



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Expresión de FAT 1 en fibrosis pulmonar idiopática

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALEJANDRA ESTEFANY FERRER BOLAÑOS



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE ANTONIO GARCÍA ALVAREZ
2016**



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.

“Expresión de FAT1 en Fibrosis Pulmonar Idiopática”

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Jorge Antonio

García Álvarez

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM proyecto IN220716 “Identificación de los mecanismos celulares regulados por FAT1 en Fibrosis Pulmonar Idiopática”.

También agradezco el apoyo de la Dra. Annie Pardo Cemo y del Dr. Moisés

Selman.

A la M. en C. Ma. De los Remedios Ramírez Rangel por el apoyo y la asesoría brindada en la técnica de inmunohistoquímica.

Al M. en C. David Medina Pérez por el apoyo técnico en el cultivo celular.

A la Dra. Yalbi Itzel Balderas Martínez por su apoyo técnico en la búsqueda informática.

Datos del alumno.

Ferrer Bolaños Alejandra Estefany

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305063034

Datos del Asesor.

Dr. García Alvarez Jorge Antonio

Datos de la tesis.

Expresión de FAT1 en fibrosis pulmonar idiopática

53pp

2016

Palabras clave (temas principales que trata la tesis):

Enfermedades intersticiales difusas, fibrosis pulmonar idiopática, FAT1, células epiteliales.

No dejes que el éxito se te suba a la cabeza, ni que el fracaso se te instale en el corazón.

“Dile que sí, aunque te estés muriendo de miedo, aunque después te arrepientas, porque de todos modos, te vas a arrepentir toda la vida si le contestas que no”

¡Sonríe! Hoy es un día excelente para estar orgulloso de ser quien eres.

¡Aviéntate! y en el aire te arrepientes.

A veces solo resistiendo el miedo hallarás la belleza del otro lado...

Y entonces te das cuenta que todo comienza de nuevo... y la sonrisa vuelve a ser la dueña de tu vida.



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres... porque me han sabido guiar para ser justo así como soy, no tengo las palabras que puedan describir con exactitud lo agradecida y orgullosa que estoy de ustedes, son unos excelentes papás ¡LOS AMO!

A mis yemanos ya que siempre han tenido el consejo, regaño o motivación para alentarme a explotar mi intelecto, los admiro en demasía. Te incluyo aquí Baru porque eres como mi hermano gracias por todo el apoyo que me han brindado.

Zu y Baru por regalarme esos hermosos sobrinos que son un motor más en mi vida.

A mis primas Marlen, Mariana, Miriam y Paola, (las puse en orden alfabético para que no empiecen jajaja). Gracias por hacer este camino llamado vida más alegre, por enseñarme el valor de la familia y por estar siempre ahí, ¡LAS ADORO!

A mis abuelos (los 4) porque sé que están felices y orgullosos de mi... ¡LOS EXTRAÑO!

A mi tutor Jorge Antonio García Álvarez, por todo el apoyo, la paciencia y comprensión para realizar este trabajo, porque has sido el mejor (créeme tuve varios tutores), tanto que me animé a intentar el posgrado, en serio gracias por todas las enseñanzas y por hacer tan agradable mi estancia en el laboratorio.

Al amor (en todos los aspectos), por que sin él, no podría haber logrado llegar a este punto, gracias por el cariño, la comprensión durante este largo proceso, por esas pequeñas pero importantes cosas y sobre todo porque es algo tan complejo y hermoso que le da un toque especial a mi persona.

A mis mejores amigos de la carrera que los considero parte de mi Familia, mi BESTAMIGO Pedrito que aunque no tengamos mucho contacto sé que siempre estuviste y estarás para mí, Lucía no puedo decirte nada que no sepas así que solo te doy las gracias por ser y estar, te amo, Claudia como te lo dije en tu día eres una gran amiga y un ejemplo a seguir.

Arturo la verdad no pensaba escribirte aquí, sin embargo tengo muchísimas cosas que agradecerte me enseñaste tanto y de diferentes maneras (buenas y malas) de las más importantes son que siempre debemos seguir nuestros sueños, así como buscar lo que nos haga felices. Gracias por compartir esos años de tu vida conmigo.

A mis amigos Oscar (politiqueño), Blanquita (por esas sanas comidas en los tacos de bistec y los huesotes así como los consejos y chismes), a ambos porque siempre estuvieron ahí soportando y escuchando taaantas cosas que me pasaron en este tiempo.

A Manuel porque creo has soportado de las peores cosas de este proceso que fue el estrés de los trámites, gracias por ser una gran persona, por estar, entender, disfrutar y hacer, después de 11 años el prólogo de la historia se empieza a escribir... y no, no te puse por compromiso "simplemente gracias por confiar y creer en mí".

En general a toda mi familia porque son un pilar. (Mike, por brindarme el apoyo para seguir y trabajar).

NO AGRADECIMIENTOS

Tenía que hacer esta lista porque se esmeraron para permanecer aquí.

David por tus comentarios sarcásticos y tu poca fe en mí, aaah y por la envidia de que soy la "CONSEN", hasta el casi ultimo día sacaste tu odio hacia mi.

Yahir "mi peor enemigo" por siempre estar en mi lugar y darme consejos tan sabios como "tomar un avión y huir lejos".

Luis por ser tan princesa, reírte de mí, hacer visibles mis defectos físicos y por espantarme en el laboratorio, así como las tardes de cine, comidas, caminatas, pláticas (sobre todo sarcasmos y warradas jajaja)... ¡Eres especial para mi!

Juan y Andrea aunque ustedes no deberían estar aquí porque siempre fueron lindos conmigo.

Ya en serio, les agradezco sus comentarios y que dejaran de lado sus cosas importantísimas de doctorado para ayudarme con las mías de licenciatura, de verdad muchísimas gracias por toda la ayuda para que realizara este trabajo, los aprecio mucho, gracias por las risas, las comidas y los bellos momentos que me regalaron....

ÍNDICE

1. Abreviaturas.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Sistema respiratorio.....	2
2.2 Enfermedades respiratorias.....	2
2.3 Neumonitis por hipersensibilidad.....	3
2.4 Fibrosis pulmonar idiopática.....	6
2.5 Cadherinas.....	8
2.6 FAT 1.....	10
3. Justificación.....	14
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos.....	15
5.1 General.....	15
5.2 Específicos.....	15
6. Métodos.....	15
6.1 Búsqueda en base de datos.....	16
6.2 Extracción de RNA.....	16
6.3 Cuantificación de RNA.....	16
6.4 Tratamiento con Dnasa.....	17
6.5 Síntesis del cDNA.....	17
6.6 PCR en tiempo real.....	19
6.7 Inmunohistoquímica.....	19
6.8 Cultivo de células A549.....	21
6.9 Expresión de FAT1 en células A549.....	21
7. Resultados.....	22
7.1 Búsqueda en bases de datos.....	22
7.2 Validación por PCR no cuantitativo de punto final.....	23
7.3 Comparación de FPI vs controles por PCR en tiempo real.....	24
7.4 Localización celular por Inmunohistoquímica.....	28

7.5 Expresión de Fat1 en células A549.....	33
8. Discusión.....	35
9. Conclusiones.....	38
10. Literatura consultada.....	39
11. Apéndices.....	45

Abreviaturas

µg	Microgramo
µl	Microlitro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPID	Enfermedades pulmonares intersticiales difusas
FAT1	Hace referencia al nombre de la proteína
Fat1	Hace referencia al gen
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
MEC	Matriz extracelular
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NH	Neumonitis por Hipersensibilidad
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa
TGFβ1	Factor de Crecimiento Transformante b1

Introducción.

Sistema Respiratorio.

El sistema respiratorio es el encargado de captar el oxígeno del aire e introducirlo en la sangre, este intercambio gaseoso se realiza específicamente en los alveolos y estos se encuentran en el pulmón; las paredes alveolares están formadas por células epiteliales y están cubiertas por una extensa red de capilares sanguíneos. El epitelio alveolar está compuesto por diferentes tipos de células: los neumocitos tipo I que son células con morfología plana, con un núcleo sobresaliente y los neumocitos tipo II que tienen los bordes redondeados y superficie con vellosidades; este tipo celular produce el factor surfactante, una mezcla de fosfolípidos y proteínas cuya función es reducir la tensión superficial, permitiendo así la dilatación y la distensión de los alveolos sin peligro de colapsar durante el proceso de ventilación, al mismo tiempo que provee humedad a la superficie para llevar a cabo un intercambio gaseoso eficiente (1).

Enfermedades respiratorias

Existe un grupo amplio y muy heterogéneo de padecimientos que afectan al parénquima respiratorio conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). Estos padecimientos afectan no sólo al intersticio pulmonar sino también a las unidades alvéolo-capilares, y frecuentemente a las vías aéreas pequeñas incluyendo bronquiolos terminales, bronquiolos respiratorios y ductos alveolares.

Se han descrito más de 150 diferentes EPID las cuales varían en etiología, mecanismos patogénicos, características histopatológicas y curso clínico, pero se agrupan juntas porque comparten rasgos clínicos (disnea de esfuerzo progresiva), imagenológicos y funcionales respiratorios (patrón restrictivo con hipoxemia de reposo que se exacerba con el ejercicio), así como volúmenes del pulmón reducidos y un intercambio gaseoso afectado (2).

Las causas más comunes de EPID son la exposición a partículas inorgánicas (sílice, asbesto), partículas orgánicas (proteínas de aves, hongos, bacterias termofílicas), uso de diversos medicamentos y algunas enfermedades sistémicas como sarcoidosis o autoinmunes como la esclerosis sistémica progresiva o artritis como ejemplo, hablaré un poco de la neumonitis por hipersensibilidad (3).

Neumonitis por hipersensibilidad.

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) o alveolitis alérgica extrínseca es un síndrome pulmonar complejo de intensidad variable que resulta de la exposición continua a partículas orgánicas mencionadas anteriormente. Se caracteriza por la presencia de una respuesta inflamatoria monocelular en forma difusa del parénquima pulmonar.

La presentación clínica es heterogénea: la NH se puede presentar en forma aguda y crónica, dependiendo, de factores como la intensidad de exposición al antígeno o el tipo de respuesta inmune. (4-5). Dadas la gran variabilidad de presentaciones y de curso clínico, se han propuesto otras clasificaciones, por ejemplo, la que divide a la enfermedad en activa intermitente no progresiva, aguda intermitente progresiva y crónica tanto progresiva como no progresiva (6). Sin embargo, la clasificación más utilizada es la de presentación aguda, subaguda y crónica.

La forma aguda se produce generalmente después de la exposición intensa a cantidades masivas del antígeno en un corto período de tiempo. Los síntomas y signos clínicos aparecen abruptamente al cabo de 4 a 8 horas de la inhalación y se caracterizan por disnea intensa, fiebre, y tos, los que habitualmente desaparecen en pocos días si no hay nuevo contacto. Esta forma clínica puede ser difícil de identificar ya que los síntomas pueden confundirse con una infección bacteriana o viral.

La forma subaguda generalmente ocurre tras inhalaciones continuas pero no masivas del agente causal. Los síntomas aparecen de forma insidiosa durante unas

semanas y consisten en malestar general, astenia (debilidad o fatiga general), pérdida de peso, tos seca y disnea que puede llegar a ser severa con cianosis (coloración azul o lívida de la piel) e incluso requerir hospitalización. Es importante destacar que la forma subaguda puede evolucionar en un porcentaje variable a la forma crónica si el paciente sigue teniendo contacto con el antígeno.

Finalmente, la forma crónica se caracteriza por disnea de esfuerzo progresiva, tos, fatiga y pérdida de peso, con ausencia de episodios agudos. En general ocurre en individuos que se encuentran expuestos de manera crónica a la inhalación de pequeñas cantidades de antígenos, como por ejemplo, aquellos que tienen en sus hogares aves de ornato. En esta fase, la enfermedad es clínicamente indistinguible de una fibrosis pulmonar de cualquier otra etiología, en este estadio, la eliminación de la exposición al agente causal puede producir la estabilización o una discreta mejoría sintomática, pero la mayoría progresa y fallece de la enfermedad en un promedio de 5 a 10 años después del diagnóstico (6-7).

La NH es muy probablemente, resultado de un doble proceso, es decir que, además del antígeno inhalado, existen cofactores que facilitan su desarrollo. Sin embargo estos factores promotores no han sido identificados. Un gran número de individuos están expuestos a factores de riesgo etiológicos pero sólo unos cuantos desarrollan la enfermedad, por lo que es evidente que existen factores de riesgo independientes que deben de estar implicados. Debido a esto, la NH debe considerarse como una enfermedad multifactorial, resultado del efecto de la exposición a partículas orgánicas así como a otros factores ambientales o del huésped y a la susceptibilidad genética. (8).

