en tejidos completos para confirmar si los fibroblastos y células epiteliales reaccionan de la misma manera en un modelo más completo.

## REFERENCIAS

1. Travis, W.D., et al., *An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013. **188**: 733-748.
2. Talmadge, E.K., Pardo A., and Selman M., *idiopathic pulmonary fibrosis*. The Lancet, 2011. **378**: 1949-1961.
3. Buendia I., *Panoramica Actual de FPI en México*. 2014, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias: LXXIII Congreso Nacional de Neumología y Cirugía Torácica
4. du Bois, R.M., *strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis*. Nature Reviews. Drug Discovery, 2010. **9**: 129-140.
5. Ley, B. and H.R. Collard, *epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis*. Clinical Epidemiology, 2013. **5**:483-492.
6. Fox S., *Fisiología Humana*. 10 ed. 2008: Mc Graw-Hill. 775.
7. Selman M. and Pardo A., *revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2014. **189**:1161-1172.
8. Benjamin, D.B., Baran C., Eubank T. and Marsh C., *the role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Antioxidants & Redox Signaling, 2008. **10**: 287-301.

9. Desmoulière A., Darby I., Laverdet B. and Bonté F., *fibroblasts and myofibroblasts in wound healing*. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 2014 **7**: 301-311.
10. Czubryt M., *common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing*. Fibrogenesis & Tissue Repair, 2012. **5**: 19.
11. Hinz B., Phan S., Thannickal V., Prunotto M., Desmoulière A., Varga J., De Wever O., Mareel M. and Gabbiani G., *recent developments in myofibroblast biology : paradigms for connective tissue remodeling*. The American Journal of Pathology, 2012. **180**:1340-1355.
12. Bagnato G. and Harari S., *cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases*. European Respiratory Review, 2015. **24**: 102-114.
13. Darby I. and Hewitson T., *fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis*. International Review of Cytology, 2007. **257**:143-179.
14. Bainbridge, P., *wound healing and the role of fibroblasts*. Journal of Wound Care, 2013. **22**: 407-412.
15. Branton, M.H. and Kopp J.B., *TGF-beta and fibrosis*. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 1999. **1**: 1349-1365.
16. Yue, X., B. Shan, and J.A. Lasky, *TGF- : titan of lung fibrogenesis*. Current Enzyme Inhibition, 2010. **6**.
17. Principe D., Doll J., Bauer J., Jung B., Munshi H., Bartholin L., Pasche B., Lee C. and Grippo P., *TGF- : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis*. Journal of the National Cancer Institute, 2014. **106**.

18. Annes J., Munger J., and Rifkin D., *making sense of latent TGF activation*. Journal of Cell Science, 2003. **116**: 217-224.
19. Khalil N., Berezney O., Sporn M. and Greenberg A., *macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation*. The Journal of Experimental Medicine, 1989. **170**: 727-737.
20. Chen, Z., Y. Shao, and X. Li, *the roles of signaling pathways in epithelial-to-mesenchymal transition of PVR*. Molecular Vision, 2015. **21**: 706-710.
21. Gurzu, S., Turdean S., Kovacs A., Contac A. and Jung I., *epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: an update*. World Journal of Clinical Cases, 2015. **3**: 393-404.
22. Latchman D., *transcription factors: an overview*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1997. **29**:1305-1312.
23. Cserjesi, P., et al., *scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis*. Development, 1995. **121**: 1099-1110.
24. Espira L., Lamoureux L., Jones SC., Gerard RD., Dixon IM. and Czubryt M., *the basic helix. loop. helix transcription factor scleraxis regulates fibroblast collagen synthesis*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2009. **47**: 188-195.
25. Levay A., Peacock J., Lu Y., Koch M., Hinton R., Kadler K. and Lincoln J. *scleraxis is required for cell lineage differentiation and extracellular matrix*

*remodeling during murine heart valve formation in vivo.* Circulation Research, 2008. **103**: 948-956.

26. Livak K. and Schmittgen T., *analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-CT</sup> method.* Methods, 2001. **25**: 402-408.