En México la causa más frecuente de esta enfermedad se relaciona con la exposición a diferentes tipos de aves. El padecimiento parece ser frecuente y aunque la magnitud del problema en el país no se conoce con precisión, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se atienden en promedio 70 a 80 casos nuevos por año, y se reciben solicitudes de interconsulta adicional de un

número similar de pacientes (6). De manera relevante, los pacientes con NH aguda o subaguda generalmente responden al manejo terapéutico mientras que los pacientes con NH en su forma crónica, evolucionan frecuentemente con una destrucción irreversible del pulmón por fibrosis.

Debido a que el pronóstico difiere en las distintas formas de NH, el hacer un diagnóstico preciso es de suma importancia. En general los cambios observados por histopatología son similares, independientemente del antígeno causal de la NH, pero dependiendo de la cronicidad de la misma se encuentran algunas diferencias. En las formas agudas estos datos son poco precisos, ya que rara vez se realiza una biopsia quirúrgica; en cambio, en las formas subagudas los rasgos patológicos están bien definidos y son ampliamente conocidos. En su forma clásica encontramos un discreto infiltrado inflamatorio intersticial crónico, el cual se encuentra centrado a la vía aérea e involucra la pared bronquiolar (9). Hasta en el 70% de los casos se hallan en forma aislada células gigantes intersticiales o granulomas pobremente formados, aunque su ausencia no debe alterar el diagnóstico de la misma (10). En algunas ocasiones, se llega a observar una distribución mucho más homogénea del infiltrado inflamatorio intersticial.

Los rasgos histológicos de la NH están dados en general por la presencia de bronquiolitis, alveolitis linfocítica y granulomas mal formados; (11) los granulomas se caracterizan por un prominente infiltrado linfocitario a nivel intersticial que con frecuencia es en parches, y que usualmente se inicia cerca del bronquiolo terminal y se extiende hacia el parénquima pulmonar, lo que representa una inflamación pulmonar bronquiolocéntrica, la que en las formas agudas de NH nos dará una bronquiolitis de tipo proliferativo endobronquial, mientras que la persistencia del proceso inflamatorio bronquiolar y peribronquiolar en los casos crónicos se asocia con fibrosis de proporciones variables dando así una bronquiolitis de tipo constrictivo (12-13).

Fibrosis pulmonar idiopática.

Otro ejemplo de EPID es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) la cual es el resultado final de un grupo diverso de desórdenes pulmonares conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales o neumonías intersticiales idiopáticas; la fibrosis resulta del daño crónico al parénquima pulmonar y se caracteriza por la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC), principalmente colágena fibrilar (14). Es una enfermedad crónica, progresiva y frecuentemente letal de etiología desconocida, que parece surgir de la interacción entre factores genéticos y ambientales antes mencionados.

La FPI es el desorden pulmonar fibrótico más agresivo, incluso cuando no hay complicaciones adicionales la mayoría de los pacientes sobrevive entre dos y cinco años después de que se confirmó la enfermedad y se encuentran generalmente entre los 50 y 70 años de edad al momento en el que se presenta. De estos, cerca de dos terceras partes son mayores de 60 años de edad. Se estima que la incidencia de esta enfermedad es de 7 en mujeres y de 10 en hombres por cada 100,000 habitantes. Además la incidencia, prevalencia y tasa de muerte se incrementan con la edad.

A diferencia de cualquier fibrosis que aparece después de un proceso inflamatorio, la hipótesis vigente señala que en la FPI existe un daño al epitelio alveolar, seguido de la producción de mensajeros químicos profibrosantes, que tratan de conducir un proceso de reparación pero que por razones aún no esclarecidas, nunca se resuelve y sobreviene la fibrosis.

Para realizar un diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza una tomografía de alta resolución de los pulmones, en donde se revela la presencia de una zona de fibrosis alternada con áreas de tejido pulmonar normal. Se caracteriza principalmente por: a) la activación de fibroblastos dependiente de epitelio, provocando la migración y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, ambos conforman agrupamientos particulares, b) células contráctiles que tienen

características tanto de fibroblastos como de células de músculo liso (15), c) un aumento en la síntesis y activación de citocinas fibrogénicas (TGF- β , TNF- α , PDGF e IGF, entre otros), d) un depósito exagerado de moléculas de matriz extracelular que trae como consecuencia la desorganización de la arquitectura del parénquima pulmonar (16), y e) la ausencia de la reparación epitelial por parte de neumocitos tipo I, además de un metabolismo alterado de la MEC. (3, 17-18).

La causa del daño epitelial es desconocida; es probable que no se trate de un mecanismo único, sino de una combinación de daños que potencialmente contribuyan al desarrollo de la enfermedad.

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante en los tejidos conjuntivos no cartilagosos y participan en su fisiopatología. Lo hacen activamente en la producción y remodelación de la matriz extracelular y se encargan principalmente de la producción de colágena, esencialmente los tipos I y III, fibras elásticas, proteoglicanos, fibronectina y otras glicoproteínas. Las células epiteliales no solo sintetizan numerosos factores que favorecen el desarrollo de la fibrosis, muchos autores sugieren que son capaces de transformarse en fibroblastos, mediante un complejo proceso que ocurre en el desarrollo embriológico conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), implicando la capacidad migratoria, resistencia a la apoptosis, incremento de matriz extracelular y la evidente degradación de la membrana basal. Este proceso biológico que es fundamental durante el desarrollo embrionario tiene consecuencias adversas en la vida adulta ya que aumenta exageradamente el número de fibroblastos en el tejido dónde ocurre. (14). Debido a la complejidad de los procesos que ocurren en la FPI y para conocer de manera global que moléculas se encuentran reguladas diferencialmente, se han abordado diferentes estrategias. Una de ellas fue el estudio de expresión múltiple realizado por Selman M. y colaboradores (14), en el cual se identificó que el mRNA de un gran grupo de genes que se encuentra expresado diferencialmente en FPI con respecto a pulmones controles. Curiosamente, muchos de esos genes son muy expresados en etapas tempranas

del desarrollo embrionario y son genes que regulan (en muchos casos) la morfogénesis, la proliferación y la migración celular (14), uno de esos genes es Fat1.

Cadherinas.

El desarrollo correcto de organismos multicelulares es dependiente de los contactos célula—célula. Por ello, cuando las proteínas involucradas en este proceso son reguladas de manera aberrante, ya sea temporal o espacialmente, resulta en patologías celulares, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, de riñón y enfermedades metabólicas.

En los años 70s, Takeichi (19), demostró que las proteínas con unión a iones de calcio eran esenciales para los procesos de adhesión celular. Estas proteínas de unión a calcio fueron referidas posteriormente como adherinas dependientes de calcio o cadherinas.

Las cadherinas son las principales moléculas que forman parte de las moléculas de adhesión celular (CAM), son glicoproteínas transmembranales y son responsables de la adhesión célula-célula dependiente de Ca^{2+} en tejidos de vertebrados, las cadherinas son una superfamilia que está relacionada con funciones de reconocimiento celular (20).

En vertebrados, generalmente se considera a seis subfamilias que incluyen a las cadherinas clásicas tipo I y tipo II (Tabla 1), cadherinas con siete inserciones transmembranales y cadherinas Fat.

Cadherinas clásicas	
• Cadherina E	En muchos tipos de epitelios.
• Cadherina N	En células musculares, nerviosas y de cristalino.
• Cadherina P	En placenta y epidermis.
Cadherinas no clásicas	
• Cadherinas de los desmosomas	Desmogleina y desmocolina
• Protocadherinas	Más de 50 tipos distintos entre ellos FAT, FAT2, FAT4
• Cadherina T	No tiene función de adhesión.

Tabla 1. Subfamilias de Cadherinas.

Subfamilia Fat.

El nombre de la familia de genes Fat se originó de los fenotipos mutantes de *Drosophila*. Comprender las funciones de las cadherinas Fat ha sido un reto, en parte debido al tamaño extremadamente largo de los transcritos del mRNA de las cadherinas Fat y por ende, al tamaño de las proteínas.

Los miembros de la subfamilia FAT son estructuralmente conservados desde las moscas hasta los vertebrados. *Drosophila* tiene dos genes miembros de esta familia, fat (ft) y fat2 (ft2) (también conocido como Kugelei o tipo Fat). En vertebrados el número se expande a cuatro genes, e incluye a Fat1, Fat2, Fat3 y Fat4. El análisis de secuencias génicas de las cuatro cadherinas Fat de vertebrados y sus ortólogos en moscas sugiere que Ft es estructuralmente similar a Fat4, mientras que Ft2 es el ortólogo en mamíferos de Fat1, Fat2 y Fat3. De estos tres miembros Fat de vertebrados, Fat1 y Fat3 son más semejantes entre ellos mientras que Fat2 es considerado filogenéticamente único.

Fat1.

De la subfamilia FAT mencionada anteriormente, Fat1 es un gen perteneciente a esa subfamilia y evidentemente a la superfamilia de las Cadherinas. Es un gen ortólogo (en *Drosophila* codifica para una proteína con actividad supresora de tumores) (21).

El gen humano Fat1 fue clonado en 1995 en una línea celular leucemia-T, tiene 27 exones localizados sobre el cromosoma 4q34-35, con 395 pares de bases. (22).

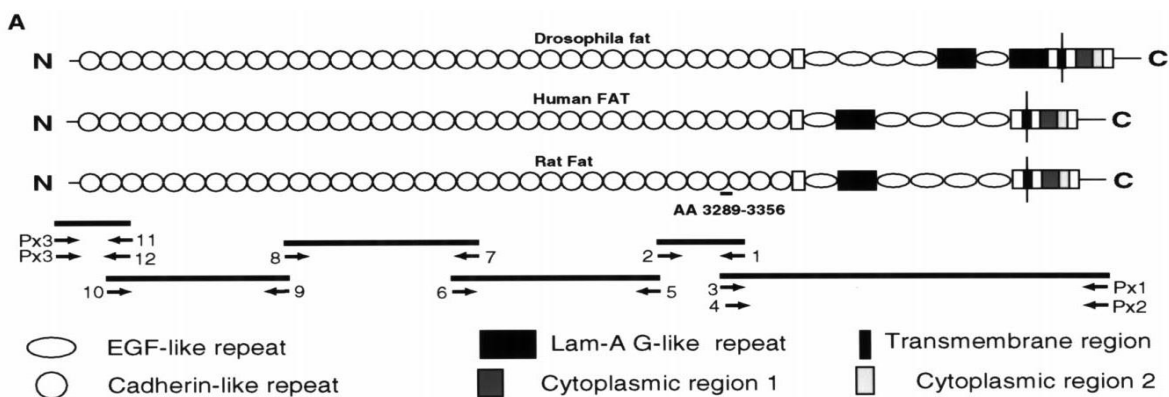


Figura 1. Estructura de FAT en diferentes vertebrados (*Drosophila*, Humano y Rata).

La localización de Fat1 por hibridación *in situ* de tejidos humanos reveló niveles altos del transcrito en epitelios fetales y sugirió una función en la biología del desarrollo como se puede observar en la tabla 2 (22). La subsecuente clonación y análisis del gen de ratón mostró que la expresión fue iniciada en la pre-implantación de los embriones cuando las células comienzan a compactarse. También se encontró localización prominente post-implantación dentro de las regiones craneales, así como en los primordios de las extremidades, somitas y tubo neural. Esta expresión fue sub-regulada cuando las células ya no se dividieron (23).

En adultos se tiene menos información, aunque en general, su expresión es sub-regulada o ausente después de la organogénesis y la diferenciación terminal. El análisis de los tejidos humanos adultos también mostró comparativamente, bajos niveles del transcrito en algunos epitelios. Sin embargo, hay reportes que indican

que la expresión de Fat1 es reducida en riñón de mamífero adulto, pero se mantiene cierto nivel de expresión por lo que podría funcionar en el desarrollo y mantenimiento de este órgano (22).

No existe información sobre la unión de ligandos extracelulares para FAT1 de vertebrados. En contraste a la ausencia de información de las interacciones con el dominio extracelular, los datos indican que la cola citoplásmica de FAT1 puede actuar por sí misma como un componente de señalización, utilizando una proteína quimera compuesta de los dominios transmembranal y citoplásmico de Fat1 humana, fusionados con el dominio extracelular de E-cadherina. Magg y colaboradores mostraron que la cola citoplásmica de Fat1 fue cortada proteolíticamente por el complejo enzimático de secretasa gamma. La cola citoplásmica pudo ingresar al núcleo por una señal de localización nuclear que posee, aunque la función del corte del dominio citoplásmico de FAT1 y su translocación nuclear no ha sido monitoreada, sugiere que el dominio citoplásmico podría tener un papel directo en la regulación de la transcripción (24).

Resultados de la hibridación <i>in situ</i> de FAT	
Tejido fetal	Señal
Ojo	Epitelio de la cornea + a +++
Riñón	Epitelio distal tubular
Pulmón	Alveolos y vías aéreas ++ a +++ músculo liso +
Páncreas	Epitelio acinar +++

+ Señal detectable, ++ señal intermedia, +++ señal intensa, N.D. no detectable.

Tabla 2. Resultados de hibridación de FAT *in situ* (22).

La función mejor atribuida a FAT1 es la migración celular, la polaridad y la interacción célula-célula. FAT1 interactúa con las proteínas Ena/VASP; La familia de proteínas Ena/VASP se cree que desempeñan un papel importante en la vinculación de las vías de señalización a la remodelación del citoesqueleto de actina, también está implicada en la motilidad celular. La migración celular requiere regulación coordinada de protuberancias celulares, célula-matriz o de adhesión célula-célula, fuerzas de contracción y desprendimiento posterior (25). En los

fibroblastos, las proteínas Ena/VASP regulan el paso de protrusión de la motilidad mediante el control de la geometría de las redes de actina dentro de lamelipodios (26).

Dichas proteínas también están implicadas en muchos otros procesos de actina-dependiente, incluyendo guía de axones, cierre del tubo neural, la atenuación de la agregación plaquetaria, la activación de células T, la fagocitosis, la adhesión célula-célula y el movimiento intracelular de la bacteria patógena *Listeria* (27).

En 2003 Ciani L y col. diseñaron el ratón *KO* de *Fat1* y se dieron cuenta que los ratones morían dentro de las 48 horas después del nacimiento, esto se debe a una falla en la unión de los podocitos en el riñón. En adición a la falla del riñón neonatal, las crías del *KO* *Fat1* también mostraron en varios casos, defectos severos de la línea media, incluyendo holoprosencefalia, microftalmia, anoftalmia y en casos raros ciclopía. Estos defectos del desarrollo severos en el sistema nervioso central, son consistentes con la alta expresión de *Fat1* vista en el neuroepitelio. La penetrancia incompleta fue tomada por los autores como el resultado de una compensación parcial por otros miembros *Fat*. Estos hallazgos sugieren que *FAT1* tiene una función fundamental dentro del desarrollo del Sistema Nervioso Central y el riñón. No debería sorprendernos que se encuentre implicada en otras anomalías del desarrollo (22).

Por otro lado se ha encontrado que la cola citoplásmica de *FAT1* humana une a miembros de la familia *homer*, específicamente a *HOMER-1* y *HOMER-3*. Las proteínas de la familia *Homer* son proteínas de andamiaje y muestran distribución tisular realizando papeles específicos en señalización del sistema inmune y el desarrollo así como el mantenimiento del sistema nervioso, es por esto que si se alteran las interacciones *FAT1-HOMER* se pueden explicar la penetrancia parcial de los fenotipos de sistema nervioso central observados en el ratón *KO* de *Fat1* (22).

Un segundo mecanismo por el cual *FAT1* puede regular la migración celular es vía la unión del represor transcripcional *Atrofina*. La interacción fue reconocida

primero en *Drosophila* donde Ft mostró interactuar con Atrofina con efectos funcionales sobre la polaridad celular y funciones similares se mantienen en células vasculares de músculo liso por FAT1 en mamíferos (23).

Finalmente, la ausencia de FAT1 llevó a la pérdida de polaridad celular y a una cicatrización desorganizada en ensayos de herida; en 2006 Hou R. y colaboradores comprobaron que el efecto de la disminución de la expresión de Fat1 es que disminuye la migración de células de músculo liso a través de experimentos de herida ya que el silenciamiento con RNA de interferencia para apagar la expresión de Fat1, provoca un retardo en la migración celular de Células de músculo liso (21).

Además de regular la migración celular, se postula que FAT1 podría iniciar las vías de señalización de Wnt e Hippo, vía interacciones con beta catenina y scribble, respectivamente (28). La primera hipótesis fue que FAT1 podía potenciar la unión de beta catenina y así regular la vía de señalización de Wnt basada en la presencia del motivo concenso (FC1/FC2) comúnmente encontrado en el sitio de unión de beta catenina en cadherinas clásicas. Esta interacción fue confirmada posteriormente en estudios en donde se observó incremento en la expresión de Fat1 después del daño a la arteria carótida en rata, en este estudio el silenciamiento de Fat1 limitó el crecimiento, pero promovió la migración de las células vasculares de músculo liso después del daño arterial, mientras que la sobre-expresión de Fat1 resultó en sub-regulación de ciclina D1, un conocido promotor del ciclo celular blanco de la transcripción génica de beta catenina (28).

Justificación.

A la fecha, los datos de expresión múltiple no se han corroborado ni se conoce la localización y probables funciones de esta cadherina en FPI, la cual es una enfermedad letal y por ello es conveniente conocer los mecanismos que la originan y las causas. Falta mucho por conocer para encontrar las terapias pertinentes que permitan dar tratamiento a las personas que padecen FPI.

Esta investigación permitirá inicialmente corroborar el dato obtenido por microarreglos utilizando como material biológico tejido de biopsias de pacientes con FPI que se obtiene con fines de diagnóstico (donados por el INER) y controles (tejido pulmonar sano), mediante la técnica de PCR en tiempo real; posteriormente conocer la localización celular de la proteína en cortes histológicos de pulmón control y de pacientes con FPI.

Hipótesis.

Fat1 se encontrará sobre-expresada en tejido pulmonar de pacientes con FPI y se localizará en las células del epitelio alveolar de pulmones con Fibrosis Pulmonar Idiopática.

Objetivo general.

Analizar si la expresión de Fat1 se encuentra sobre-expresada en pulmones con FPI con respecto a controles y evaluar la localización celular de la proteína en cortes histológicos provenientes de los pacientes.

Objetivos específicos.

En tejidos:

- a) Corroborar los datos de microarreglos por PCR en tiempo real para FPI, tomando como controles: pulmón normal y con NH.
- b) Observar la localización de la proteína en los tejidos de pulmón normal, de NH y de FPI.

En células epiteliales alveolares (línea inmortalizada de neumocitos tipo II, A549).

- c) Analizar el efecto de TGF- β 1 sobre la expresión de FAT1 en células epiteliales alveolares (línea inmortalizada de neumocitos tipo II, A549).

Material y método.

Material biológico.

Biopsias: Se utilizará el material biológico extraído de biopsias de pacientes con FPI y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH), con consentimiento del comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas". Las muestras de pulmón control utilizadas para comparar con la patología fueron RNAs comprados comercialmente, por la dificultad que implica obtener biopsias de

pulmones sanos. Los cortes histológicos embebidos en parafina, fueron obtenidos de la misma manera. Las células A549 fueron obtenidas de la American Type Cell Culture (ATCC).

Búsqueda en Bases de Datos.

Se revisó la base de datos GEN EXPRESION OMNIBUS (GEO) NCBI, de donde se obtuvieron y se analizaron los archivos encontrados, con la finalidad de corroborar los datos obtenidos en el ensayo de microarreglos,

Extracción de RNA.

Se utilizó la técnica de extracción con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA); en la que brevemente: a 50mg de tejido se le agregó 1ml de TRIzol, se homogenizó y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se le agregó 200µl de cloroformo y se agitó vigorosamente. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 15 minutos, en este paso se vieron las 3 fases de la solución. Se extrajo la fase acuosa que pertenece al RNA 400µl y se trasladó a un tubo previamente preparado con 500µl de isopropanol, se congeló por una noche, posteriormente se descongeló y centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se retiró todo el isopropanol para dejar la pastilla del RNA y se agregó 1ml de etanol al 75%, se mezcló y nuevamente se centrifugó ahora a 7500rpm por 5 minutos a 4°C. Se dejó secar, se resuspendió con 35µl de agua DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1% y se congeló por una noche.

Cuantificación de RNA.

Se descongeló la muestra y se mezcló en un agitador (vortex) e inmediatamente se colocó en hielo. El RNA fue cuantificado en un NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, DE), el cual previamente se limpió, se colocó 1µl de la mezcla de RNA y

se contabilizó con el programa NanoDrop 2000.

El coeficiente de extinción del RNA es de 40.0 y la máxima absorbancia de los ácidos nucleicos ocurre a una longitud de onda de 260nm, por lo que la concentración se calculó con la siguiente fórmula (29):

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{A}_{260} \times \text{dilución} \times 40) / 1000$$

Tratamiento con DNasa.

Se utilizó 1µg de RNA, se le agregó 7µl de agua dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% como inhibidor de la actividad de RNAsas, después se agregó 1µl de buffer de DNasa 10x (*invitrogen*) y 1µl de DNasa 1U/µl (*invitrogen*), se incubó a temperatura ambiente por 15min, pasado el tiempo se le agregó 1µl de EDTA 25mM. Se incubó la muestra a 65°C por 10 minutos para desnaturalizar la DNasa. Posteriormente se le agregó 1.5µl de agua DEPC al 0.1% para tener 12.5µl y seguir con la técnica del RT-PCR.

Síntesis del cDNA.

Se usó el RT-for-PCR Kit (Clontech, Mountain View CA), siguiendo las indicaciones del proveedor: Se descongeló la muestra y se colocó rápidamente en hielo, se le agregó 1.5µl de agua DEPC y 1µl de hexámeros al azar 20 pmol (Kit *Clontech*), se incubó dos minutos a 70°C en termociclador BioRad CFX96 y antes de que bajara la temperatura se colocó en hielo, posteriormente se le agregó la mezcla de reacción (Kit *Clontech*):

Reactivo	Volumen
Solución amortiguadora o <i>buffer</i> 5X	4µl
dNTP's 0.5Mm	1µl
Inhibidor de RNAsas 1u/µl	0.5µl
Transcriptasa Reversa 200u/µl RNA	1µl
Total	6.5µl

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la síntesis del cDNA.

Se mezcló con la micropipeta y se llevó nuevamente al termociclador BioRad CFX96: 42°C por una hora y 94°C por cinco minutos. Finalmente se agregó 80µl de agua DEPC al 0.1% para tener una concentración teórica final de cDNA 10ng/µl, para corroborar que se haya obtenido el cDNA, se realizó una PCR de punto final para amplificar un gen constitutivo, el de la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), con los siguientes oligonucleótidos específicos:

Sentido 5´ CCCCTTCATTGACCTCAACT3´

Antisentido 5´ TTGTCATGGATGACCTTGGC3´

La reacción se llevó a cabo con 2µl de cDNA, treinta ciclos de 94°C 20", 60°C 20" y 72°C 25". Para conocer el resultado, los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%.

PCR en tiempo real.

La reacción se llevó a cabo con los siguientes reactivos:

Mezcla	1x
Solución amortiguadora para PCR 10X	1.2µl
MgCl ₂ 50Mm	1.2µl
dNTP's 4Mm	1.5µl
TaqPlatinum (0.6U)	0.15µl
Sonda TaqMan 20X con 1µl cDNA.	0.5 µl
Agua DEPC al 0.1%	9.2µl
cDNA	1µl
Total	15µl

Tabla 4. Mezcla de reactivos utilizada para PCR convencional.

Se efectuó por 40 ciclos de dos tiempos 95°C 15" y 55°C 30" en el termociclador Bio Rad CFX96 los datos de fluorescencia se analizaron con el software CFX Manager. Para el análisis se utilizaron sondas TaqMan (*Applied Biosystems*) para Fat1 y los datos se ajustaron con la expresión del gen constitutivo para rRNA18s, analizando el ciclo umbral (Ct) de ambos genes en cada muestra, se realizó el análisis estadístico t de Student para observar si hay diferencia entre los grupos.

Inmunohistoquímica.

Los tejidos se desparafinaron en Xilol 30 minutos, se rehidrataron con etanol absoluto, al 95% y al 50% cada uno por 5 minutos, se incubaron con agua desionizada estéril por 10 minutos. Se incubaron 30 minutos en peróxido de hidrogeno al 3% en metanol, para eliminar la peroxidasa endógena (30ml de agua + 270ml de etanol).

Se expuso el antígeno poniendo las laminillas en buffer de citratos 0.1M pH6, y posteriormente hirviendo en horno de microondas (*Samsung*), 4 minutos a potencia 10 (hasta el primer hervor, se paró y se volvió a poner a hervir así hasta que trascurrieron los 4 minutos.) y posteriormente se dejó 4 minutos a potencia 3.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 25 minutos. Se colocó con suero normal por 30 minutos, y después se incubó con el suero específico (el control negativo del experimento se dejó con el suero universal), el anticuerpo FAT1 (NBP1-84565, Novus Biological) se incubó a una concentración de 7.5µg/ml en una dilución 1:40 a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se enjuagaron las laminillas con Buffer Salino de Fosfatos con Tween-20 al 1% dos veces. Se le agregó el segundo anticuerpo secundario biotinilado (*MultiLink*. Universal, BioGenex) se dejó incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. Se lavó con PBS 1x/1L por 5 minutos, se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 20 minutos. Posteriormente se lavó con PBS 1x/1L durante 5 minutos.

Se reveló con el kit de Peroxidasa AEC (*Biomeda*) siguiendo las instrucciones del fabricante: (1 gota de cromógeno 1x en 2ml de agua y 0.5ml de buffer del *kit*). Se siguió la reacción hasta que cambió de color, se destiñó con agua. Se realizó tinción con hematoxilina para contrastar, por 12 segundos aproximadamente. Se enjuagó con agua corriente y posteriormente en bicarbonato 0.05M, finalmente se sumergió en agua corriente una vez más. Para proteger la marca en el tejido se usó una gota de cristal mount (*Biomeda*) y se colocó en un horno de secado (J. M. Ortiz) a 50°C, aproximadamente 15 minutos. Por último se cubrió con una gota de resina (*Clarion de Biomeda*, Foster City CA) y con el portaobjetos.

Cultivo de células epiteliales alveolares (línea inmortalizada de neumocitos tipo II, A549), ver apéndice 1.

Se prepararon 900ml del medio F12K *GIBCO*, se le agregó 1.176gr de NaHCO_3 y 10ml de antibiótico/antimicótico (*GIBCO*), se mezcló todo, se agitó y se ajustó el pH a 7.35.

A 450ml se le agregó 50ml de suero fetal bovino (SFB) (*GIBCO*) para tener un volumen final de 500ml. A los otros 450ml se le agregó 50ml de agua. Se filtraron ambos medios y se realizó una prueba de esterilidad: en dos cajas de cultivo se le agregaron 5ml de medio y se dejaron en la estufa con 37°C y 5% de CO_2 . Cuando se corroboró que los medios estaban estériles se hizo el cultivo de las células. En 5ml de medio con suero se agregaron células suspendidas en 1ml de Suero fetal bovino con DMSO al 10%. Cuando el cultivo llegó a confluencia, se realizó la tripsinización.

Tripsinización: se eliminó el medio que tiene la caja, se le agregó tripsina previamente preparada y pasada por prueba de esterilidad. (15mg de tripsina en 10ml de tripsina EDTA 1X (presentación comercial de *GIBCO*)). Se ajustó el pH a ojo agregando 1 o 2 gotas de NaOH (cambia de color amarillo a rojo) y se filtró con una jeringa y un filtro de 22 micras (Millipore). Una vez preparado, se incubó a 37°C por 1 minuto. Pasado el tiempo se observaron al microscopio las células desprendidas. Se dió un ligero golpe para que se desprendieran el resto y se resuspendió para pasar la mitad del volumen a dos cajas dejando el sobrante. De esta forma, una parte del cultivo se propagó y la otra parte sirvió (una vez obtenido un número celular suficiente) para sembrar en placas de seis pozos. Con este propósito se utilizó un contador de células (Countess, Invitrogen) y se sembraron 350000 células por pozo de 10 cm^2 . Cuando los pozos tuvieron una confluencia del 90%, se estimularon con 5ng/ml de TGF- β 1. Se incubaron nuevamente 6 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Una vez terminado el tiempo de estímulo, se realizó el procedimiento de RT-PCR explicado anteriormente.

Resultados.

Búsqueda en base de datos.

Se obtuvieron datos de dos experimentos de microarreglos, para comparar la expresión de Fat1 en tejidos con fibrosis pulmonar idiopática contra tejidos control, la tendencia sugiere que Fat1 está sobre expresada en pulmones con FPI. A continuación se muestran las gráficas obtenidas de la base de datos GEO tanto para el archivo GDS1252 como para el archivo GDS4279 los valores se muestran en el apéndice 2. En ambos casos se puede apreciar que la señal en FPI se encuentra incrementada comparada con el control aunque, el análisis de t de Student muestra que con los datos del archivo GDS4279 se obtuvo diferencia significativa entre los grupos (Figuras 2 y 3).

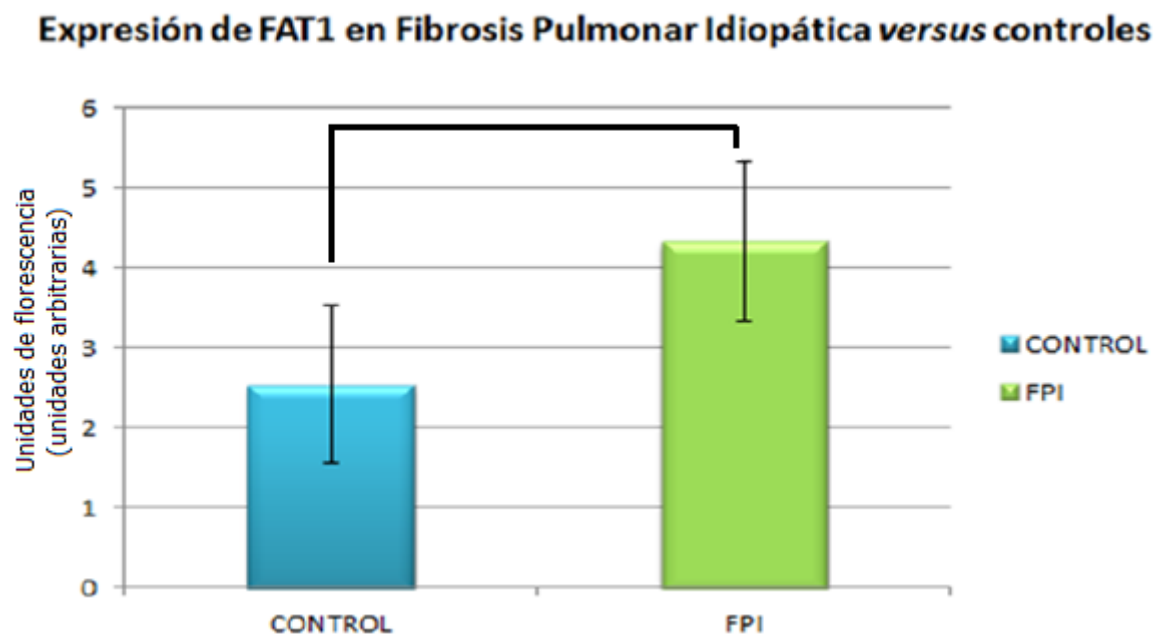


Figura 2. Gráfica realizada con los datos del archivo GDS1252 / 135,2 / Fat1 (GEO), en el que se compara la expresión para Fat1 en controles comparados con fibrosis pulmonar idiopática. Promedio pulmón normal 2.541428, pulmón con FPI 4.3423536. Desviación estándar pulmón normal 3.16855379, pulmón con FPI 3.03855113. En la t de Student se obtuvo una $p=0.16$

Expresión de FAT1 en Fibrosis Pulmonar Idiopática *versus* controles

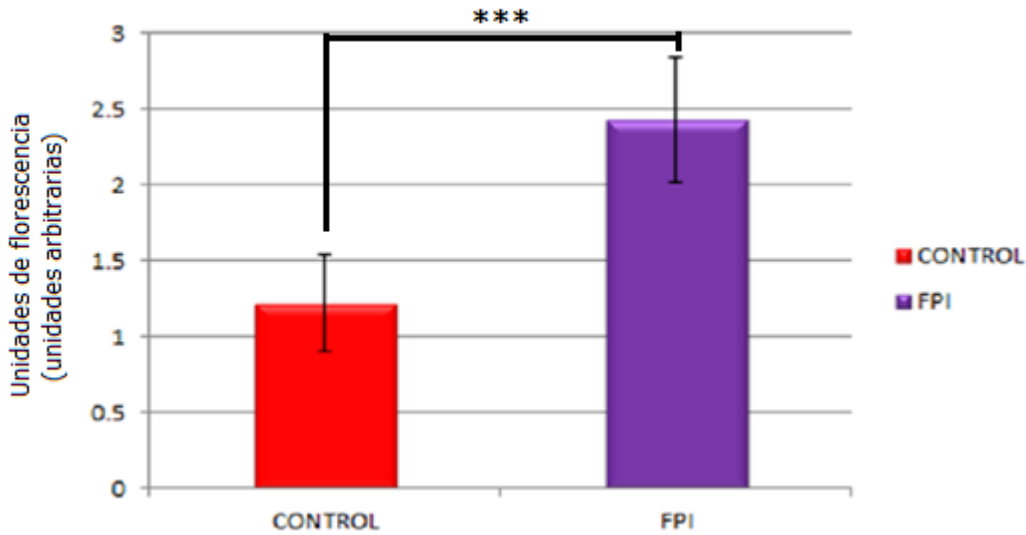


Figura 3. Gráfica realizada con los datos del archivo GDS4279 / 135,2 / Fat1 (GEO), en el que se compara la expresión para Fat1 en controles comparados con fibrosis pulmonar idiopática. Promedio pulmón normal 1.219808909, pulmón con FPI 2.4341. Desviación estándar pulmón normal 0.318021772, pulmón con FPI 0.415977198. En la t de Student se obtuvo una $p=7.09E-08$.

Validación por PCR de punto final.

Como ya se mencionó en la metodología se realizó la reacción de transcripción Reversa para obtener el cDNA. Para verificar que la reacción fuera exitosa, se realizó una PCR convencional para amplificar el gen constitutivo GAPDH. En todos los casos el gen amplificó específicamente, correspondiendo al tamaño del producto esperado (395 pb), lo cual significa que la síntesis de cDNA fue exitosa. En la Fig. 4 se muestra el resultado para un par de muestras.

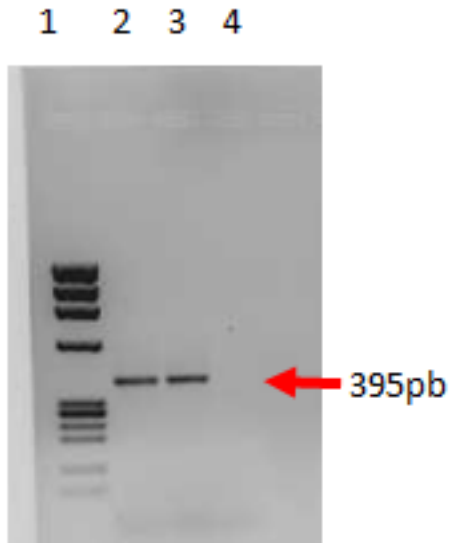


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para observar productos de PCR. El primer carril corresponde al marcador ϕ X174 RF DNA, en el segundo y tercero es cDNA de tejido pulmonar de pacientes con FPI. El cuarto carril es un control negativo de la reacción.

Comparación de muestras de FPI *versus* controles, por PCR en tiempo real.

Una vez que se obtuvo el cDNA de las muestras, se realizó la reacción de PCR en tiempo real con las condiciones y concentraciones antes descritas. Los parámetros de la amplificación fueron semejantes tanto para el gen de interés como para el gen constitutivo rRNA 18s. Se utilizaron los valores de ciclo umbral (Ct) para realizar la cuantificación; primero se obtuvo la diferencia entre el Ct de Fat1 y el Ct de 18s (Δ Ct), posteriormente, el resultado se sustituyó en la fórmula $2e^{-\Delta$ Ct} (30). Los resultados se muestran en la tabla 4. De acuerdo a lo reportado por el grupo de Edwards D (31), al utilizar un valor teórico de 10 ng/ μ l, la amplificación de Fat1 corresponde a una expresión moderada (figura 7). Con los resultados de la tabla 4, se elaboró una gráfica comparativa que permite observar los datos de una manera más clara. En ellos se puede apreciar que en el grupo de FPI existe una tendencia a expresar Fat1 en mayor cantidad al comparar con el grupo control. Este

resultado sumado a los obtenidos en la base de datos nos sugiere una vez más que efectivamente Fat1 es una molécula sobre-expresada en FPI.

Muestra	FAT1 (Ct)	18s (Ct)	Delta Ct	2 ^{-delta Ct}
C1	31.7	15.1	16.8	8.8E-06
C3	32.9	14.8	18.1	3.5E-06
C4	30.1	15.1	15.1	2.8E-05
C5	31.1	16.6	16.6	9.8E-06
FPI255	32.1	16.9	15.3	2.4E-05
FPI260	30.6	16	14.6	3.9E-05
FPI88	31.1	15.9	14.9	3.1E-05
FPI133	31.5	17	14.2	5.2E-05
FPIL	35.2	18.1	15.9	1.6E05

Tabla 4. Valores de Ct obtenidos para Fat1 y el gen constitutivo rRNA18s. Estos valores fueron sustituidos en la fórmula $2e^{-\Delta Ct}$ y el resultado se muestra en la última columna.

Expresión de FAT1 en Fibrosis Pulmonar Idiopática *versus* controles

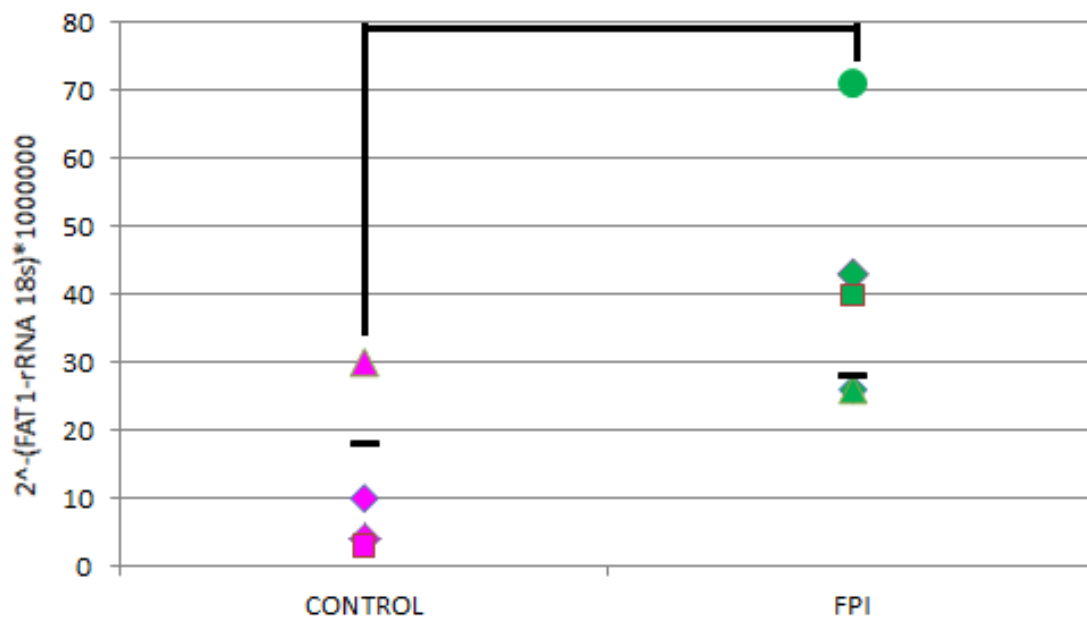


Figura 5. Expresión génica de Fat1/FAM en pulmones normales y con fibrosis pulmonar idiopática. La barra horizontal corresponde a la media de los valores de cada grupo 18 en control y 28 en FPI, desviación estándar 2.1234 en control y 1.4297 en FPI, en la t de Student se obtuvo $p=0.49$.

Se sintetizó un microgramo de RNA total y se diluyó en 100 ml de agua. Partiendo de una muestra teórica de 10 ng/μl:

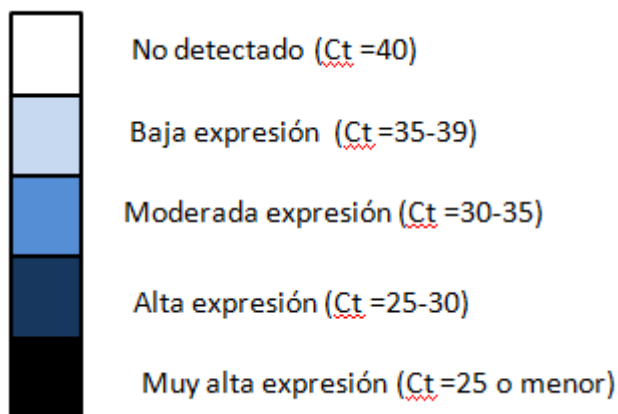


Figura 6. Análisis de expresión, FAT1 tiene un promedio Ct de 31.811, es decir se muestra como un gen con expresión moderada en pulmón (31).

Comparación de muestras de FPI y controles versus Neumonitis por hipersensibilidad, por PCR en tiempo real.

Debido a que el experimento que sugirió inicialmente la sobre-expresión de Fat1 en FPI fue realizado comparando a estos pacientes con los de otra entidad patológica que es distinta (neumonitis por hipersensibilidad), se hizo un nuevo experimento en donde se incluyeron muestras de este grupo para realizar nuevamente la comparación. Los resultados se muestran en la tabla 5 y se procesaron de la misma manera que en el experimento anterior.

Muestra	FAT1 (Ct)	18s (Ct)	Delta Ct	2 ^{-delta Ct}
C1	32.9	16.9	16	1.47902E-05
C4	31.2	17.9	13.2	0.000105534
C5	32	16.1	15.8	1.64107E-05
FPI255	32.1	18.8	14.3	4.65777E-05
FPI260	31.6	17.6	14	5.93661E-05
FPI88	31.9	17.6	14.3	4.69017E-05
FPI133	38.8	18.8	14	6.0824E-05
HP109	32.8	17.4	15.3	2.35323E-05
HP125	32.4	17.9	14.4	4.36094E-05
HP126	32.9	17.6	15.255	2.55733E-05

Tabla 5. Expresión de FAT1 en Fibrosis Pulmonar Idiopática, Neumonitis Idiopática *versus* controles por PCR en tiempo real.

Es importante mencionar que no se tomó en cuenta el control C4 ya que sobrepasó los valores obtenidos en el resto de las muestras. Los resultados corroboran el resultado anterior y muestran ser estadísticamente significativos (T-Student) e indican que Fat1 en FPI se encuentra expresada mayormente comparando contra pulmón normal y contra neumonitis por hipersensibilidad.

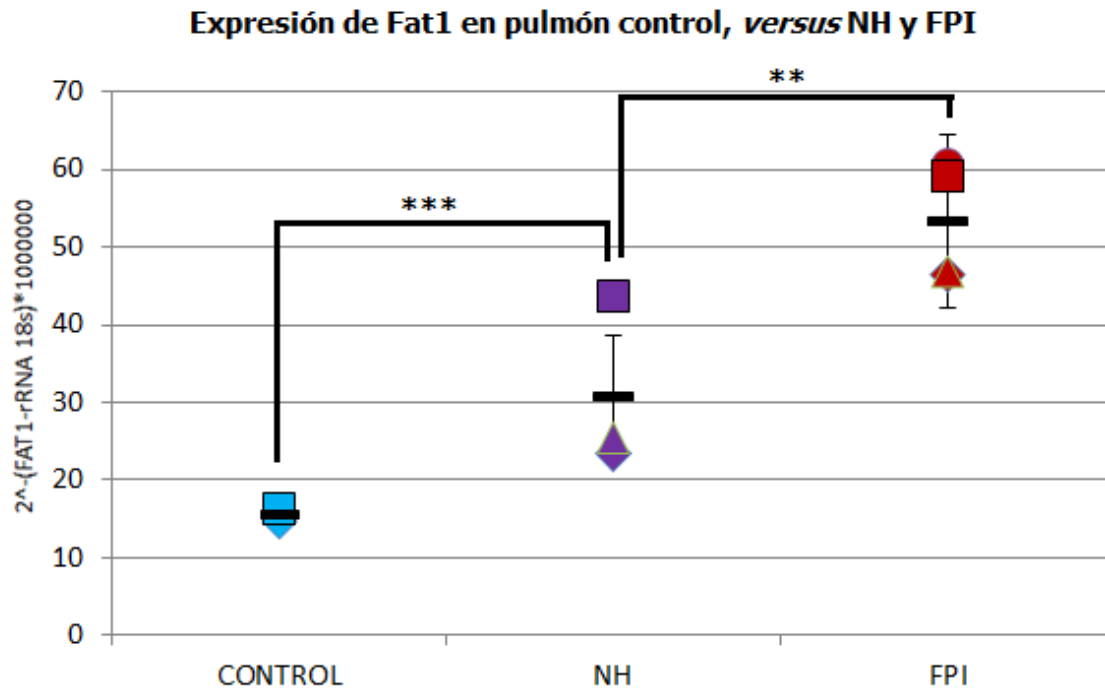


Figura 7. Expresión génica de Fat1 en pulmones normales, con fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad. La barra horizontal corresponde a la media de los valores de cada grupo 15.5 en control, 53 en FPI y 31.33 en NH, desviación estándar 1.20208153 en control, 7.73363864 en NH y 11.072639 en FPI, en la t de Student se obtuvo $p=0.00670815$ de los tres grupos, comparación en parejas Control vs NH $p=0.057574$, NH vs FPI $p=0.030622$, FPI vs Control $p=0.006139$.

Localización celular por inmunohistoquímica.

Una vez que el resultado de microarreglos fue corroborado con un ensayo más fino como lo es el PCR en tiempo real, surgió la duda ¿Qué tipos celulares pueden estar produciendo FAT1 en FPI? Para responder este cuestionamiento, se realizó el ensayo de Inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo contra FAT1 en concentración 7.5µg/ml con una dilución 1:40. El tiempo de revelado no excedió de los 6 minutos. Como se esperaba debido a los antecedentes, en los cortes histológicos de pacientes con FPI se encontró tinción positiva en células del epitelio alveolar. En la figura 9 se muestra de manera representativa uno de los casos de FPI y la tinción se puede apreciar en la parte basal de las células epiteliales, en

este caso es epitelio bronquiolar. En la figura 10, además del epitelio bronquiolar se puede apreciar la señal en el epitelio alveolar metaplásico e hiperplásico. En el caso de NH (figura 11), la señal se puede apreciar también en epitelios alveolares bronquiolares. En el caso de los pulmones normales, estos no mostraron tinción positiva. Es importante mencionar que en todos los casos se utilizó un control negativo de la técnica. Se muestra una imagen representativa en la figura 12.

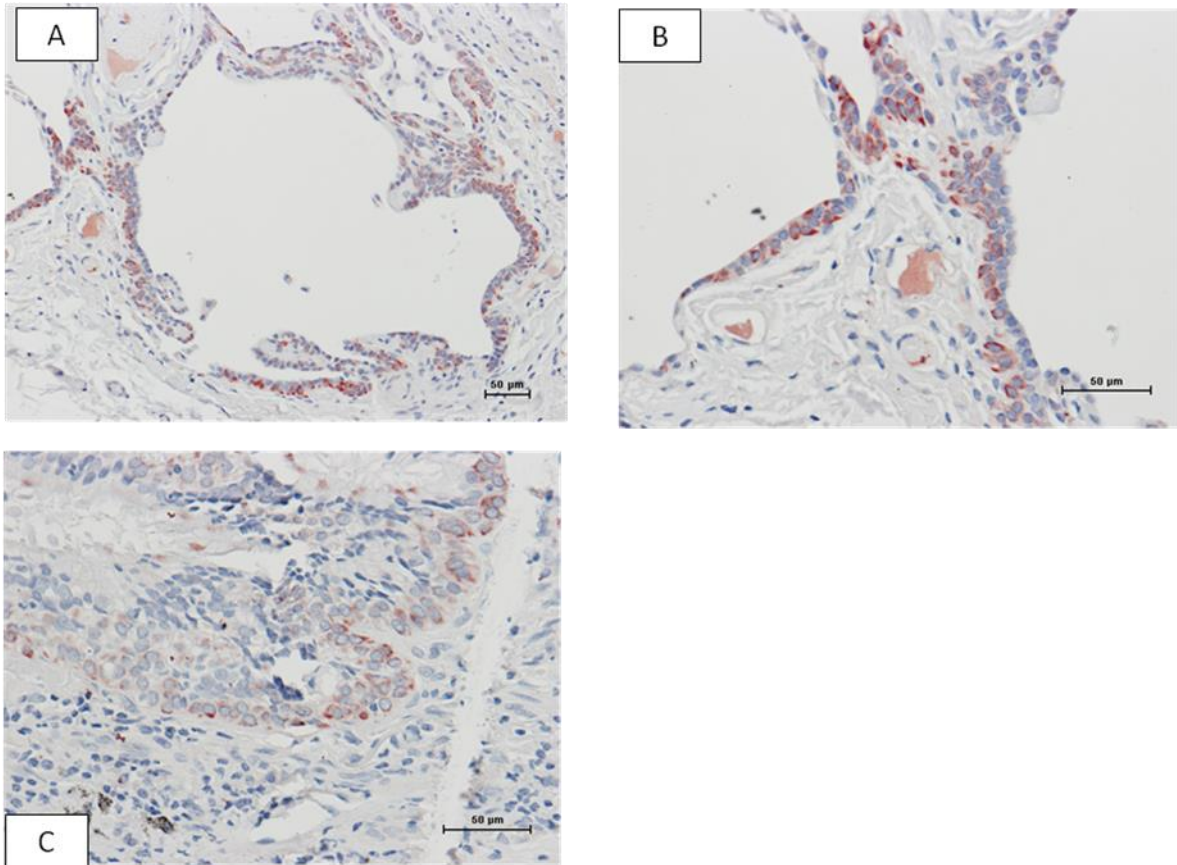


Figura 8. Inmunohistoquímica de pulmones de pacientes con FPI, A 20X, B y C 40X, en los tres casos se ve la tinción positiva en células epiteliales.

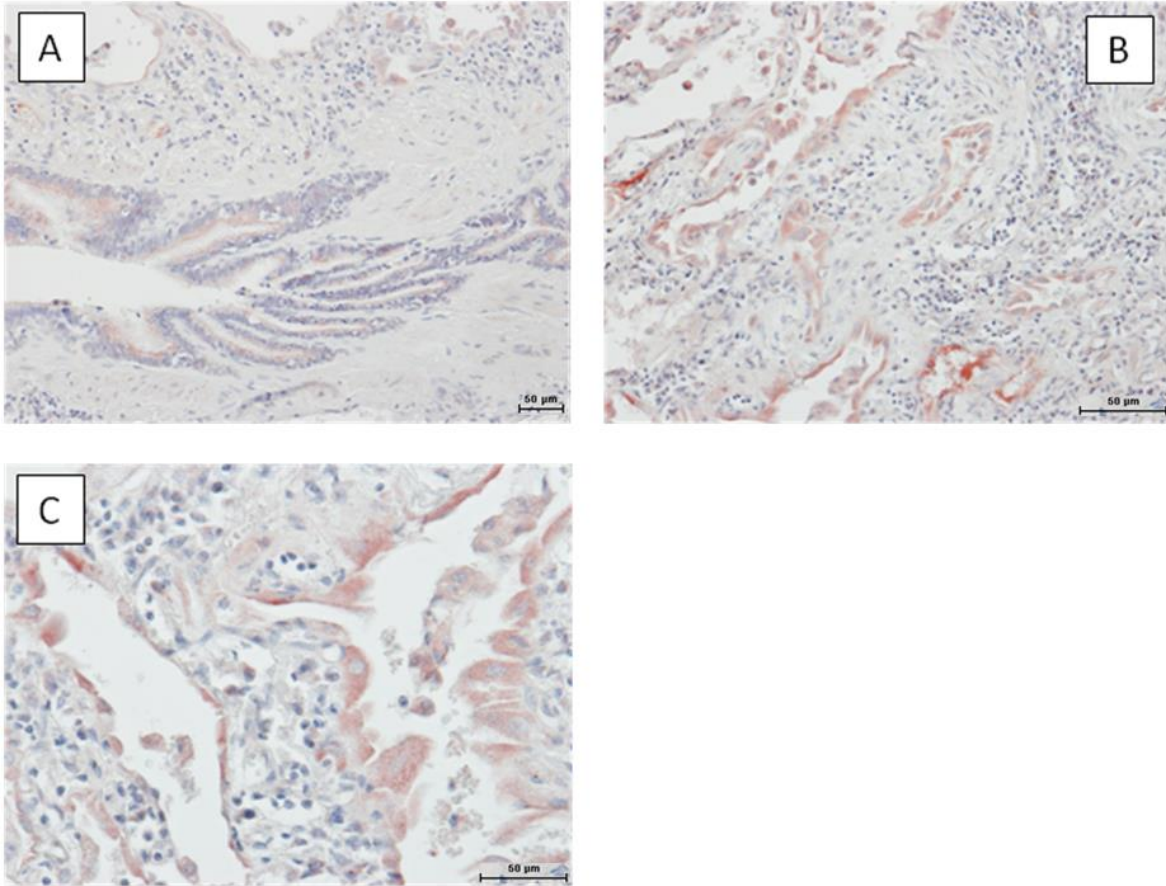


Figura 9. Inmunohistoquímica de pulmones de pacientes con FPI Muestra 3. A, B 20X y C 40X, se logra ver la tinción positiva en epitelios hiperplásicos y metaplásicos.

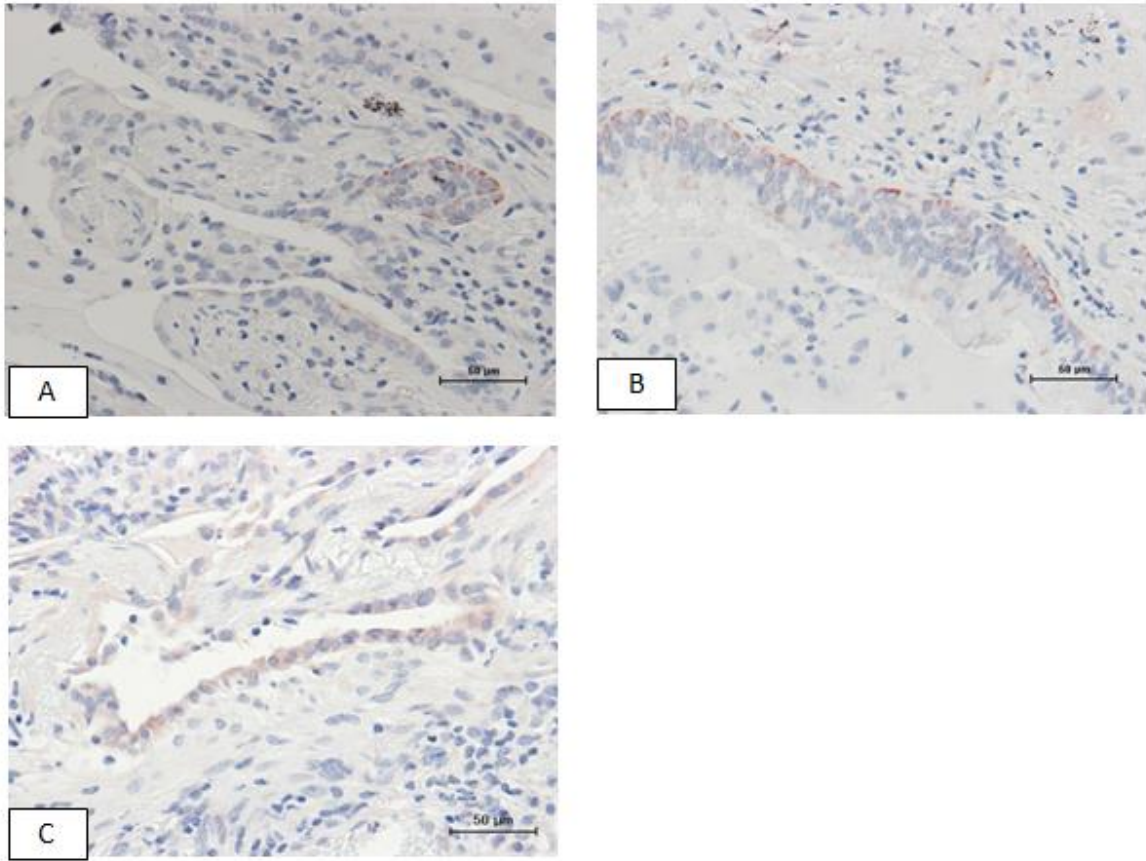


Figura 10. Inmunohistoquímica de pulmones de pacientes con NH Muestra 1. A, B y C 40X.

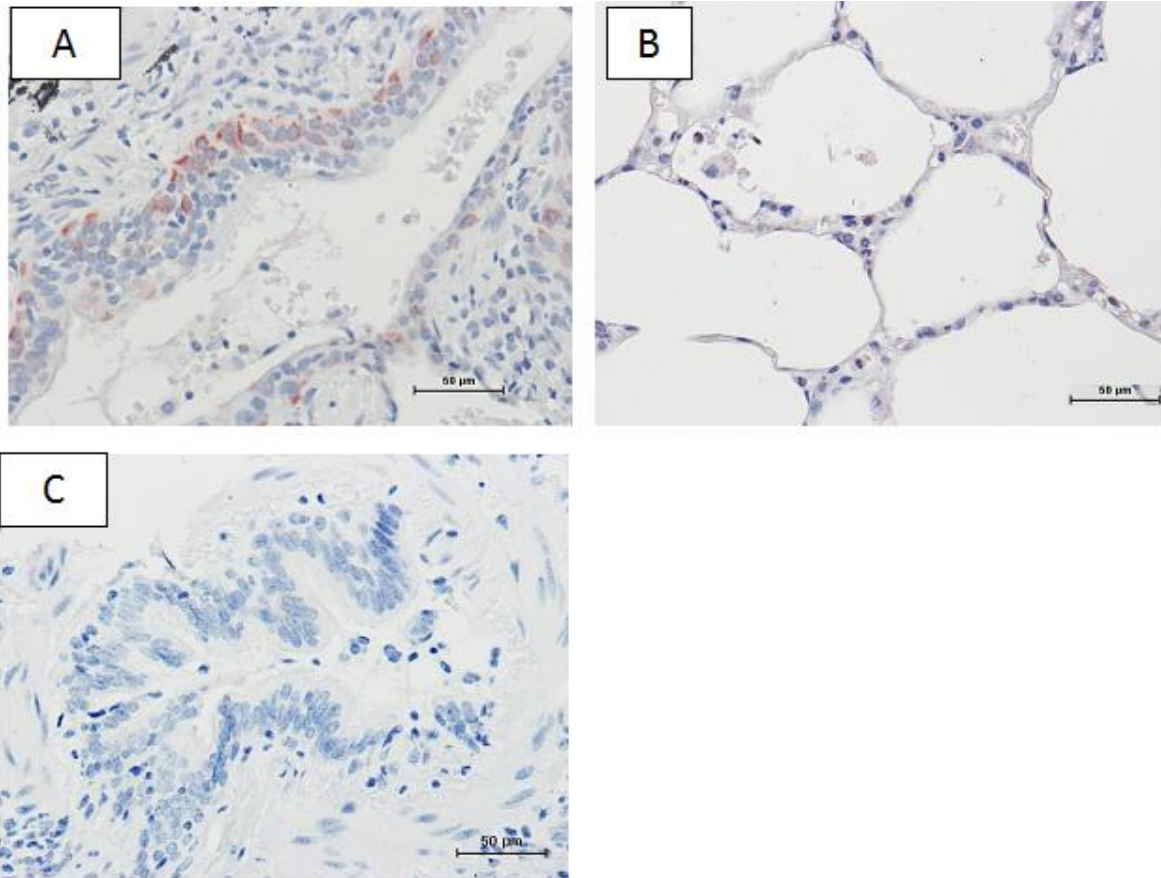


Figura 11. Inmunohistoquímica de pulmones de pacientes con A) Neumonitis por Hipersensibilidad, B) Pulmón control, C) control negativo. 40X.

Expresión de Fat1 en células A549.

Posterior a los resultados que arrojó la inmunohistoquímica, y debido a que la señal positiva fue observada en células epiteliales, se realizó un experimento, en el cual se trataron por 6 horas a las células de epitelio alveolar (A549) con 5ng / μ l de TGF β 1 que es un factor de crecimiento relevante en la FPI, ya que en la mayoría de las células es un inhibidor del ciclo celular, pero además en FPI es un agente fibrogénico importante que estimula la quimiotaxis hacia los fibroblastos y aumenta la expresión de colágena, fibronectina y proteoglicanos (32). Los resultados se muestran en la tabla 5. De manera interesante, al graficar los valores se puede

observar que la expresión de Fat1 en las células tratadas se incrementa, por lo que se puede decir que el TGFβ1 podría tener una influencia en la expresión de esta cadherina gigante.

	FAT1 Ct	18s Ct	Delta Ct	2 ^{^-delta Ct}	Promedio	Desv Est.
Cont1 6h	26.9	12.71	14.19	5.35E-05	4.57E-05	1.09E-05
Cont2 6h	28.43	13.78	14.65	3.88E-05		
TGFb1 6h	25.62	12.2	13.42	9.12E-05	8.31E-05	1.14E-05
TGFb2 6h	26.22	12.52	13.7	7.51E-05		

Tabla 6. Expresión de Fat1 en células A549.

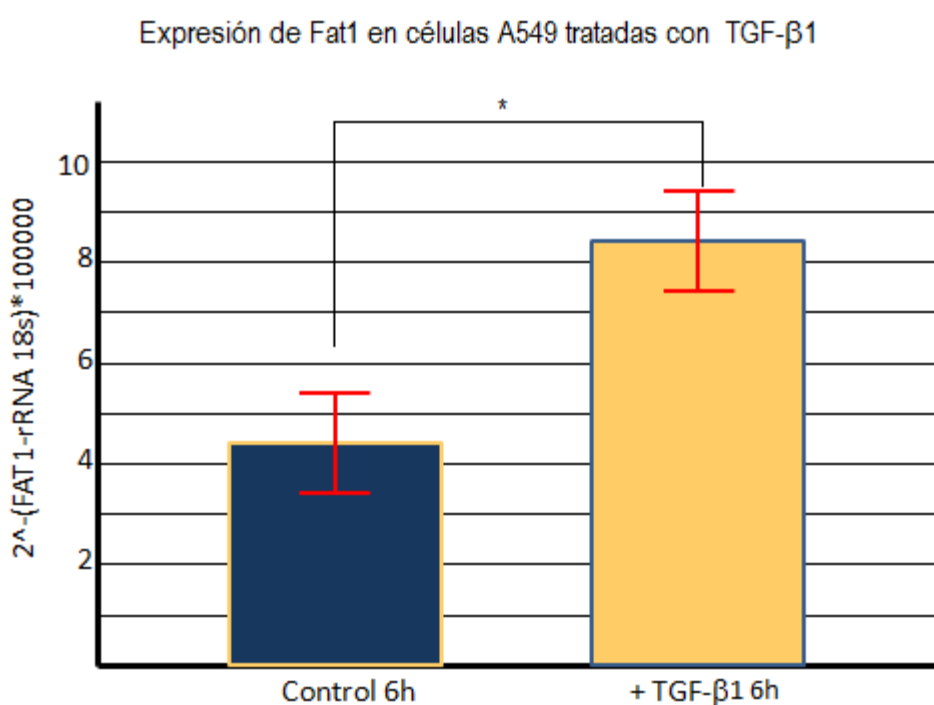


Figura 12. Expresión de Fat1 en células A549 tratadas con TGF-β1 con desviación estándar 1.09 en control y 1.14 en TGF-β1, en la t de Student se obtuvo p= 0.078.

Discusión.

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad crónica y letal. Los procesos celulares y moleculares que participan en la aparición y progresión de esta enfermedad, aún no se conocen con precisión y permanecen en constante estudio. (16). En un esfuerzo por entender los mecanismos patogénicos de la enfermedad, se propone que en la FPI el daño en el epitelio pulmonar podría desencadenar la proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (14). Los neumocitos tipo I mueren en el mismo microambiente y los neumocitos tipo II tratan de cubrir el daño (una característica relevante de la FPI es la presencia en gran número de epitelios hiperplásicos e hipertróficos los cuales podrían estar constituidos por neumocitos tipo II) (2). La conducta celular en el pulmón con FPI se modifica pero es importante conocer que genes pueden estar involucrados en el proceso. En un intento por resolver esta cuestión, Selman M y cols. (3) realizaron un análisis de expresión múltiple en el cual se compararon pulmones de pacientes con FPI *versus* controles (neumonitis por hipersensibilidad la cual es una entidad patológica diferente), mostrando a un grupo de genes sobre-expresados en FPI.

En un análisis posterior con los resultados obtenidos, se reportó a un gran grupo de genes como asociados a la función de desarrollo pulmonar (4), La expresión sostenida de este grupo de genes podría indicar un cambio aberrante en el fenotipo celular. Ante estos resultados y por ser la FPI una enfermedad en la que se postula un daño epitelial inicial, se decidió considerar a FAT1 para su estudio, la cual es una de las moléculas asociadas al desarrollo que se encuentra sobre-expresada en la patología en cuestión.

Es una ventaja obtener los datos de microarreglos de una base de datos pública, ya que esto hizo posible considerar que Fat1 está sobre expresada en pulmones con FPI contra tejidos de NH; sin embargo, los resultados del estudio por microarreglos se deben corroborar utilizando la técnica de PCR en tiempo real, ya que para un solo gen es un estudio más fino. Para que este ensayo se realizara

con la mayor certeza posible, se verificó que la reacción de transcripción reversa para obtener el cDNA fuera exitosa por medio de una PCR de punto final.

Con la PCR en tiempo real se compararon las muestras de FPI contra controles, para poder graficar los resultados se sustituyeron con la fórmula $2e^{-\Delta Ct} \cdot 1000000$ (30). En la gráfica presentada en la **figura 5**, se puede observar una tendencia a sobre-expresarse de Fat1 en FPI comparando con los tejidos control, y este es un dato que nos sugiere que efectivamente Fat1 puede ser una molécula relevante para el desarrollo de FPI. A pesar de esto, se puede observar también que los datos están dispersos. Se realizó un análisis estadístico aunque el número de muestras es pequeño y no se tiene el mismo número entre los tejidos control y los tejidos con FPI. La prueba de T de Student señala que no existen diferencias entre pulmón control *versus* pulmón con FPI. De acuerdo con el análisis de expresión hecho por Nuttall RK (31), Fat1 tiene una expresión moderada.

Debido a que los controles fueron adquiridos de manera comercial y a que el ensayo de microarreglos de Selman M. (14) fue comparado contra NH, se realizó un segundo experimento en el cual se incluyó un grupo de muestras de Neumonitis por hipersensibilidad. La gráfica realizada con los resultados de la PCR en tiempo real, nos sugiere la sobreexpresión de Fat1 en pulmones con FPI, no solo comparada con neumonitis por hipersensibilidad sino también contra los tejidos control, la prueba T de Student señala que existen diferencias significativas al comparar por parejas los grupos. Al hacer este análisis se observó que hay diferencia significativa (mayor expresión) en FPI, comparando tanto con NH como con controles.

Una vez que se analizó el ensayo de microarreglos, se realizó la técnica de inmunohistoquímica, donde se encontró tinción positiva en células epiteliales, mayormente en epitelio bronquiolar, de manera interesante la señal de estas células se observa con frecuencia en la parte basal. En 2003 Ciani *et al* demostraron que los ratones KO de Fat1 mueren dentro de las 48 horas de su

nacimiento, esto se debe (entre otras cosas) a una falla en la unión de los podocitos en el riñón (33). Los autores sugieren que la separación normal de las células podría estar mediada por FAT1 y también podría ser que en el epitelio bronquiolar FAT1 estuviera ejerciendo una reorganización de este tejido.

Ahora bien, en dos casos se pudo observar que FAT1 se aprecia en epitelios alveolares metaplásicos e hiperplásicos; podría significar que estos epitelios están en algún proceso que involucre cambios en la conducta celular, como migración o proliferación, y que FAT1 podría participar activamente en el intento de reparación del tejido. Recordemos que esta molécula puede interactuar con citoesqueleto vía las proteínas de anclaje a filamentos de actina ENA/VASP, regulando la migración o bien podría activar algunas vías de señalización como Wnt e Hippo que pueden regular la proliferación celular (22, 26).

Como FAT1 se encuentra expresada en células del epitelio alveolar, se realizó un experimento con células A549 tratadas con TGF β 1 por 6 horas, el cual es un factor de crecimiento que se encuentra involucrado en la progresión de la FPI. La expresión de Fat1 aumenta en las células que fueron tratadas comparadas con controles, esto significaría que el TGF β 1 podría regular la expresión de Fat1. Este hallazgo es importante, ya que no hay ningún dato en la literatura que sugiera esta relación; como se menciona en el párrafo anterior, se ha reportado que Fat1 puede ser regulado por la vía de Wnt, ya que esta vía juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular (28). La desventaja de este experimento es que solo fue un ensayo, pero es probable que al incrementar el experimento haciendo un curso temporal, se obtengan datos más precisos sobre la regulación del TGF β 1 en la expresión de Fat1.

Con estos resultados en conjunto, se puede razonar un panorama hipotético, posiblemente, las células epiteliales expresan FAT1 para que junto con otras moléculas intenten reparar el daño al tejido en FPI, participando en procesos de señalización y regulando la proliferación y la migración de las células epiteliales.

FAT1 podría también modificar el patrón de expresión de los epitelios y alterar la conducta de fibroblastos. Sería muy relevante realizar un experimento en tejidos donde apenas comenzara la FPI y comparar con lo que tenemos; desafortunadamente esto no se puede ya que generalmente se obtienen muestras de pacientes cuya enfermedad ya está avanzada.

Aunque los resultados son muy relevantes, falta por conocer aún más sobre esta cadherina en FPI. Estudios que nos permitan sobre-expresar Fat1 serán importantes para análisis *in vitro*. Esto nos ayudará a determinar si FAT1 modifica la tasa de proliferación, viabilidad, migración y apoptosis de las células epiteliales alveolares, y también saber si su sobre-expresión modifica la síntesis de moléculas profibrosantes. También podríamos apagar su expresión y determinar sus efectos en la tasa de proliferación y capacidad migratoria.

Conclusiones.

- Fat1 está sobre expresada en tejidos con FPI comparados contra NH y normal.
- La localización de Fat1 en FPI es en células epiteliales, principalmente epitelio bronquiolar.
- En células A549 tratadas a 6 horas con TGF β 1, la expresión de Fat1 se incrementa con respecto a su control.

LITERATURA CONSULTADA

1. Jomarie Zeleznik, MD. Normative aging of the respiratory system. Division of Geriatrics, Montefiore Medical Center, Albert Einstein College of Medicine, USA, 2003.
2. Pardo A. Metaloproteasas de matriz en la remodelación aberrante de la fibrosis pulmonar, Mensaje Bioquímico Vol. XXXII. Departamento de Bioquímica. 2008.
3. King T, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378; 1949-61. 2011.
4. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin Chest Med* 25:531-547, 2004.
5. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y; HP Study Group. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:952-958, 2003.
6. Perez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Sanchez M, Carrillo G, Perez R, Sansores R, Gaxiola M, Selman M. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 148:49-53, 1993.
7. Vourlekis JS, Schwarz MI, Cherniack RM, et al. The effect of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung. *Ann Allergy Asthma Immunol* 90:604-610, 2003.
8. Lourdes María Barrera Ramírez. Inmunoregulación en Neumonitis por Hipersensibilidad. Tesis de Doctorado. UNAM. 62pp. Junio 2008.
9. Reyes C, Wenzel F, Lawton B, et al. The pulmonary pathology of farmer's lung disease. *Chest*; 81: 142-146. 1982.
10. Churg A, Müller N, Flint J, et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis and differential diagnosis. *Eur Respir Mon*; 39: 189-198. 2007.

11. Travis W, Colby T, Koss M, et al. Idiopathic interstitial pneumonitis and other diffuse parenchymal lung diseases. In: Atlas of nontumor pathology non-neoplastic disorders of the lower respiratory tract. Washington, DC: American registry of pathology and the armed forces institute of pathology: 115-123. 2002.
12. Pérez-Padilla R, Gaxiola M, Salas J, et al. Bronchiolitis in chronic pigeon breeder's disease. Morphologic evidence of a spectrum of small airway lesions in hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigens. *Chest*; 110: 371-377. 1996.
13. Cordier J. Challenges in pulmonary fibrosis 2: Bronchiolocentric fibrosis. *Thorax*; 62: 638-649. 2007.
14. Selman M, Pardo A, Kaminski N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aberrant Recapitulation of developmental Programs? *PLoS Medicine*, Vol. 5. 2008.
15. Yang I. Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Epigenomics*. 2; 195-203. 2012.
16. Selman M, King T y Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about its Pathogenesis and Implications for therapy. *Ann Intern Med*. 134:136-151. 2001.
17. Gross T, Hunninghake W. H. idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 345; 517-525. 2001.
18. Nalysnk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev*. 126; 355-361. 2012.
19. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol*. 75, 464-474. 1977.
20. Sánchez Sánchez L., Hernández Vázquez J. M. V., López Marure R. *REB* 24(3, 4): 97-103. Papel de las cadherinas en la metástasis. 2005.
21. Hou R, et al. The Fat1 cadherin integrates vascular smooth muscle cell growth and migration signals. *J Cell Biol*, 173 (3): 417–429, 2006.

22. Dunne J et al. Molecular Cloning and Tissue Expression of FAT, the Human Homologue of the Drosophila fat Gene That Is Located on Chromosome 4q34–q35 and Encodes a Putative Adhesion Molecule. *Genomics* 30, 207–223, 1995.
23. Elham Sadeqzadeh, Charles E. de Bock, and Rick F. Thorne. *Sleeping Giants: Emerging Roles for the Fat Cadherins in Health and Disease*. Cancer Research Unit, School of Biomedical Sciences and Pharmacy, University of Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia, 2013.
24. Magg T et al. Processing of the human protocadherin Fat1 and translocation of its cytoplasmic domain to the nucleus. *Experimental Cell Research* 307, 100 – 108, 2005.
25. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process *Cell*, 84, pp. 359–369. 1996.
26. Bear JE, et al. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility *Cell*, 109, pp. 509–521. 2002.
27. Kwiatkowski AV, Gertler FB, Loureiro JJ. Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Cell Biol. Jul; 13(7):386-92*. 2003.
28. Ochoa-Hernández AB, Barros-Núñez P, Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA, La vía de señalización Wnt-B-catenina y su relación con cáncer. *Cirugía y Cirujanos [en línea]* 2012, 80 (Julio-Agosto): [Fecha de consulta: 27 de enero de 2016] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=66224459015> ISSN 0009-7411
29. Robert E. Farrell Jr. *RNA Methodologies, a laboratory guide for isolation and characterization*. Second edition 533pp, Academic Press. 1993.
30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-8. 2001.

31. Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett*, 563: 129-34, 2004.
32. Fitch PM, Howie SE, Wallace WA. Oxidative damage and TGF-beta differentially induce lung epithelial cell sonic hedgehog and tenascin-C expression: implications for the regulation of lung remodelling in idiopathic interstitial lung disease. *Int J Exp Pathol* 92: 8-17, 2011.
33. Ciani L, et al. Mice Lacking the Giant Protocadherin mFAT1 Exhibit Renal Slit Junction Abnormalities and a Partially Penetrant Cyclopia and Anophthalmia Phenotype. *Mol Cell Biol*, p. 3575-3582. 2003.
34. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* Sep;2(9):e251. PMID: 16128620. 2005.
35. Meltzer EB, Barry WT, D'Amico TA, Davis RD, Lin Shu S, Onaitis MW, Morrison LD, Sporn TA, Steele MP y Noble PW. Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: proof-of-principle. *BMC Med Genomics*. 2011; 4: 70. 2011.
36. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N. Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, Vol 173. 2006.
37. Selman M, Pardo A, and Talmadge E. King Jr. Hypersensitivity Pneumonitis Insights in Diagnosis and Pathobiology. 2012
38. Advantage RT-for-PCR Kit, User Manual. Catalog Nos.: 639505,639506. PT1107-1 (PR023473). Published 25 March 2010.
39. Mariel Sofía Maldonado Bonilla. Expresión de la metaloproteinasa de matriz en Fibrosis Pulmonar Idiopática. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 48pp. 2011.

40. María del Jazmín Calyeca Gómez. Análisis de la expresión de la ADAMTS-5 en Fibrosis Pulmonar Idiopática. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 45pp. 2011.
41. Ivette Rizo Pastrana. Expresión de ADAMTS-9 en Fibrosis Pulmonar Idiopática. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 41pp. 2011.
42. Gabriela Díaz Piña. Efecto de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en la expresión de moléculas profibrosantes en fibroblastos pulmonares. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 39pp. 2012.
43. Gustavo Ramírez Martínez. Análisis de receptores de quimiocinas en fibroblastos derivados de pulmón normal y con Fibrosis Pulmonar Idiopática. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 46pp. 2005.
44. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med.* 2005 Sep;2 (9):e251. Epub. 2005.
45. Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips JE, Garrido R, Harris P, Burns L, Renteria L, Woods J, Chen L, Allard J, Ravindran P, Bitter H, Liang Z, Hogaboam CM, Kitson C, Budd DC, Fine JS, Bauer CM, Stevenson CS. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for "active" disease. *PLoS One.* 2013;8 (4):e59348. doi: 10.1371/journal.pone.0059348. Epub. 2013.
46. Sosa-Garrocho M, Macías-Silva M. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β): funciones y vías de transducción. *REB* 23 (1): 3-11,2004. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/publicaciones/ampb/numeros/2004/03/2004_105_3-11Marcela_Sosa-Garrocho.pdf
47. Lozano Bolaños A, Mendoza Milla C, Cisneros Lira J, Ramírez R, Checa M, Barrera L, García-Alvarez J, Carbajal V, Becerril C, Gaxiola M, Pardo A, Selman M. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*

Published 1 December 2012 Vol. 303 no. 11, L978-L990 DOI:
10.1152/ajplung.00184.2012

48. David M Medina Pérez. Análisis de la producción de moléculas profibrosantes por células epiteliales de pulmón senescentes y su efecto sobre fibroblastos pulmonares. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 59pp. Junio 2013.
49. Selman M, Pardo A and King Talmadge Jr .Hipersensitivity Pneumonitis . Am J Res Crit Care Med, Vol. 186. 2012.
50. Vourlekis J, Schwarz M, Cool C, et al. Nonspecific interstitial pneumonitis as the sole histologic expression of hypersensitivity pneumonitis. Am J Med; 112: 490-493. 2002.

APENDICE 1

Células epiteliales alveolares (línea inmortalizada de neumocitos tipo II, A549).

Las células A549 son células alveolares humanos adenocarcinomas basales epiteliales. La línea celular A549 se desarrolló por primera vez en 1972 por D. J. Giard, *et al.* a través de la extracción y cultivo de tejido pulmonar canceroso en el tumor extirpado de un varón caucásico de 58 años de edad. Son células escamosas y responsables de la difusión de algunas sustancias, tales como agua y electrolitos, a través de los alvéolos de los pulmones, crecen como células en monocapa. La línea celular epitelial alveolar de humano A549 puede ser cultivada adherida o en suspensión en una solución *in vitro*.

Otra característica de estas células es que son capaces de sintetizar lecitina y contener alto nivel de ácidos grasos insaturados, que son importantes para mantener los fosfolípidos de membrana en las células. La línea celular A549 se utiliza ampliamente como un modelo *in vitro* de epitelio pulmonar II de células, para el metabolismo de drogas y como anfitrión transfección.

Estas células se obtuvieron de la compañía *American Type Cell Culture (ATCC)* con número de catálogo CCL-215.

APENDICE 2.

VALORES OBTENIDOS DE LA BASE DE DATOS GEO (NCBI).

A continuación se muestran las gráficas de los dos los ensayos microarreglos:

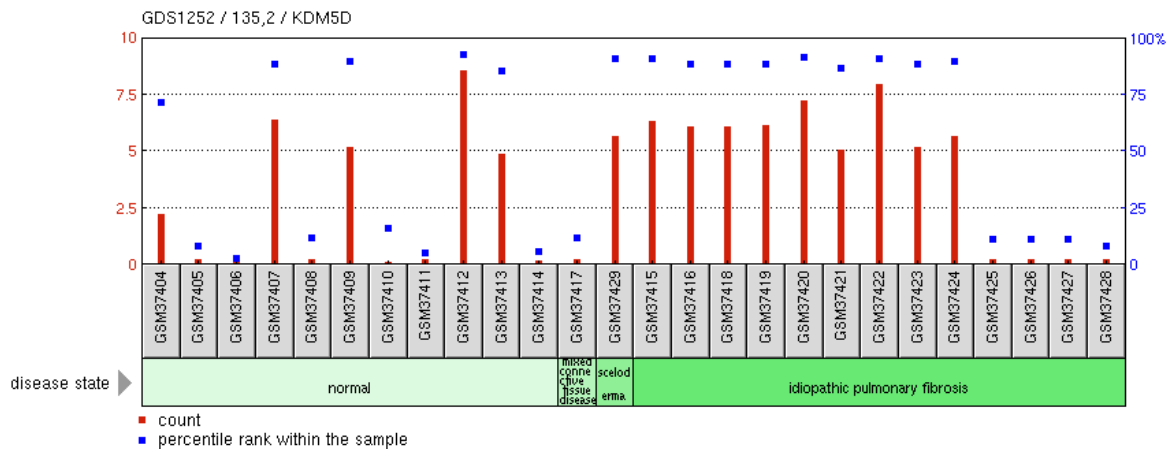
Sobre regulación y el papel de la osteopontina profibrótica en la fibrosis pulmonar idiopática humana (34).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1252:135%2C2>

Profile GDS1252 / 135,2 / KDM5D

Title Idiopathic pulmonary fibrosis

Organism Homo sapiens

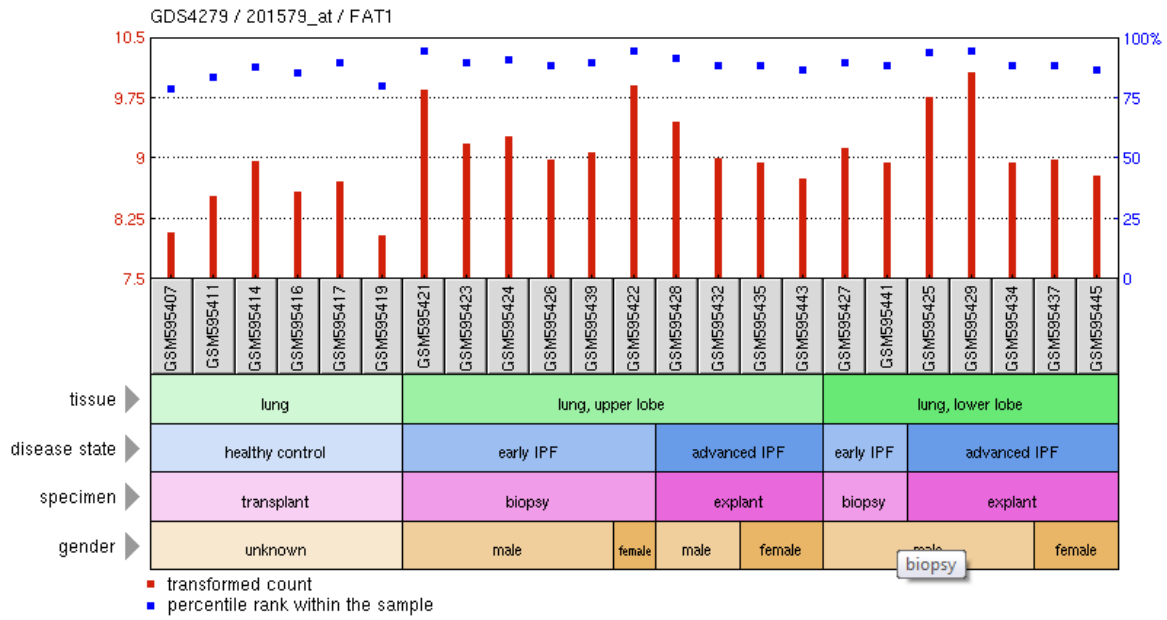


normal histology lung tissue sample B141	0.927453		
normal histology lung tissue sample B160	1.33344		
normal histology lung tissue sample B167	0.988472		
normal histology lung tissue sample B210	1.19771		
normal histology lung tissue sample B301	1.17259		
normal histology lung tissue sample B54	1.07134		
normal histology lung tissue sample B325	1.50356		
normal histology lung tissue sample B406	0.763053		
normal histology lung tissue sample B628	1.55136		
normal histology lung tissue sample B634	1.8579		
normal histology lung tissue sample B642	1.05102		
IPF lung explant B438	2.1428	PROMEDIO PULMON NORMAL	
IPF lung explant C498	2.92306		1.21980891
IPF lung explant D312	2.07725	DESVIACION ESTANDAR NORMAL	
IPF lung explant D313	2.95056		0.31802177
IPF lung explant D669	2.18761	PROMEDIO PULMON FPI	
IPF lung explant E144	2.03511		2.4341
IPF lung explant E396	2.59646	DESVIACION ESTANDAR FPI	
IPF lung explant E465	2.73667		0.4159772
IPF lung explant E54	2.30842		
IPF lung explant D810	1.99171		
IPF lung explant E286	2.33529		
IPF lung explant E32	3.22602		
IPF lung explant F46	2.13234		

Modelo de regresión prueba bayesiana para el diagnóstico de la fibrosis pulmonar: prueba de principio (35).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS4279:201579> at

Profile GDS4279 / 201579_at / FAT1
Title Early and advanced idiopathic pulmonary fibrosis: whole lung
Organism Homo sapiens



healthy donor biological replicate 1	8.07928		
healthy donor biological replicate 2	8.53731		
healthy donor biological replicate 3	8.96529		
healthy donor biological replicate 4	8.59739		
healthy donor biological replicate 5	8.72271		
healthy donor biological replicate 6	8.05638		
Advanced IPF explant upper lobe rep152	9.46495	CONTROL PROMEDIO	8.49306
Advanced IPF explant upper lobe rep157	9.00946		
Advanced IPF explant upper lobe rep158	8.95358	CONTROL DESVIACION ESTANDAR	0.36069001
Advanced IPF explant upper lobe rep160	8.76315		
Advanced IPF explant upper lobe rep146	9.76214	FPI PROMEDIO	9.19674111
Advanced IPF explant upper lobe rep152	10.0835		
Advanced IPF explant upper lobe rep157	8.95468	FPI DESVIACION ESTANDAR	0.46443205
Advanced IPF explant upper lobe rep158	8.9849		
Advanced IPF explant upper lobe rep160	8.79431		